

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
(PEDECIBA)
ÁREA BIOLOGÍA**

**TESIS PRESENTADA PARA ACCEDER A LA MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS
Opción: Biología Celular y Molecular**

**"Marcadores moleculares en la histogénesis de la retina:
una aproximación utilizando anticuerpos monoclonales"**

Flavio R. Zolessi

Laboratorio de Cultivo de Tejidos
Sección Biología Celular
Facultad de Ciencias

Orientador:
Prof. Dra. Cristina Arruti

Tribunal:
Presidente: **Prof. Dr. Ricardo Ehrlich**
Vocales: **Prof. Dr. Alberto Nieto**
Prof. Dra. Angela Suburo

Montevideo - Uruguay
29 de mayo de 1998

Este trabajo está dedicado a mis dos madres.

A Mamá, quien siempre me apoyó e incentivó en mis inquietudes.

A Tía Chicha, quien siempre vivirá en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS:

Debo a mucha gente el haber podido realizar este trabajo, aquí esta mi agradecimiento expreso hacia algunos de ellos:

A mi Orientadora, Cristina Arruti

A Angela Suburo, Alberto Nieto y Ricardo Ehrlich, por haber aceptado integrar el Tribunal de esta Tesis

A Luis Borsche

A Alberto Nieto, Adriana Baz, Sylvia De Matteis y los demás integrantes de la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Química

A mis compañeros y ex-compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, especialmente a Alicia De María, Virginia Pellegrino y Libertad Lamarque de Nusa

A mis compañeros de Biología Celular de la Facultad de Ciencias

A Julio Siciliano y su esposa Victoria

A mis compañeros del Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina

Un agradecimiento muy especial a mi esposa, Mónica, quien me acompañó en cada paso de esta aventura.

ÍNDICE

<u>Contenido</u>	<u>Pág.</u>
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VI
INTRODUCCIÓN	
1 - La retina neural	1
1.1 – Estructura general	1
1.2 - Desarrollo	2
1.2.1. – Histogénesis	2
1.2.2. – Diferenciación celular	3
2 – Aplicación de la tecnología de los anticuerpos monoclonales al análisis de la heterogeneidad molecular de la RN	7
2.1 – Generación de Acms	7
2.2 – Los Acms como herramientas	8
2.2.1 – Disección inmunológica	9
2.2.2 – Otras aplicaciones de los Acms al análisis del desarrollo embrionario	10
2.3 – Anticuerpos monoclonales contra antígenos de RN	11
RESULTADOS	
1 – Obtención de anticuerpos monoclonales contra antígenos de RN	15
2 – Caracterización del Acm 3C3	20
3 – Análisis del patrón de marcado del Acm 3C3 por inmunohistoquímica	23
3-1 . Distribución espacial del marcado por 3C3 en la RN del pollo adulto	23
3.2 – Expresión del epítotope 3C3 durante el primer tercio del desarrollo embrionario	25
3.3 – Distribución de la señal del Acm 3C3 en el desarrollo de la RN	25
3.4 – Inmunofluorescencia sobre células de RN en cultivo y localización subcelular del epítotope de 3C3	31
3.5 – Otras estructuras oculares	33
3.6 – Otros órganos del sistema nervioso central	33
4 – Análisis bioquímico primario del Ag 3C3	35
4.1 – Tratamientos químicos sobre cortes y células en cultivo	35

4.2 – Análisis del Ag 3C3 por electroforesis	37
4.2.1 – SDS-PAGE	37
4.2.2 – Punto isoeléctrico del Ag 3C3	40
4.3 – Análisis de la solubilidad del Ag 3C3	40
4.4 – Sensibilidad a tripsina	41
5 – Reactividad cruzada con otras especies de vertebrados	44
5.1 – Cobayo (<i>Cavia porcellus</i>)	44
5.2 – Tortuga (<i>Trachemys dorbigni</i>)	44
5.3 - <i>Amphisbaena</i>	45
DISCUSIÓN	
Los anticuerpos monoclonales como aproximación al estudio del desarrollo de la RN del pollo	47
El Acm 3C3 y su antígeno en el desarrollo	50
Patrón de expresión del epítotope reconocido por el Acm 3C3	50
Expresión del epítotope en embriones tempranos	51
Expresión del epítotope en neuronas	52
Expresión del epítotope 3C3 en células no neuronales	53
Regulación del epítotope 3C3 en el desarrollo	53
Localización subcelular del epítotope de 3C3	54
Distribución del Ag 3C3 en la RN del pollo	55
Algunas propiedades bioquímicas del Ag 3C3	57
Reactividad cruzada del Acm 3C3 con otras especies de vertebrados	58
Comparación del Ag 3C3 con otros marcadores de la RN	61
MATERIALES Y MÉTODOS	
1 – Animales	64
2- Generación de anticuerpos monoclonales	65
2.1 – Inmunización	65

2.2 – Generación de líneas de hibridoma	66
2.2.1 – Obtención de las células	66
2.2.2 - Fusión	67
2.2.3 – Siembra, selección y cultivo de las células híbridas	67
2.2.4 – Clonado por dilución límite	68
2.2.5 – Determinación de viabilidad celular	68
3 – Producción de los Acms	70
3.1 – Producción de sobrenadante de cultivo de hibridoma	70
3.2 – Producción de líquido ascítico	70
3.3 – Purificación del Acm 3C3	71
4 – Métodos de ensayo de los Acms obtenidos	72
4.1 – ELISA sobre células de RN	72
4.1.1 – Sensibilización de las placas	72
4.1.2 – Protocolo de inmunodetección en ELISA	73
4.2 – Inmunolocalización <i>in situ</i>	73
4.2.1 – Cortes a congelación	74
4.2.2 – Cortes en parafina	77
4.2.3 – Inmunohistoquímica indirecta sobre cortes	77
4.2.4 – Inmunocitoquímica sobre células cultivadas	78
4.3 – Inmunolocalización sobre membranas de nitrocelulosa	79
4.3.1 – Dot-blot	79
4.3.2 – Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y Western-blot	80
4.3.3 - IEF	82
4.3.4 – Protocolo de inmunodetección sobre nitrocelulosa	85
4.3.5 – Determinación de peso molecular aparente y de punto isoeléctrico de las bandas detectadas	85

5 – Análisis del Ag 3C3	86
5.1 – Extracción con Tritón X-100	86
5.1.1 – Células en cultivo	86
5.1.2 - Cortes	86
5.1.3 – Retinas enteras	87
5.2 – Análisis de la naturaleza bioquímica del epítpe y el Ag 3C3	87
5.2.1 – Oxidación de glúcidos	87
5.2.2 – Tratamiento con tripsina	88
5.2.3 – Solventes orgánicos	88
APÉNDICE	
1 – Algunas soluciones utilizadas	89
2 – SDS-PAGE	91
BIBLIOGRAFÍA	97

ABREVIATURAS

Ac:	Anticuerpo
Acm:	Anticuerpo monoclonal
Acp:	Anticuerpo policlonal
ADN:	Acido desoxirribonucleico
Ag:	Antígeno
BSA:	Seroalbúmina bovina
CBB:	Azul Brillante de Coomasie
CMFG:	Solución salina tamponada, con glucosa, libre de calcio y magnesio
DMEM:	Medio Mínimo Esencial modificado por Dulbecco
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Acido etilen-diamino-tetraacético
ELISA:	Enzimo Inmuno Ensayo
EPR:	Epitelio pigmentario de la retina
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
IEF:	Isoelectroenfoque
Ig:	Inmunoglobulina
KDa:	Kilodaltons
PFA:	Paraformaldehído
PBS:	Solución salina con tampón fosfato
pI:	Punto isoeléctrico
PMSF:	Fenil-metil-sulfonil fluoruro
RN:	Retina neural
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SFB:	Suero fetal bovino
TCA:	Acido tricloroacético
TX100:	Tritón X-100

RESUMEN

La retina neural (RN) de los vertebrados es una estructura sumamente interesante desde el punto de vista de su desarrollo. Su accesibilidad y relativa simplicidad morfológica la han convertido en un modelo muy utilizado para analizar procesos de diferenciación celular e histogénesis. A pesar de la gran cantidad de trabajos que describen distintos aspectos relacionados con el desarrollo de este órgano, permanecen abiertas muchas interrogantes, debido probablemente a que, desde el punto de vista molecular, faltan muchas piezas de un rompecabezas extremadamente complejo. En este trabajo nos propusimos la aplicación de una de las tecnologías más poderosas en el campo de la biología molecular, la generación de anticuerpos monoclonales (Acms), para intentar realizar una “disección inmunológica” de la RN. La aproximación experimental consistió en la inmunización de ratones con RN embrionaria de pollo y la fusión de las células esplénicas de dichos ratones con células inmortales derivadas de un mieloma. Así obtuvimos algunas líneas de hibridoma productoras de Acms que se unían específicamente a distintas estructuras de la retina.

Uno de estos anticuerpos, llamado 3C3 (IgG₁) resultó de interés especial. Encontramos que la señal dada por el Acm 3C3 en inmunofluorescencia varía enormemente su intensidad y su distribución espacial a lo largo de la ontogenia del pollo. En etapas tempranas, dicha señal apareció débil pero distribuida en casi todas las células del embrión. Al comenzar la diferenciación del tejido nervioso, observamos que la señal aumentaba en intensidad en las células con fenotipo neuronal, a la vez que disminuía drásticamente en otros tipos celulares, incluyendo a las células de Müller de la RN. Entre los 12 y los 16 días aproximadamente, el marcado fue máximo, extendiéndose homogéneamente en el espesor de la RN. Hacia el final del desarrollo embrionario y durante el desarrollo post-natal, la restricción de la señal aumentó, encontrándose solamente en las capas más internas de la RN y desapareciendo en forma prácticamente total en los fotorreceptores del pollo adulto. El patrón de distribución subcelular del epítipo reconocido por el Acm 3C3 apareció constante en todas estas etapas, en que observamos una distribución preferencialmente periférica. La caracterización bioquímica primaria del antígeno (Ag) 3C3 indica que se trataría de una proteína de un peso molecular aparente de 72000 y un punto isoeléctrico de 4.2. A juzgar por la única banda detectable en SDS-PAGE por el el Acm 3C3, éste parece reconocer solamente tal Ag. El Ag mostró una alta insolubilidad en tampón salino fisiológico y en solventes de lípidos, pero fue solubilizado por concentraciones relativamente bajas (hasta 0.05%) de Tritón X-100. El epítipo resultó muy sensible a tratamientos proteolíticos e insensible a la oxidación de glúcidos con periodato.

Finalmente, el ensayo por inmunofluorescencia del Acm 3C3 sobre cortes de ojo de otras especies de vertebrados mostró que el Ag debe ser relativamente conservado, ya

que encontramos reactividad cruzada en dos reptiles (tortuga y *Amphisbaena*) y un mamífero (cobayo), donde el patrón de distribución en la RN presentó similitudes con lo observado en el pollo.

INTRODUCCIÓN

1 - La retina neural

1.1 - Estructura general

Gracias a su ubicación, la retina neural (RN) de los vertebrados representa una porción muy accesible del sistema nervioso central. Esta ventaja ha favorecido grandes avances en el conocimiento de la estructura, función y desarrollo del órgano, incluso a nivel molecular. La RN está formada por un número limitado de tipos celulares que son relativamente conocidos morfológica y funcionalmente y que derivan de progenitores neuroepiteliales comunes (Altshuler y Cepko, 1992; Adler, 1993). De los siete tipos celulares principales, seis tienen un fenotipo neuronal, fotorreceptores (conos y bastones), células bipolares, células ganglionares, células horizontales y células amacrinas, y uno glial, las células de Müller (Ramón y Cajal, 1911; Kuwabara, 1983; Raviola, 1995). El que sean pocas y la ordenada disposición histológica de estas células y sus prolongaciones en capas bien delimitadas facilita su identificación y el seguimiento de linajes (Wetts y Fraser, 1988). Sobre la base de estudios electrofisiológicos y neuroquímicos, los tipos celulares descritos pueden ser, a su vez, divididos en subtipos con características diferentes (De Vries y Baylor, 1993; Kandel et al., 1995). Estas diferencias funcionales suelen correlacionarse con diferentes morfologías celulares (Kolb, 1994).

La RN de las aves presenta, además, ciertas características particulares. Por ejemplo, es totalmente avascular y todas las células que se encuentran en ella derivan del neuroepitelio (Romanoff, 1960). En retinas vascularizadas como las de la mayor parte de los mamíferos, se encuentran células inmigrantes, tales como los astrocitos (Watanabe y Raff, 1988). Si bien en las aves se ha descrito la inmigración de células fagocíticas en etapas tempranas del desarrollo, éstas permanecen sólo en forma muy transitoria (Cuadros et al., 1991). La RN de las aves es además más gruesa y sus capas son más conspicuas que en otros vertebrados (Romanoff, 1960), lo cual simplifica la localización de las distintas células y regiones en cortes histológicos. En cuanto a las células que la conforman, en las aves diurnas, los fotorreceptores son predominantemente conos, a diferencia de los mamíferos, donde predominan los bastones (Ramón y Cajal, 1911; Adler, 1993), mientras que las células ganglionares son más abundantes y diversas (Ramón y Cajal, 1911).

1.2 - Desarrollo

1.2.1 - Histogénesis

La retina se origina a partir de la vesícula óptica. Esta es una evaginación del diencéfalo que luego de contactar el ectodermo, donde induce la diferenciación de la placoda cristalínea, sufre una invaginación de su porción lateral. La luz de la vesícula óptica, continua con la cavidad ventricular del diencéfalo, termina obliterándose en forma prácticamente completa. La copa óptica resultante queda formada, entonces, por dos capas neuroepiteliales separadas por el delgado espacio ventricular o subretiniano. La capa más externa dará lugar al epitelio pigmentario de la retina (EPR), mientras que la interna forma, en su porción central, la RN. La porción marginal (el borde de la copa) origina el cuerpo ciliar y el iris (Romanoff, 1960).

La formación de los diferentes estratos celulares comienza en la región central o fúndica de la retina y avanza hacia la periferia. El crecimiento temprano de la retina se debe principalmente a la proliferación de las células más externas (o ventriculares). Algunas de estas células delaminan hacia la superficie vítrea y se diferencian, mientras que otras siguen proliferando. La mayor parte de los primeros neuroblastos originan células ganglionares, que empiezan a formar una capa distinguible hacia el cuarto día. La capa plexiforme interna empieza a hacerse visible a los 7 u 8 días y la externa, mucho más fina, aparece dos o tres días después. Hacia el día 10 se diferencian las células amacrinas, en el borde vítreo de la capa nuclear interna, mientras que en el borde ventricular, hacen lo propio las horizontales. Entre los días 10 y 12, también comienzan a diferenciarse los conos y bastones. Hacia el 12º día de incubación, entonces, la retina neural presenta ya una disposición de capas muy similar a la retina adulta y el principal cambio que puede observarse a partir de esta etapa es un crecimiento en espesor. Este crecimiento se debe en parte al gran desarrollo de las prolongaciones neuríticas, que lleva al aumento del espesor de las capas plexiformes y en parte al crecimiento de los segmentos externos de conos y bastones (Romanoff, 1960). En el pollo, la aparición de cada tipo celular se superpone a la de los demás, por lo cual no hay ningún estadio que se caracterice por la formación de un tipo celular determinado (Repka y Adler, 1992).

1.2.2 - Diferenciación celular

La diferenciación celular es un proceso muy complejo que implica la adquisición de características moleculares, funcionales y, generalmente, morfológicas por parte de las células que lo sufren. Estas características se adquieren en forma gradual durante el proceso, que para una neurona incluye varias etapas: una serie de divisiones mitóticas, una mitosis terminal, que marca su "nacimiento", la migración a una capa o región particular, la adquisición de un fenotipo diferenciado, de acuerdo a su posición y, finalmente, la conexión sináptica con otras células (Adler, 1993).

La diferenciación implica la regulación activa de los genes que codifican para las proteínas específicas de cada tipo celular. Esta regulación es mediada por factores de transcripción, y se conocen algunos de distribución particular en la RN. Uno de ellos es Islet-1 que, originalmente, fuera descrito en las motoneuronas espinales (Ericson et al., 1992) y que en la RN se encuentra en las células ganglionares y en algunas amacrinas (Galli-Resta et al., 1997).

Una de las primeras proteínas de diferenciación funcional que se describen en la RN en desarrollo es la proteína NF68, de neurofilamentos, donde comienza por expresarse en las células ganglionares. Algunas neuronas de la RN, tales como los fotorreceptores y las células amacrinas no expresan proteínas de neurofilamentos (Guillemot y Cepko, 1992), mientras otras como algunas horizontales, pueden expresar a la vez proteínas de neurofilamentos y vimentina, al menos en los roedores (Dräger, 1983).

Ya que en la RN coexisten varios tipos celulares distintos que se originan a partir de un mismo neuroepitelio indiferenciado, debe existir una regulación muy estricta del proceso de diferenciación, que asegure la generación de todos estos tipos celulares en una proporción correcta. Existen dudas respecto al momento de la determinación celular, es decir cuándo las células del neuroepitelio se comprometen a seguir una cierta vía de diferenciación. Hay dos hipótesis principales postuladas a este respecto, la primera propone que las células de la retina son determinadas hacia una vía de diferenciación antes de o durante la última división mitótica, mientras que la otra implica que las células se determinan más tarde, debido a señales dependientes de la posición que adoptan al migrar (Adler y Hatlee, 1989). La primera hipótesis implica, entonces, que las características de la descendencia de una célula progenitora ya están determinadas por un mecanismo conocido como "restricción de linaje", mientras que la segunda hipótesis implica una mayor plasticidad de las células, las cuales serían determinadas tardíamente, poco antes del momento en que comienzan a expresar el fenotipo diferenciado (Williams y Goldowitz, 1992a).

Se han intentado distintas aproximaciones a este problema. Una de ellas se basa en el seguimiento de linajes celulares. Los resultados encontrados por algunos autores (Price et al., 1987; Turner y Cepko, 1987; Wetts y Fraser, 1988; Wetts y Fraser, 1991) sugieren que en la RN la especificación de tipo celular ocurre tarde en el desarrollo, apoyando un rol importante del ambiente en la determinación celular. Utilizando una técnica diferente para seguir linajes celulares, Williams y Goldowitz (1992 a y b) sostienen, a la inversa, que la restricción de linajes es muy importante en la determinación celular en la RN. A pesar de sus interpretaciones contradictorias, en conjunto, estos trabajos han mostrado que los clones derivados de una célula precursora retiniana están compuestos por diversos tipos celulares que permanecen muy relacionados y ordenados radialmente en el espesor de la retina (Williams y Goldowitz, 1992b).

Otra aproximación muy utilizada es el cultivo de células de RN embrionaria, que permite el seguimiento directo de las células en diferenciación en un ambiente controlado. La hipótesis “ambiental” se basa en la premisa de que existen señales que, distribuidas heterogéneamente en el espesor de la RN, hacen que las células sean dirigidas hacia una u otra vía de diferenciación. Estas señales son extremadamente difíciles de analizar *in vivo*, razón por la cual suelen usarse cultivos de células de RN embrionaria, que permiten modificar fácilmente el entorno en el cual ocurre la diferenciación. Adler y Hatlee, por ejemplo (Adler y Hatlee, 1989), combinando técnicas de marcado con timidina tritiada ($^3\text{H-T}$) y ensayos de diferenciación *in vitro* de células de RN de pollo, encontraron que, si bien los fotorreceptores son uno de los últimos tipos celulares que se diferencian *in vivo*, aparecen en mayor proporción cuando se cultivan células post-mitóticas obtenidas de embriones más jóvenes, indicando que el microambiente retiniano condiciona el destino de las células luego de su nacimiento. Por otro lado, las células que sufren su última mitosis en cultivo, se diferencian principalmente en conos (Repka y Adler, 1992). Estos resultados indican, según los autores, que en la RN más interna existen señales inductoras y que las células que no llegan allí siguen una vía de diferenciación “por defecto” hacia el fenotipo fotorreceptor (Adler, 1993). En los roedores, sin embargo, se ha encontrado un efecto inverso en experimentos similares (Watanabe y Raff, 1992; Altshuler y Cepko, 1992). Tanto los trabajos de Raff como los de Cepko sugieren la existencia de una “actividad promotora de bastones”, que sería difusible y producida por células de RN de cualquier etapa en la cual ocurre diferenciación de fotorreceptores.

La aparente contradicción entre los resultados obtenidos en pollo y en rata puede deberse a que los cultivos fueron realizados en condiciones distintas, a que existen diferencias interespecíficas importantes, tales como que en la retina del pollo

predominan los conos y en la de la rata los bastones y, tal vez lo más importante, a las dificultades creadas por el bajo número de marcadores específicos de tipos celulares de que se dispone actualmente (Repka y Adler, 1992; Adler, 1993).

En los peces, el ojo, y, por lo tanto, la RN, crecen en forma constante. Esto hace que siempre existan células en diferenciación, lo que provee de un buen modelo para estudiar la determinación celular. En el pez *Carassius auratus*, por ejemplo, se encontró que los precursores de bastones, que se encuentran dispersos por toda la RN, no expresan rodopsina (detectada por el Acm rho 4D2, Hicks y Molday, 1986) hasta 3 o 4 días después de la última división mitótica (Knight y Raymond, 1990).

En algunos casos, el análisis del problema de la determinación celular mediante el uso de anticuerpos, ha mostrado, sin embargo, que existen marcadores específicos que se expresan tempranamente en células de la RN, sugiriendo la existencia de un cierto grado de restricción de linaje (Larison y BreMiller, 1990; Wikler y Rakic, 1991; Hernández-Sánchez et al., 1994; Waid y McLoon, 1995). Por ejemplo, Larison y BreMiller, inmunizando ratones con retinas fijadas de “zebrafish”, obtuvieron un Acm, FRet 43, que se une específicamente a los “conos dobles”, típicos de la retina de los peces. Este antígeno es detectable menos de tres horas después del “nacimiento” de los fotorreceptores (Larison y BreMiller, 1990). Por otro lado, Wikler y Rakic, usando Ac policlonales contra pigmentos visuales encontraron expresión precoz de pigmento verde/rojo en una pequeña proporción de conos en diferenciación. Esto sugiere, según los autores que la generación del mosaico requiere de la diferenciación primaria de unos pocos conos que señalarían la diferenciación de los demás en un patrón correcto (Wikler y Rakic, 1991).

Numerosas investigaciones han sido dedicadas a tratar de encontrar las posibles señales que puedan influir en la elección de una célula entre distintas vías de diferenciación. Todos estos datos, apoyan la hipótesis ambiental de la determinación celular, a la vez que sugieren una gran heterogeneidad molecular en la retina en desarrollo. Entre las moléculas descritas se encuentran factores difusibles (Cirillo et al., 1990; Faktorovich et al., 1990; Hageman et al., 1991; Guillemot y Cepko, 1992; Lillien y Cepko, 1992; Altshuler et al., 1993; Mudhar et al., 1993; Stenkamp et al., 1993; Arruti y Cirillo, 1995; Kelley et al., 1995; Lillien, 1995; Meyer-Franke et al., 1995; Hyatt et al., 1996; Neophytou et al., 1997), moléculas de adhesión celular (Hausman y Moscona, 1976; Brackenbury et al., 1977; Thiery et al., 1977; Buskirk et al., 1980; Schlosshauer et al., 1984; Lemmon y McLoon, 1986; Lagenauer y Lemmon, 1987; Thomas y Yancey, 1988; Vielmetter et al., 1991; Roark et al., 1992; Boxberg et al., 1993; Fadool y Linser, 1993; Austin et al., 1995; Holash y Pasquale, 1995; Kenny et al., 1995; Dorsky et al., 1995; Yin et al., 1995; Trisler et al., 1996; Ahmad et al., 1997; Brückner et al., 1997;

Holash et al., 1997; Zisch et al., 1997) y componentes de la matriz extracelular (Buskirk et al., 1980; Cohen et al., 1986; Reh et al., 1987; Cohen et al., 1989; Halfter, 1989; Hunter et al., 1989; Albini et al., 1992; Hunter et al., 1992; de Curtis y Reichardt, 1993; DeSimone, 1994).

Algunas evidencias indican incluso que las células podrían “reclutar” a proteínas con funciones variadas para funcionar como señales durante el desarrollo. Un ejemplo de esto en la RN está dado por la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Layer, 1983; Layer y Sporns, 1987; Reiss et al., 1996).

2 - Aplicación de la tecnología de los anticuerpos monoclonales al análisis de la heterogeneidad molecular de la RN

La complejidad propia de los sistemas en desarrollo hace generalmente difícil un análisis completo de procesos tales como la diferenciación celular y la morfogénesis. Esta complejidad se vuelve especialmente evidente cuando se intentan estudiar los mecanismos moleculares del desarrollo embrionario. La obtención de marcadores moleculares específicos es entonces fundamental para lograr un conocimiento más completo de un sistema tan complejo y heterogéneo como la retina en desarrollo. Uno de los procedimientos empleados para descubrir estos marcadores apela a las propiedades de los anticuerpos monoclonales (Acms).

2.1 - Generación de Acms :

La tecnología de los anticuerpos monoclonales, desarrollada a partir del trabajo inicial de Georges Köhler y César Milstein en 1975 (Köhler y Milstein, 1975), representa hoy en día una de las aplicaciones más relevantes de la biotecnología a la investigación básica en biología y química, más allá de su importancia indiscutible en la generación de poderosas armas de diagnóstico clínico y de representar en sí misma una excelente aproximación al estudio de problemas básicos en inmunología (Campbell, 1984; Abbas et al., 1991). Dada la importancia y amplia aplicación de esta tecnología, existen actualmente numerosas publicaciones y manuales que detallan sus principios y protocolos (Galfrè y Milstein, 1981; Løvborg, 1982; Goding, 1983; Campbell, 1984; Harlow y Lane, 1988; Liddell y Cryer, 1991)

El método habitual consiste en fusionar células linfoides, provenientes de un animal previamente inmunizado, con células de una línea celular inmortal, derivada de un mieloma. Originalmente, se usaron virus fusogénicos, como el Sendai, para mediar la fusión celular, pero actualmente se usan fusógenos químicos, como el polietilen-glicol (PEG) (Köhler y Milstein, 1975; Campbell, 1984). Idealmente, tanto la línea celular mielomatosa como las células linfoides normales son obtenidas de animales de la misma especie, y de una cepa congénica, como la cepa Balb/C de ratones. Esto permite la generación de tumores ascíticos en animales de dicha cepa, lo cual resulta ventajoso para la obtención de grandes cantidades de Acms, así como para eliminar, de ser necesario, eventuales microorganismos contaminantes de los cultivos celulares (en especial micoplasma). En ratones es relativamente fácil la inducción de mielomas, mediante la inyección de aceite mineral o pristane en la cavidad peritoneal (Goding,

1983; Campbell, 1984), pero suelen usarse líneas celulares estándar, que pueden conseguirse comercialmente. Estas líneas de mieloma están formadas por células B malignizadas que han perdido la capacidad de secretar Ac, tal como la línea P3-X63-Ag8.653 (Kearney et al., 1979).

De todos los eventos de fusión posibles, algunos (unos 100 cada 10^7 esplenocitos, Campbell, 1984) ocurren entre una célula B, productora de anticuerpos, y una célula de mieloma, con lo que se origina una línea celular inmortal ("hibridoma"), capaz de producir anticuerpos monoespecíficos. Las células de mieloma usadas normalmente tienen una mutación en la vía de síntesis de nucleótidos y, mediante la utilización de un medio de cultivo selectivo, se eliminan. La línea P3-X63-Ag8.653, como muchas otras de uso común, presenta una mutación en el gen que codifica para la enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) (Szibalsky, 1992). Las células normales del animal inmunizado que no se fusionan, por otro lado, tienen un período finito de vida en el medio de cultivo usado, por lo cual las células que sobreviven luego de algunos días son, obligatoriamente, híbridos. La mayor parte de las células híbridas son genéticamente inestables y no secretan o dejan de secretar anticuerpos o mueren poco después de generadas (Goding, 1983). Esto hace que de cada fusión se obtengan relativamente pocas líneas de hibridoma de producción estable y esto, sumado al hecho de que de estas líneas sólo unas pocas suelen secretar Acms de interés, habitualmente obliga a que se deban repetir los eventos de fusión varias veces antes de obtener resultados satisfactorios.

Recientemente, la tecnología del ADN recombinante ha sido aplicada a la expresión de segmentos activos de anticuerpos monoclonales en bacterias y/o bacteriófagos, los cuales pueden ser entonces modificados y seleccionados *in vitro* de un modo controlado, creando anticuerpos que pueden ser difíciles e incluso imposibles de obtener por inmunización (Winter, 1993; Skerra, 1993; Griffiths, 1993; Hoogenboom et al., 1993)

2.2 - Los Acms como herramientas:

De los tres tipos de moléculas que usa el sistema inmune de los vertebrados para reconocer específicamente los antígenos, los anticuerpos son los que reconocen un espectro mayor de moléculas, además de ser más eficientes en la discriminación entre Ags diferentes y unirse más fuertemente a los Ags (Abbas et al., 1991).

Estas características hacen de los anticuerpos herramientas muy poderosas para analizar la composición molecular de células y tejidos. Como la tecnología de los Acms

permite aislar clones de células de hibridoma que secretan un solo Ac monoespecífico, es posible analizar la presencia y distribución de un Ag en células y/o tejidos con mucha precisión. Si bien en muchos casos esto es posible con anticuerpos policlonales (Acps), éstos presentan el problema de reconocer muchos determinantes antigénicos a la misma vez, muchos de los cuales pueden no encontrarse en la molécula de interés con el resultado de que las señales obtenidas son ruidosas. Además, los Acms, a diferencia de los Acps, pueden ser producidos en grandes cantidades, durante todo el tiempo que sea necesario (Campbell, 1984).

2.2.1 – Disección inmunológica

Como fue expresado anteriormente, los Acms pueden ser usados para realizar verdaderas “disecciones moleculares inmunológicas” de las células y tejidos, ya que es posible inmunizar un animal con una mezcla de Ags muy compleja, tal como la derivada de un órgano entero y, de todas maneras, obtener hibridomas productores de Acs monoespecíficos. De esta forma es posible encontrar nuevas moléculas, que pueden tener una distribución y/o función particulares dentro de ese órgano. Esta aproximación ha sido muy usada con este fin y cuando un nuevo Ag descubierto de esta manera es una proteína, se puede aplicar la llamada “genética reversa” para llegar a analizar el gen que la codifica (Gilbert, 1997).

Uno de los inconvenientes es que, en una respuesta inmune normal, el animal inmunizado no genera Acs contra todas las moléculas por igual. Dentro de una mezcla molecularmente compleja suelen existir algunos Ags, llamados “inmunodominantes” contra los cuales se generan la mayor parte de los Acs. Muchas moléculas propias de un tejido u órgano pueden no ser inmunodominantes, con lo cual se hace muy difícil obtener Acms que las reconozcan. Este problema ha sido solucionado por la aparición de los métodos de “inmunización diferencial”, de los cuales existen dos principales. Uno de ellos utiliza el mecanismo natural de generación de tolerancia hacia antígenos propios (Hockfield, 1987). En este caso, los ratones son inoculados en los primeros días después del nacimiento con un tejido apenas diferente de aquel con el que se inmunizará más adelante. De este modo, los animales desarrollan tolerancia hacia la mayor parte de los antígenos, excepto hacia aquéllos que diferencian al tejido de interés del otro. El segundo método (Mathew y Sandrock, 1987) se basa en un principio similar, con la diferencia que el primer tejido se inyecta ya en animales adultos, generándose una respuesta inmune normal. Se usa entonces una droga inmunosupresora, como la ciclofosfamida, para eliminar todas las células que responden

a esta primera inmunización. Luego, se hace una segunda inmunización con el tejido de interés. Teóricamente, la mayor parte de las células que podían responder a Ags inmunodominantes ya fueron eliminadas y la segunda respuesta es dirigida hacia los Ags que diferencian al segundo tejido del primero. Ambos métodos fueron aplicados a la obtención de Acms contra antígenos de la RN. Por ejemplo, el Acm RA5 fue obtenido aplicando el primer método (McLoon, 1991), mientras que el Acm RA4, del mismo autor, fue obtenido por la aplicación del segundo (McLoon y Barnes, 1989) (ver más adelante).

2.2.2 - Otras aplicaciones de los Acms al análisis del desarrollo embrionario:

Dado el grado de especificidad que se puede lograr, los Acms son especialmente adecuados para caracterizar la molécula a la cual se unen, en cuanto a su localización, estructura y función (Harlow y Lane, 1988).

Si un Acm reconoce un determinante antigénico extracelular de un Ag superficial, puede ser utilizado para bloquear la actividad de éste en células en cultivo o incluso en embriones vivos, determinando así aspectos funcionales del antígeno (Jaffredo et al., 1988; Rohrer et al., 1988; Finnegan et al., 1993). Lamentablemente, la mayor parte de los Acms no es capaz de bloquear la función de su Ag, pero una técnica recientemente desarrollada, la "inactivación láser asistida por cromóforo", o CALI (Jay, 1988; Müller y Bonhoeffer, 1995), hace que con prácticamente cualquier Acm se pueda alcanzar este objetivo, ya que basta con que el Ac se una al Ag. Esta técnica puede ser aplicada incluso en embriones vivos (Schmucker et al., 1994). Cuando el determinante antigénico es intracelular, se puede intentar introducir el Acm en las células mediante microinyección o electroporación (Marrero et al., 1995).

Además de permitir el análisis de los Ags, los Acms pueden tener otras aplicaciones de interés básico, como, nuevamente en el caso de que reconozcan determinantes antigénicos extracelulares en Ags de superficie, la obtención de un cultivo de un tipo celular en particular, con una pureza muy alta mediante el método de "inmunopanning" (Camu y Henderson, 1992; Meyer-Franke et al., 1995), o la eliminación de un grupo de células específico *in vivo* o *in vitro*, usando las proteínas del complemento (Sretavan et al., 1995).

2.3 - Anticuerpos monoclonales contra antígenos de RN:

Los anticuerpos representan entonces una herramienta molecular poderosísima y, de hecho, han sido utilizados ampliamente para enfrentar el problema de la complejidad de los tejidos vivos, incluidos el sistema nervioso central (Zipser y McKay, 1981; Hawkes et al., 1982; McKay y Hockfield, 1982; Hockfield y McKay, 1983; Rougon et al., 1984; Hatta et al., 1985; Hockfield, 1987; Rösner et al., 1988) y la retina (Barnstable, 1980; Lemmon y Gottlieb, 1982; Grunwald et al., 1985; Cole et al., 1986; Fry y Lam, 1986; Sinclair et al., 1986; McLoon y Barnes, 1989; Larison y BreMiller, 1990; Rabacchi et al., 1990; McLoon, 1991; Schlosshauer y Wild, 1991; Vielmetter et al., 1991; Arikawa et al., 1992; Fadool y Linser, 1993; Schlosshauer et al., 1993; Hernández-Sánchez et al., 1994; Ring et al., 1995; Schlosshauer et al., 1997; Schulte et al., 1997). La tabla 1 muestra una lista de algunos de los Acms descritos en la literatura que reconocen Acs de la RN.

Muchas moléculas de importancia en el desarrollo del sistema nervioso central y la RN han sido descubiertas aplicando la tecnología de los Acms para realizar una disección inmunológica de los tejidos. Gran parte de ellas tienen una función en la adhesión intercelular, como la N-cadherina, reconocida por un Acm generado contra células del SNC (Hatta et al., 1985). Esta molécula de adhesión celular se expresa en la copa óptica y la RN en desarrollo y favorece la formación de agregados histotípicos de células embrionarias de RN *in vitro* (Roark et al., 1992).

Las moléculas que median la interacción célula-célula son especialmente importantes en la neuritogénesis y muchos de los antígenos específicos de células ganglionares que fueron hallados usando esta aproximación se encuentran exclusivamente en el axón. El antígeno reconocido por el Acm 8D9, por ejemplo, que es una molécula similar a L1 y Ng-CAM, moléculas de adhesión celular propias de las neuronas y pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, se encuentra en las regiones de la vía óptica donde existe fasciculación y es capaz de estimular el crecimiento neurítico (Lemmon y McLoon, 1986; Lagenauer y Lemmon, 1987).

En la RN del pez *Carassius auratus* se han identificado varias proteínas de superficie celular que son expresadas en los axones de células ganglionares recién formadas o en regeneración, reconocidas por Acms, tales como el Acm E587, que se une a una glucoproteína de 200 KDa, al parecer similar a proteínas de adhesión celular de la familia de las inmunoglobulinas (Vielmetter et al., 1991) y el Acm M802, que reconoce dos proteínas muy similares entre sí denominadas reggie-1 y reggie-2 (Schulte et al., 1997).

Otro Ag de superficie propio de células ganglionares es Thy-1 (Sinclair et al., 1986; Sheppard et al., 1988). En embrión de pollo, Thy-1 parece expresarse solamente en células ganglionares, pero en experimentos de transección del nervio óptico en rata, aparece su expresión en algunas células amacrinas y bipolares.

La función de estas moléculas puede ser demostrada si se dispone de un Ac capaz, por sí mismo, de modificar el comportamiento de las células. Tal es el caso del Acm 8A2, que reconoce un Ag superficial de axones de células ganglionares de *C. auratus*, y es capaz de inducir la retracción de axones en regeneración, al parecer por un mecanismo dependiente de la fosforilación de proteínas en residuos tirosina (Finnegan et al., 1993), mostrando la importancia del Ag en el crecimiento axonal. Por otro lado, las moléculas de adhesión celular pueden actuar directamente como señales para la diferenciación celular. Un ejemplo es el antígeno 5A11/HT7, una glucoproteína de superficie de células de Müller perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que fuera identificada mediante la generación de Acms contra células de RN de embrión de pollo de 7 días (Fadool y Linser, 1993). El Acm 5A11 es capaz de inhibir la reagregación de células de RN y la maduración de las células de Müller *in vitro*.

Esta aproximación también ha permitido encontrar moléculas que tienen una distribución desigual en el plano de la RN, según los ejes dorso-ventral o naso-temporal, o desde el centro hacia la periferia y que podrían actuar, por lo tanto, como un sistema de señalización en dos dimensiones. El Ag TRAP (“temporal retinal axon protein”), por ejemplo, que es reconocido por el Acm RA5 (McLoon, 1991), se encuentra en los axones de células ganglionares de pollo desde su formación (E3) y a partir de E6 es evidente su restricción a los axones temporales, con una transición abrupta en el límite con la región nasal (en la línea de la fisura coroidea). Otra molécula que presenta un gradiente en el mismo sentido es la proteína transmembranaria TOP_{AP}, también encontrada en pollo (Savitt et al., 1995). Rabacchi y colaboradores obtuvieron dos Acms, Dolce y Jula, que reconocen solamente la región dorsal de la RN en varias especies, incluido el pollo (Rabacchi et al., 1990).

Nombre del Acm	Nombre del Antígeno	Células o estructuras marcadas	Especie	Referencia
BSJ-1	Thy-1	CG	Pollo	Sinclair et al., 1986
Dolce Julia	Rec. de lamina de 68 K	RN dorsal	Varias	Rabacchi et al., 1990
E587	Prot. 200 KD	CG con axones en crecimiento	<i>C. auratus</i>	Vielmetter et al., 1991
FRet 43		Conos dobles	Zebrafish	Larison y BreMiller, 1990
M802	reggie-1, -2	CG con axones en crecimiento.	<i>C. auratus</i>	Schulte et al., 1997
PM1		Algunas cél. neuroepit. CG	Pollo	Hernández-Sánchez et al., 1994
RA4		CG	Pollo	McLoon y Barnes, 1989
RA5	TRAP	Axones CG temporales	Pollo	McLoon, 1991
RET-P1		F	Rata	Barnstable, 1980
RET-P2		Segmentos ext. F	Rata	Barnstable, 1980
RET-P3		Somas F	Rata	Barnstable, 1980
RET-G1		CM	Rata	Barnstable, 1980
RET-G2		CM	Rata	Barnstable, 1980
RET-G3		CM	Rata	Barnstable, 1980
RET-N1		Neu	Rata	Barnstable, 1980
1B11 6C4	Proteo-heparán sulfato	MLI	Pollo	Halfter y Schurer, 1994
2A10		Neu. Gradiente radial Int-Ext	Pollo	Schlosshauer et al., 1993
3A3 3A12 6D2 9E10	Proteo-heparán sulfato	MLI	Pollo	Halfter, 1993
3D10	AChE, globul.	Neu. Sub-láminas de PI	Pollo	Reiss et al., 1996
4D2	Rodopsina	F	Bovino	Hicks y Molday, 1986
5A11	5A11/HT7	CM	Pollo	Fadool y Linser, 1993
6B6	AChE, colág.	Neu. Sub-láminas de PI	Pollo	Reiss et al., 1996
8A2	Gangliósidos	Axones CG en crecimiento	Pollo <i>C. auratus</i>	Drazba et al., 1991 Finnegan et al., 1993
8D9	L1/Ng-CAM	Axones en fasciculación	Pollo	Lagenauer y Lemmon, 1987
9BA12	9BA12 CSPG	FNO	Pollo	Ring et al., 1995
18B8	Gangliósidos	PE, PI, Segmentos ext. F	Pollo	Grunwald et al., 1985
94C2		CG y CA	Pollo, Cod.	Trisler et al., 1996
96B11		CM	Pollo, Cod.	Trisler et al., 1996
105E2		CM	Pollo, Cod.	Trisler et al., 1996

Tabla 1: Algunos Acms generados contra RN o que reconocen alguna estructura particular en ésta.

AChE, acetilcolinesterasa; *CG*, células ganglionares; *CM*, células de Müller; *F*, fotorreceptores; *FNO*, capa de fibras del nervio óptico; *MLI*, membrana limitante interna; *Neu*, neuronas; *PE*, plexiforme externa; *PI*, plexiforme interna; *RN*, retina neural.

A pesar de que existe una gran cantidad de moléculas diferentes descritas en la RN, parecen ser insuficientes para analizar los procesos moleculares que intervienen en el desarrollo del órgano. Esto demuestra su enorme complejidad molecular e indica la importancia de intentar aumentar el número de estos marcadores. De todas las aproximaciones posibles a este problema, la generación de Acms tiene varias ventajas relevantes. Entre ellas, los Acms pueden reconocer muchas moléculas activas en distintos procesos celulares, tales como proteínas y otras moléculas que no son accesibles a las técnicas de genética molecular (ej.: lípidos y polisacáridos), muchas de las cuales pueden cumplir roles muy importantes en el desarrollo embrionario. Esto nos motivó a utilizar la tecnología de los Acms para diseccionar molecularmente la RN del pollo.

El principal objetivo de este trabajo de maestría fue obtener uno o más Acms, que reconocieran antígenos cuyas particularidades los hicieran posibles herramientas para analizar el desarrollo de la retina neural del pollo. Nos dirigimos esencialmente a la obtención de Acms que pudieran ser usados en ensayos de reconocimiento *in situ*, y/o que permitieran analizar fenómenos de regulación y control de diferenciación celular. Finalmente, pretendimos, además, caracterizar al menos en forma parcial, el o los Acms de mayor interés y los antígenos reconocidos por ellos.

RESULTADOS

1 - Obtención de anticuerpos monoclonales contra antígenos de RN:

En el transcurso de este trabajo realizamos un total de cuatro fusiones. Para las dos primeras, inmunizamos un lote de ratones según el protocolo descrito en Materiales y Métodos, con una RN fresca de embrión de pollo de E11-12 en cada inoculación. Luego de la fusión, sembramos las células a razón de 3.0×10^5 células por pocillo (fusión “en masa”), en placas de 96 pocillos y sin utilizar células “feeder”. En ambos casos realizamos el screening primario por la técnica de ELISA sobre células de RN de embriones de E13-15. Luego analizamos por inmunofluorescencia indirecta sobre cortes a congelación de ojos no fijados de embrión de pollo de E15 los sobrenadantes de cultivo que dieron una señal detectable en ELISA. No obtuvimos hibridomas estables que secretaran Acms de interés en ninguna de estas dos fusiones.

Para las dos siguientes, modificamos el protocolo de inmunización, la densidad de siembra de las células tras la fusión y el método usado para el screening primario. En este caso, inoculamos con el equivalente a una RN de embrión de pollo de E11-12 dos lotes de ratones, uno con RN fijada en paraformaldehído (PFA) al 4% y homogeneizada por sonicación y el otro con RN fresca, como describimos en Materiales y Métodos. Al igual que en las fusiones anteriores, seguimos la respuesta de anticuerpos en suero sanguíneo de los animales por ELISA sobre células de RN de embrión de pollo (E13-15) (Fig. 1). La mejor respuesta la obtuvimos en aquellos ratones que inmunizamos con RN fijada y homogeneizada, junto con adyuvante de Freund, por lo cual fueron los que utilizamos para estas fusiones. Por otro lado, también analizamos el suero por inmunofluorescencia indirecta sobre cortes (de ojos de pollo de E14 no fijados), donde obtuvimos una señal muy intensa en todos los tejidos del ojo, incluso tras diluciones importantes (1/250).

Sembramos las células en placas de 96 pocillos, a razón de 3×10^4 células por pocillo (“fusión-clonaje”), junto con células feeder obtenidas de bazo de ratón no inmunizado. Como resultado de esta dilución observamos crecimiento inicial de híbridos en unos 10 pocillos de cada placa de 96, en promedio. Realizamos el screening primario mediante inmunofluorescencia sobre cortes a congelación de ojos enteros, sin fijar, de embriones de E14, lo cual permitió conocer inmediatamente cuáles híbridos secretaban Acms de interés.

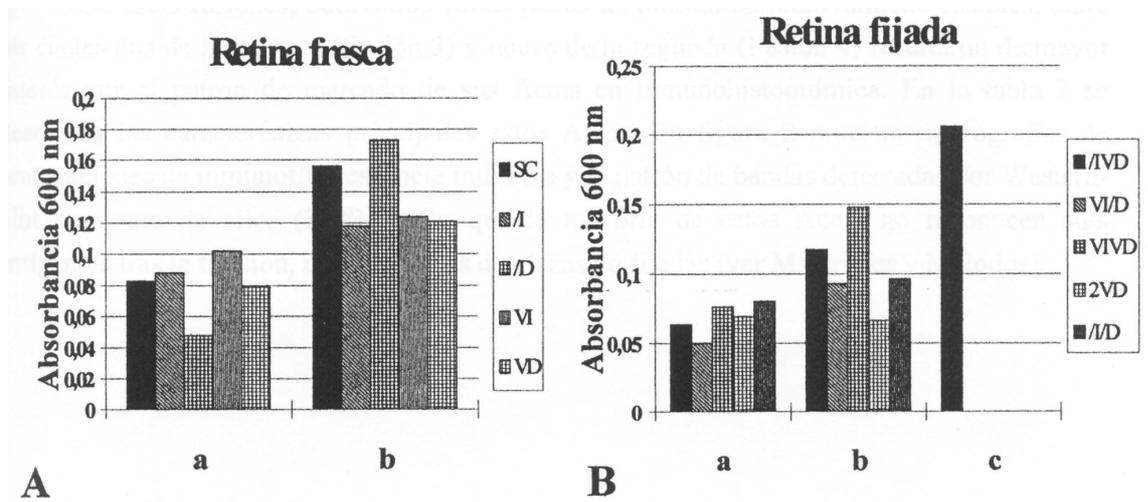


Figura 1: Respuesta inmune de los ratones inmunizados para las últimas fusiones. Los gráficos representan la absorbancia (medida por ELISA sobre células de RN) de las muestras de suero (cada barra representa la respuesta individual de un ratón). A, ratones inmunizados con RN fresca; medidas de muestras tomadas 0 (a) y 9 (b) días después de la primera inoculación de Ag (la segunda inoculación fue a los 7 días). B, ratones inmunizados con RN fijada; medidas a 0 (a), 8 (b) y 21 (c) días.

Nota: Algunos de los ratones de este lote (/IVD, VI/D y VIVD) fueron inoculados con Ag junto con adyuvante de Freund y los dos restantes (/I/D) y 2VD) recibieron solamente el Ag. En la tercera fusión utilizamos el ratón VIVD, que recibió solamente una inoculación más, previo a la fusión y en la cuarta, /IVD, el cual recibió dos inoculaciones más.

De estas fusiones, obtuvimos varias líneas de hibridoma relativamente estables, entre las cuales dos de la primera (Fusión 3) y nueve de la segunda (Fusión 4) resultaron de mayor interés por el patrón de marcado de sus Acms en inmunohistoquímica. En la tabla 2 se describen las características principales estos Acms. La figura 2 muestra micrografías de preparaciones de inmunofluorescencia indirecta y el patrón de bandas detectadas por Western-blot para uno de ellos (2H8). Dado que la mayoría de estos Acms no reconocen su/s antígeno/s tras la fijación, usamos cortes de piezas no fijadas (ver Materiales y Métodos).

<u>NOMBRE DEL ACM</u>	<u>FUSIÓN</u>	<u>CÉLULAS Y/O ESTRUCTURAS MARCADAS</u>
2H8	3	MLI. Membranas basales en general.
8C9	3	Láminas de la RN.
1D6	4	MLI. Epitelio de conjuntiva.
2H4	4	Patrón fibrilar y/o reticular en tejido conjuntivo (Ej.: coroides).
3C3	4	Neuronas.
3C7	4	Fibras musculares esqueléticas aisladas.
3E8	4	Fibras radiales en RN (posiblemente células de Müller).
4F4	4	Membrana basal del cuerpo ciliar.
7H1	4	Membrana basal del cuerpo ciliar. Pericondrio. Epitelio de la córnea.
8D12	4	Fibras radiales en RN (posiblemente células de Müller).
10C7	4	Fibras radiales en RN (posiblemente células de Müller).

Tabla 2: Estructuras oculares marcadas por diferentes Acms. Inmunolocalización in situ con algunos Acms obtenidos sobre cortes de ojo no fijado de embriones de pollo de E14-15.

MLI, membrana limitante interna; RN, retina neural.

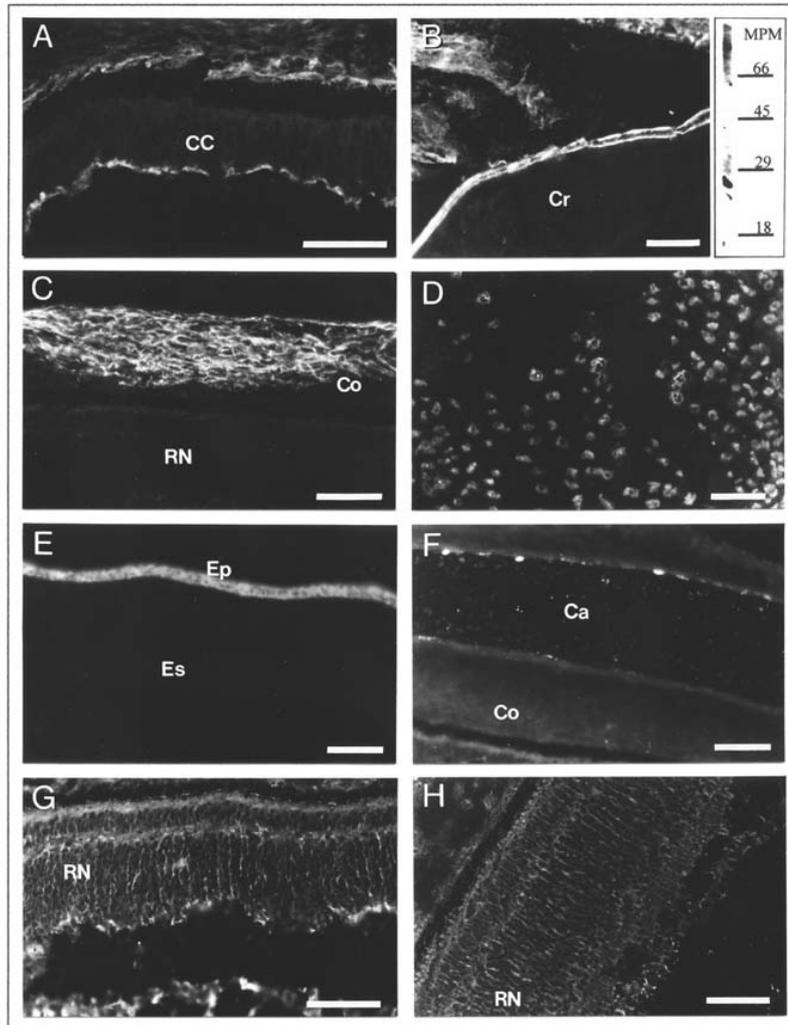


Figura 2: Inmunodetección con algunos de los Acms generados. A y B, Acm 2H8; A, corte de ojo de E15 a nivel del cuerpo ciliar, la señal aparece en la lámina basal del epitelio del cuerpo ciliar; B, izquierda, mismo corte a nivel del cristalino, donde la cápsula aparece intensamente marcada y derecha, Western-blot sobre una muestra de RN de E12. C, Acm 2H4, corte similar a A y B, a nivel de la coroides, el Ac marca filamentos de disposición reticular en el tejido conjuntivo. D, Acm 3C7, corte transversal de músculo estriado esquelético, notar las fibras positivas distribuidas entre otras negativas. E y F, Acm 7H1; E, a nivel de la córnea, donde marca solamente el epitelio; F, a nivel del cartilago de la esclerótica, donde se observa señal en el pericondrio. G, Acm 8D12, a nivel de la RN, la marca se observa sobre fibras de disposición radial, con morfología y distribución similar a las células de Müller. H, Acm 10C7, a nivel de la RN, la señal dada por este Ac es muy similar a la del Acm 8D12.

El marcado *in situ* fue realizado por inmunofluorescencia indirecta sobre cortes a congelación de ojos de pollo de E15, no fijados.

Ca, cartilago; CC, cuerpo ciliar; Co, coroides; Cr, cristalino; Ep, epitelio corneano; Es, estroma corneano; MPM, marcadores de peso molecular; RN, retina neural.

Barras: 60 μ m.

2 - Caracterización del Acm 3C3

Tras haber clonado y congelado en cantidad suficiente los demás hibridomas, nos dedicamos a analizar en profundidad el Acm 3C3, secretado por el hibridoma del mismo nombre, que fuera obtenido en la última fusión. Este Acm presentó desde el primer momento ciertas características que lo hicieron interesante para nuestro trabajo, tal como marcar solamente la RN en cortes de ojo de E14. La señal dada en inmunofluorescencia por este Acm fue de una gran intensidad, comparada con la de otros Acms obtenidos. Además, el hibridoma 3C3 presentó en todo momento una elevada capacidad de crecimiento *in vitro* y en ascitis, así como una alta sobrevivencia tras manipulaciones traumáticas para las células tales como el sub-clonado por dilución límite y la congelación en nitrógeno líquido.

El análisis de isotipo mediante Acs de cabra específicos para clases y subclases de IgG de ratón mostró, tanto en cortes de ojo (no mostrado) como en Western-blot sobre muestras de RN de embrión de pollo, que el Acm 3C3 es una IgG₁ (Fig. 3A).

La purificación por afinidad del Acm 3C3 a partir de sobrenadante de cultivo (DMEM con 10% SFB), resultó muy exitosa utilizando una columna de proteína G acoplada a sefarosa. De 1 l de sobrenadante (aproximadamente), obtuvimos unos 24 mg de Acm, valor estimado a partir de la medida de la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas (Fig. 4). En inmunofluorescencia, el Ac purificado dio una señal similar al sobrenadante de cultivo puro en una dilución de 1/3200 (no mostrado). El grado de pureza del Acm 3C3 en las fracciones eluidas fue determinado por SDS-PAGE, tiñendo con Azul Brillante de Coomasie R250 (CBB) (Fig. 3B). La inmunodetección por Western-blot, con un Ac conjugado a peroxidasa (Fig. 3C), demostró que todas las bandas visibles en CBB corresponden al Ac. El patrón de bandas observado por ambos métodos es el típico de un Acm de tipo IgG, ya que las cadenas pesadas presentaron una Mr correspondiente a una proteína de unos 50 KDa.

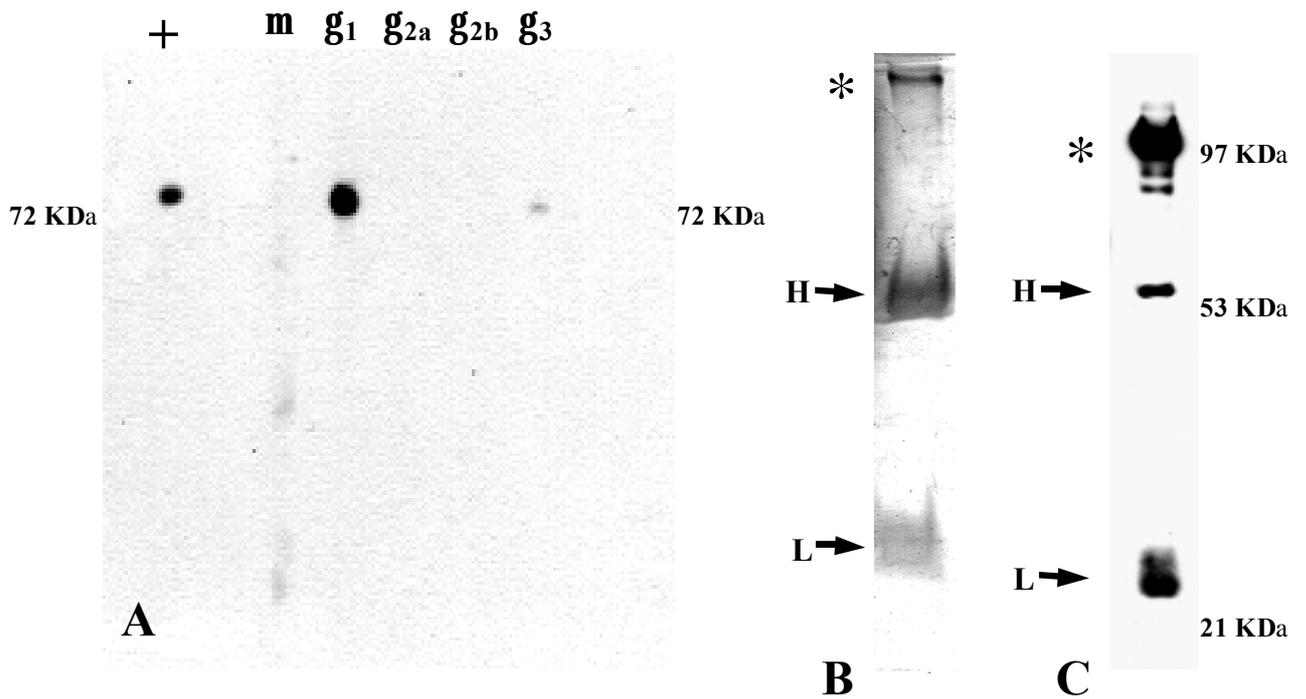


Figura 3: Caracterización primaria del Acm 3C3. A, Western-blot sobre muestras de RN embrionaria de pollo; el Acm 3C3 unido a su Ag está detectado con Acs anti clases y subclases de cadenas pesadas de inmunoglobulinas. El Ac primario fue líquido ascítico de hibridoma 3C3, diluido $1/100$. B, SDS-PAGE del Acm 3C3 purificado por afinidad (carga aproximada: 10 μ g) teñido con Azul Brillante de Coomasie R250. C, inmunodetección directa por Western-blot del Acm 3C3 purificado, usando un Ac anti Ig de ratón conjugado a peroxidasa.

(+), control positivo (usando un Ac anti cadenas pesadas y livianas en general como secundario); (), control negativo (usando sobrenadante de cultivo de mieloma como Ac primario); **g₁**, **g_{2a}**, **g_{2b}**, **g₃** y **m** membranas donde usamos un Ac específico para clases y subclases de cadenas pesadas de Igs; H, cadena pesada; L, cadena liviana; la banda señalada con un asterisco (*) en B y C, se podría explicar por la disociación incompleta de las cadenas pesadas de Ig.

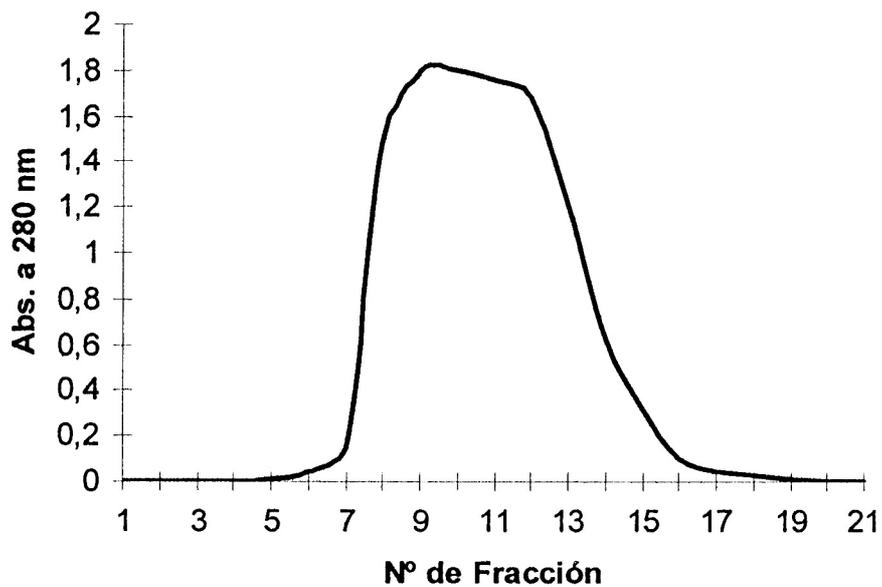


Figura 4: Purificación del Acm 3C3 presente en el medio de cultivo del hibridoma. Absorbancia a 280 nm de las fracciones colectadas durante la elución de una columna de proteína G acoplada a sefarosa (cada fracción fue de 1 ml).

3 - Análisis del patrón de marcado del Acm 3C3 por inmunohistoquímica:

Las exploraciones preliminares acerca de condiciones de fijación y procesamiento ulterior de las piezas de tejido mostraron que el Acm 3C3 resultaba muy adecuado para estudios con inmunohistoquímica, ya que reconoció a su epítotope incluso en cortes de piezas fijadas durante tiempos prolongados. En distintos ensayos, dio una señal fuerte sobre cortes a congelación de piezas fijadas con PFA al 4% e incluso por perfusión con una mezcla de PFA y glutaraldehído, así como de piezas incluidas en parafina según procedimientos convencionales.

3.1 - Distribución espacial del marcado por 3C3 en la RN del pollo adulto:

En la RN adulta (pollo de 2 meses de edad, P60), el Acm 3C3 marcó distintas capas en forma diferencial. La señal apareció restringida a la porción interna de la RN, incluyendo capa de fibras del nervio óptico, capa de células ganglionares, capa plexiforme interna y algunas células situadas en la región más interna de la nuclear interna. Entre estas capas, además, la señal no apareció distribuida en forma homogénea, ya que presentó una intensidad notablemente mayor en la plexiforme interna. Es de destacar que en esta capa la señal resultó más débil en al menos algunas de sus subláminas. En los somas neuronales marcados, la señal está en la periferia, localizada en parches pequeños, de distribución, forma y tamaño más o menos irregulares. El resto de la RN y, muy notoriamente, los fotorreceptores (en toda su extensión), no se marcaron con 3C3 (Fig. 5).

La señal apareció extendida por todo el plano de la RN, cesando abruptamente en el límite con el cuerpo ciliar (*ora serrata*), como se puede apreciar en la figura 5E.

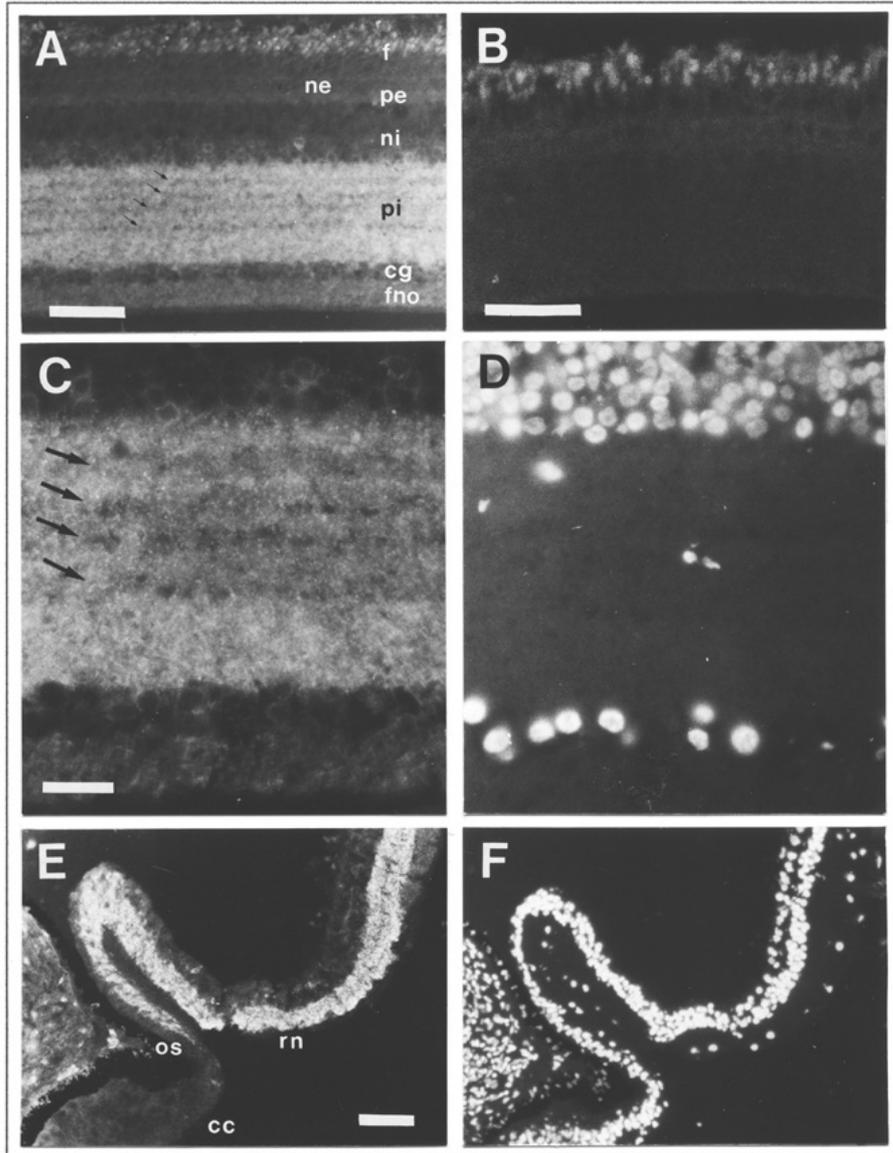


Figura 5: Regiones de RN diferenciada marcadas con el Acm 3C3. A, inmunofluorescencia indirecta con el Acm 3C3 sobre un corte de ojo de pollo de 2 meses, a nivel de la región central de la RN. B, control negativo (corte similar, en una porción algo más periférica de la RN), observar la intensa autofluorescencia de los fotorreceptores. C y D, mismo corte que en A a mayor aumento, mostrando las capas más internas de la RN; C, marcado con el Acm 3C3; D, Hoechst 33342. E y F, región periférica de la RN, incluyendo la ora serrata y el cuerpo ciliar; E, Acm 3C3; F, Hoechst 33342.

Todas las imágenes son de cortes a congelación de piezas fijadas en PFA al 4%.

cc, cuerpo ciliar; cg, células ganglionares; f, capa de fotorreceptores; fno, fibras del nervio óptico; ne, nuclear externa; ni, nuclear interna; os, ora serrata; pe, plexiforme externa; pi, plexiforme interna. Flechas: sub-láminas de la PI donde la señal de 3C3 es menor.

Barras: A, B, E y F, 60 μ m; C y para D, 20 μ m.

3.2 - Expresión del epítoto 3C3 durante el primer tercio del desarrollo embrionario

En el desarrollo el Acm 3C3 mostró grandes cambios en la distribución de su marca. En las primeras etapas del desarrollo (entre los 2 y 6 días de incubación, aproximadamente), dio una señal extendida sobre las células de casi todos los tejidos indiferenciados. Así, pudimos encontrar células positivas en el mesénquima, ectodermo y endodermo, tanto embrionarios como extraembrionarios, además del neuroepitelio del tubo neural y las vesículas encefálicas. No apreciamos ninguna diferencia entre la intensidad de marca de las células neuroepiteliales y el resto de las células del embrión. El patrón subcelular de marcado también fue similar entre estas células indiferenciadas y las de la RN diferenciada, ya que en todas observamos una señal periférica, distribuida en pequeños parches irregulares. En el neuroepitelio, la señal aparentó ser mucho más fuerte en algunas células redondeadas del borde endodermico o ventricular, donde la señal parecía extenderse incluso hacia el interior celular. En los demás tejidos (ectodermo, endodermo, mesénquima) también encontramos células con mayor señal que otras, que presentaron un aspecto similar a las neuroepiteliales. Es muy interesante el hecho de que la única estructura embrionaria primitiva que no mostró una señal evidente fue la notocorda (Fig. 6).

3.3 - Distribución de la señal del Acm 3C3 en el desarrollo de la RN:

En etapas muy tempranas del desarrollo ocular, en la vesícula y copa óptica, todas las células neuroepiteliales indiferenciadas se marcaron por igual, con una señal relativamente débil, muy similar a la del resto de las células del tubo neural (no mostrado).

Luego de comenzar la diferenciación en la RN, observamos un aumento importante de señal en las primeras neuronas en diferenciación (las células ganglionares). Esto fue evidente en E5-6 en los axones en crecimiento que estaban formando la capa de fibras del nervio óptico. A partir de este momento, empezó a ser evidente la diferencia en el patrón de marcado entre la retina central, donde ocurre esta diferenciación celular y la periferia, donde ésta tiene lugar más tarde. La señal resultó ser mucho más intensa en la región central que en la periferia de la RN. De hecho, las células neuroepiteliales indiferenciadas del borde de la copa óptica mostraron un patrón de marcado muy similar al del tubo neural temprano (Fig. 7A). Aquí también

observamos una señal aparentemente más intensa en las células del borde ventricular. El marcado con un colorante fluorescente para ADN como el Hoechst 33342 mostró que, al menos algunas de ellas, eran células mitóticas (Fig. 7B y C).

La señal de 3C3 fue máxima en la RN de embriones de 12 a 16 días (Fig. 8), donde observamos una marca muy intensa en todas las capas, desde la de fibras del nervio óptico hasta la de fotorreceptores, cuando ésta aparece (alrededor de E14) (Fig. 8B y D). A partir de E14-15, apreciamos la aparición de unas bandas delgadas en la plexiforme interna, que presentaron una señal mucho menor al resto de la capa. Pudimos distinguir la membrana limitante externa como una línea negativa muy delgada, separando la nuclear externa de la capa de fotorreceptores (Fig. 8D). Es interesante que en estas etapas embrionarias, los segmentos externos de los fotorreceptores en formación mostraron una señal intensa, similar a la del resto de las capas de la RN (Fig. 8A y B). Por otro lado, el límite periférico de la RN (la *ora serrata*) apareció bien definido por una caída abrupta en la señal de 3C3 (Fig. 8C).

A partir de E18 fue notoria la disminución de señal en las capas más externas de la RN, especialmente en la capa de fotorreceptores. También observamos una disminución en la nuclear externa, en la plexiforme externa y en la porción externa de la nuclear interna (Fig. 8E).

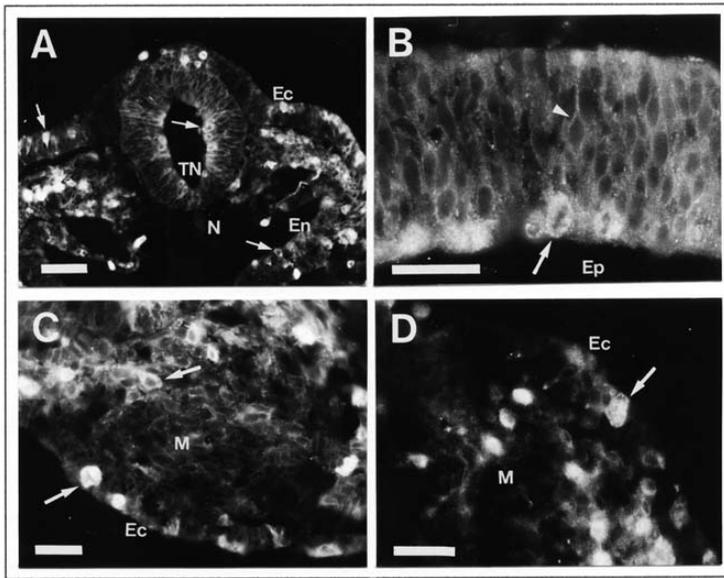


Fig. 6

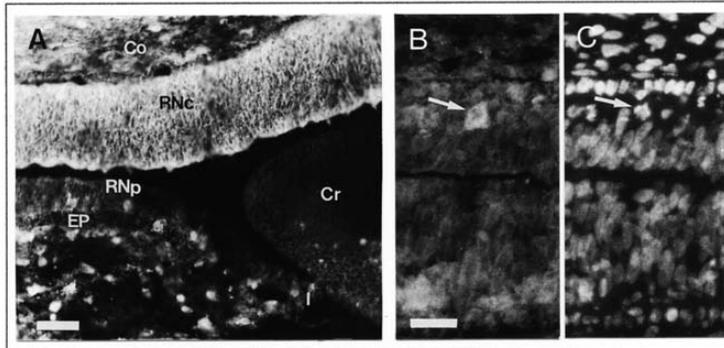


Fig. 7

Figura 6: Estructuras marcadas por 3C3 en embriones de pollo en E2. A, corte transversal de la región dorsal de un embrión a bajo aumento. B, corte oblicuo al tubo neural a nivel del rombencéfalo caudal, a mayor aumento; observar el marcado sobre la célula fusiforme señalada con una cabeza de flecha. C, región ventral a mayor aumento, observar la distribución del marcado en el mesénquima. D, corte similar a C, a nivel dorso-lateral, observar en ambas el marcado sobre el ectodermo.

Todas las imágenes son de cortes a congelación de piezas fijadas en PFA al 4%.

Ec, ectodermo; En, endodermo; Ep, epéndimo; M, mesénquima; N, notocorda; TN, tubo neural. Flechas: células de distintos tejidos que presentan una marca aparentemente más intensa.

Barras: A, 60 μm ; B, C y D, 30 μm .

Figura 7: Estructuras oculares marcadas por 3C3 en embrión de pollo en E6. A, regiones periférica y central de la RN (adosadas por colapso del cuerpo vítreo durante el procesamiento), así como otros componentes oculares. B y C, porción periférica de la RN a mayor aumento. A y B, marcadas con el Acm 3C3 y C, con Hoechst 33342; la flecha señala una célula del borde ventricular que presenta una señal intensa para 3C3 y que muestra su cromatina condensada en forma de cromosomas mitóticos.

Todas las imágenes son de cortes a congelación de piezas fijadas en PFA al 4%. EP, epitelio pigmentario de la retina; I, iris; Co, coroides; Cr, cristalino; RNc, retina neural central; RNp, retina neural periférica.

Barras: A, 50 μm ; B y C, 20 μm .

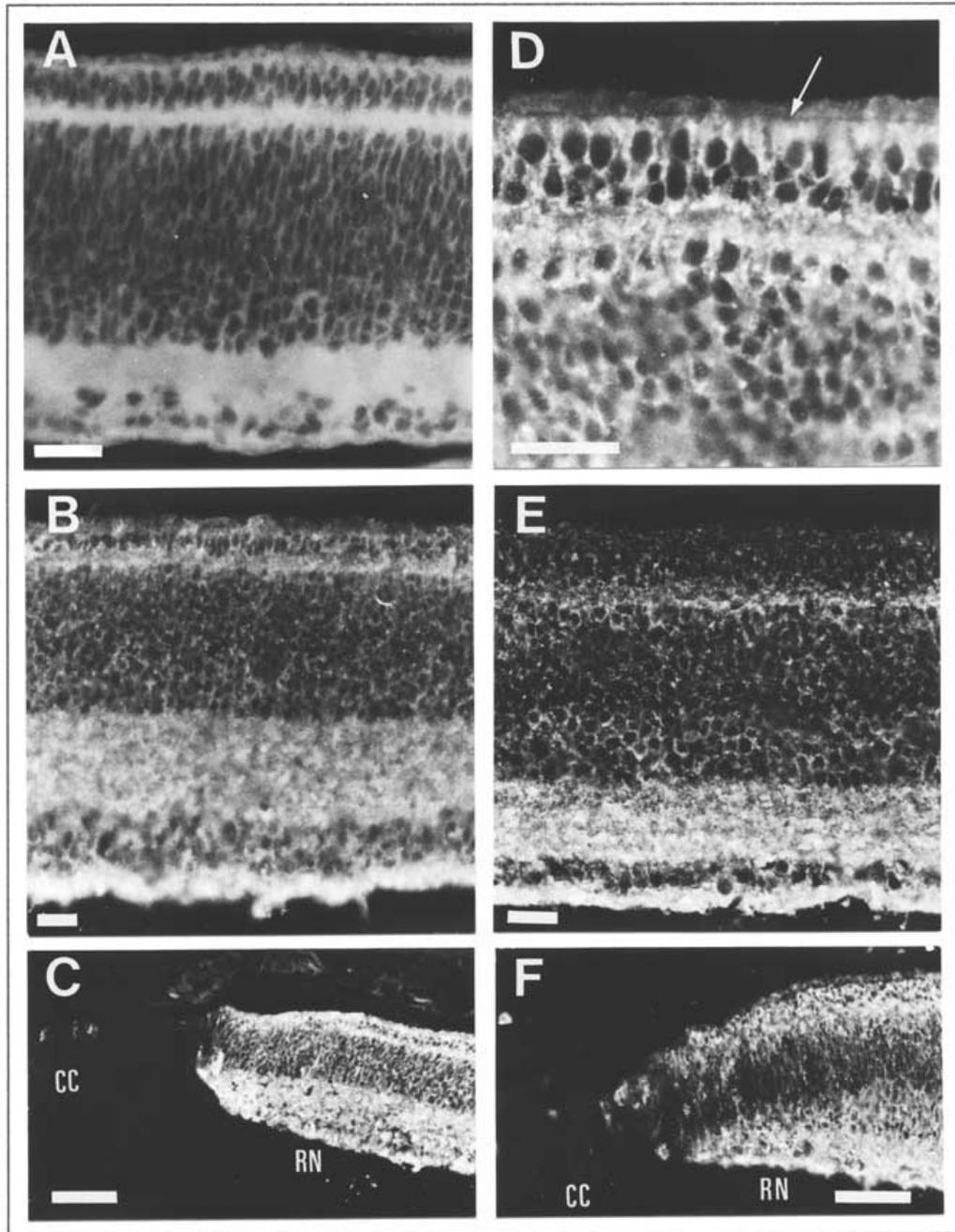


Figura 8: Marcado con 3C3 de RNs en distintas etapas del desarrollo. *A*, región central de RN de E12. *B*, región central de RN de E15. *C*, corte similar a *B*, donde se aprecia la región periférica de la RN y parte del cuerpo ciliar. *D*, corte similar a *B*, a mayor aumento, a nivel de la porción externa de la RN; la flecha indica la ubicación de la membrana limitante externa, como una línea negativa para 3C3. *E*, región central de RN de E18. *F*, corte similar a *E*, exhibiendo la región periférica de la RN y parte del cuerpo ciliar.

A: corte en parafina; *B* a *F*, cortes a congelación.

CC, cuerpo ciliar; RN, retina neural.

Barras: *A*, *B*, *D* y *E*, 20 μm ; *C* y *F*, 60 μm .

En el pollo post-natal de 1 día (P1), estas diferencias fueron mucho más evidentes y la señal más fuerte se encontró en la capa de fibras del nervio óptico (Fig. 9). En estas últimas etapas, al aumentar la concentración de Acm 3C3 usada para la inmunodetección, observamos que las capas externas presentaban una señal que, aunque más débil, era apreciable (no mostrado).

Incluso en etapas avanzadas fue posible observar un gradiente espacial en la expresión del epítotope 3C3, que acompañaba al estado de maduración de cada región de la RN. La porción más periférica siempre presentó un patrón de marcado similar a etapas del desarrollo más tempranas. El panel inferior de la figura 9 muestra micrografías de distintas porciones de un corte de ojo de un pollo de 1 día (PN1) donde es posible apreciar este fenómeno.

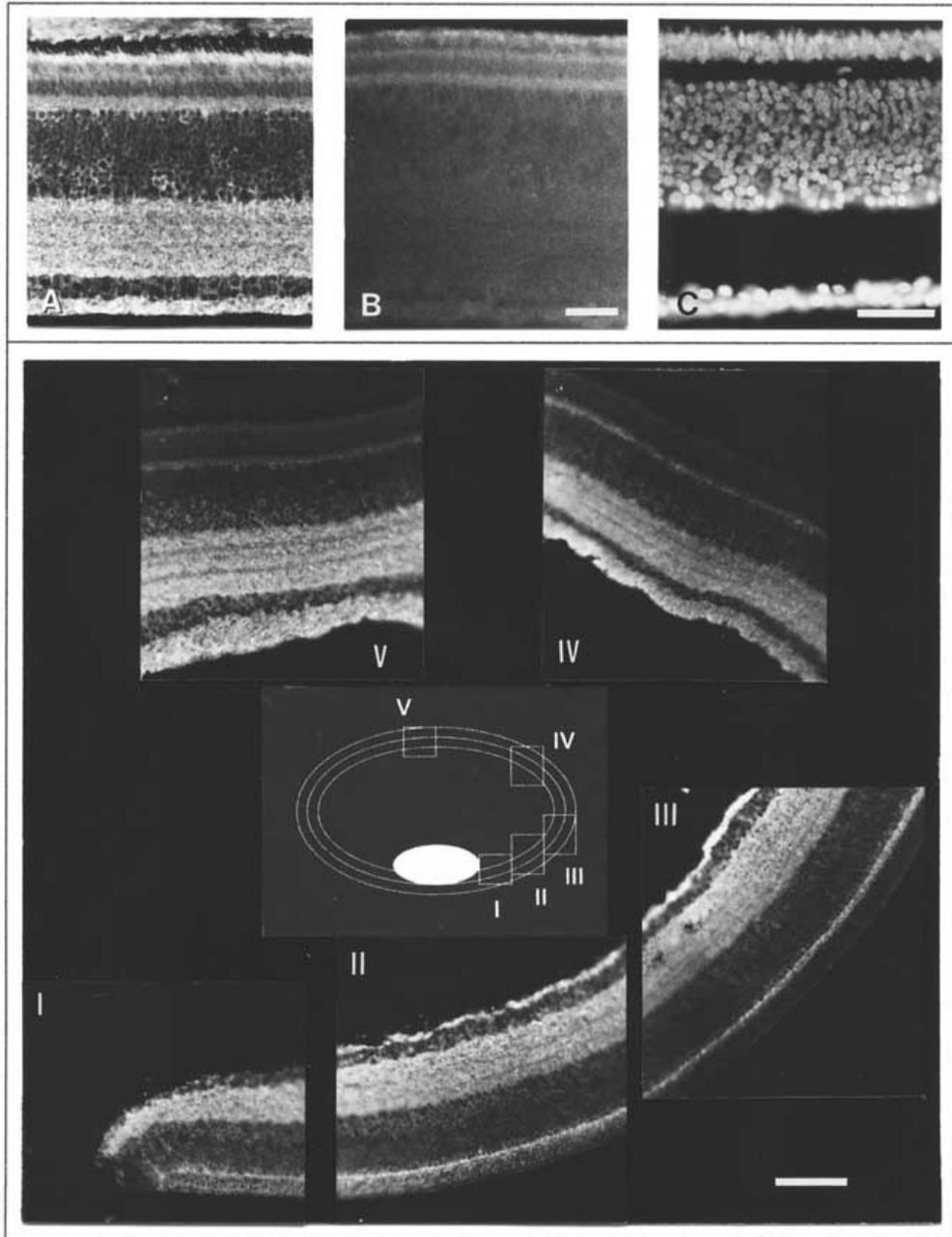


Figura 9

Panel Superior: Marcado de 3C3 sobre RN de pollo post-natal de 1 día (P1). A, región intermedia entre el centro y la periferia de la RN, marcada con el Acm 3C3. B, control negativo en un corte similar. C, corte similar, marcado con Hoechst 33342. Todos son cortes a congelación de piezas fijadas.

Barras: A, como en B; B y C, 40 μ m.

Panel Inferior: Marcado con 3C3 sobre distintas regiones de una RN en P1. Microfotografías de distintas regiones de un corte de ojo de pollo de 1 día (P1) marcado con el Acm 3C3, en orden desde la periferia (I) hasta el centro (V). El esquema central indica la ubicación relativa aproximada de cada imagen en el ojo.

Barra: 80 μ m.

3.4 - Inmunofluorescencia sobre células de RN en cultivo y localización subcelular del epítipo de 3C3:

Como una manera de obtener más datos acerca de la distribución de la marca de 3C3 sobre las células de la RN, realizamos cultivos primarios a partir de RNs de embriones de E7-8.

Luego de dos o tres días de cultivo, las neuronas han extendido neuritas que, en algunos casos, conectan grupos de células entre sí. Las células de Müller, por otro lado, adoptan la forma de células aplanadas que tapizan gran parte de la superficie del sustrato y sobre las cuales se disponen, en racimos apretados, las neuronas y neuroblastos. En estos cultivos, la señal aparecía restringida a las células con morfología neuronal y no era detectable (incluso con concentraciones altas de Acm 3C3) en las células planas (Fig. 10, Panel sup., A y B).

En las neuronas en cultivo, confirmamos lo observado para cortes de RN en cuanto a la distribución subcelular del epítipo, ya que la señal es de distribución periférica y se encuentra en forma de pequeños parches irregulares. La señal aparentó ser igual de intensa en toda la extensión de las células, incluso en las neuritas donde era apreciable en estructuras tan delgadas como los filopodios de conos de crecimiento (Fig. 10, Panel sup. C y D).

Con el fin de obtener indicios de si el epítipo reconocido por 3C3 se encuentra hacia afuera o hacia adentro de la membrana plasmática, incubamos células vivas en cultivo con el Acm a temperatura ambiente y luego las procesamos para inmunofluorescencia. El resultado fue que, en estas condiciones, el Acm 3C3 no es capaz de reconocer a su epítipo, sugiriendo una localización intracelular de éste (Fig.10, Panel inf., B).

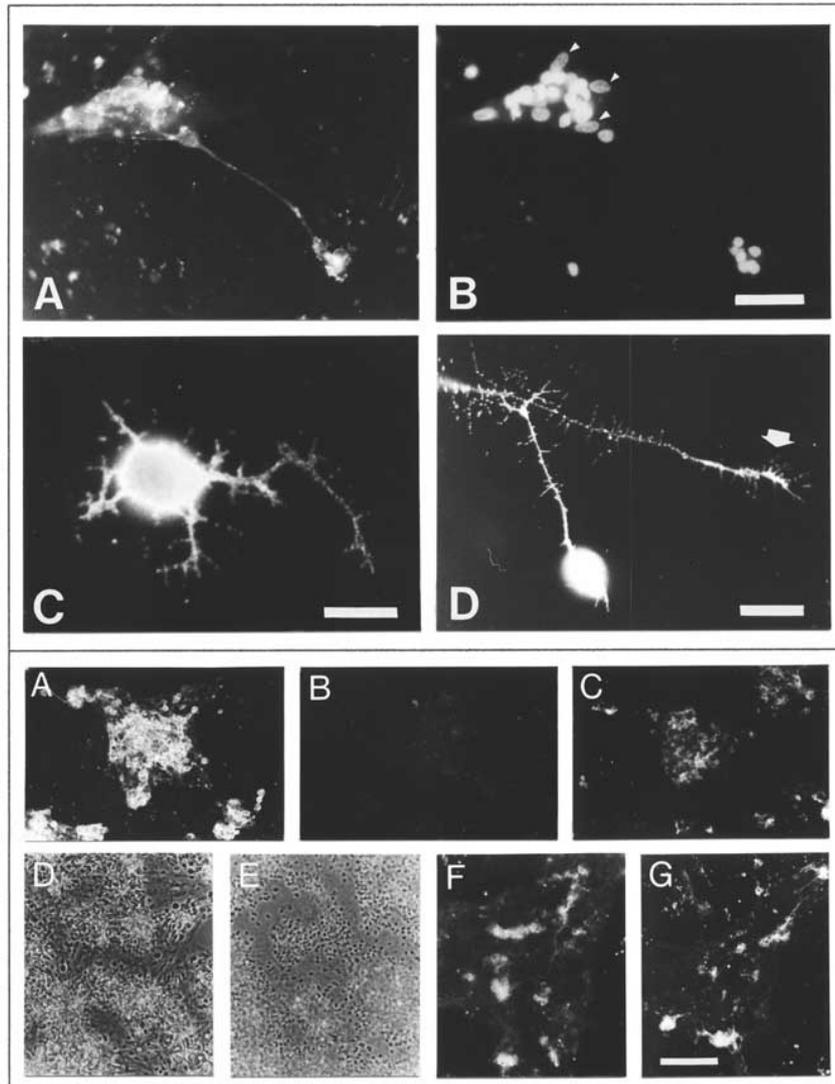


Figura 10

Panel superior: Marcado del Acm 3C3 en células de RN in vitro. A y B, marcado con el Acm 3C3 (A) y con Hoechst 33342 (B); las cabezas de flecha en B señalan núcleos correspondientes a células gliales (negativas para 3C3). C, imagen a mayor aumento de una neurona, marcada con 3C3. D, idem, donde se puede observar un cono de crecimiento neurítico (flecha).

Las imágenes son de cultivos de células de RN de E7, con 3 días in vitro.

Barras: A y B, 40 μm ; C, 10 μm ; D, 20 μm .

Panel inferior: Tratamientos realizados sobre células en cultivo. A, inmunofluorescencia convencional con el Acm 3C3 sobre un cultivo similar a los del panel superior; B, incubación por 1 h a temperatura ambiente con el Acm 3C3 previo a la fijación (mientras las células estaban aún vivas); C, preparación similar a A, tratada con Tritón X-100 al 0.2% por 5 min., luego de la fijación. D, aspecto de un cultivo a alta densidad celular, en microscopía de contraste de fases. E, residuo de un cultivo similar a D, luego de una incubación con Tritón X-100 al 0.5% por 5 min, sin fijar (ver figura 16). F, inmunofluorescencia convencional y G, tratamiento con acetona 50%-PBS fría (0°C) por 1 min, luego de la fijación en PFA de un cultivo de células de RN.

Barra: 100 μm .

3.5 - Otras estructuras oculares:

Como describimos previamente, en las primeras etapas prácticamente todos los tejidos del embrión presentaron una cierta señal. En etapas más tardías, sin embargo, fue evidente una disminución de ésta en las células no-neurales, aunque en algunos tejidos observamos una marca muy débil hasta etapas avanzadas del desarrollo.

En E14-15, por ejemplo, observamos una caída abrupta de la señal más allá de la ora serrata, aunque algunas células aisladas del cuerpo ciliar y del iris mostraron una marca que, aunque débil, era evidente. El marcado simultáneo con Hoechst 33342 mostró que muchas de estas células presentaban cromosomas mitóticos (Fig. 11E a H). No observamos señal apreciable en el epitelio pigmentario de la retina (EPR), ni en el pecten. La coroides y el cartílago de la esclerótica resultaron totalmente negativos (en ambos encontramos células que emitían fluorescencia, pero, como pudimos observar en los controles negativos, se trataba de autofluorescencia). En la región de las fibras del cristalino, sobre todo al usar concentraciones altas de Acm 3C3, fue apreciable una señal extremadamente débil, de distribución periférica e igual en todas las células, especialmente en el epitelio y el “annular pad” (Fig. 11C).

Tanto en la córnea como en los músculos extrínsecos del ojo, cuyas células eran negativas, observamos estructuras filamentosas muy delgadas, que presentaron una marca evidente. En la córnea, estas estructuras estaban incluidas en el estroma, mientras que en el músculo esquelético apreciamos fácilmente los filamentos 3C3-positivos ubicados entre las fibras musculares esqueléticas, que eran negativas (Fig. 11A y B).

3.6 - Otros órganos del sistema nervioso central:

En E12-18, en otras regiones del SNC, tales como el tectum óptico y el cerebelo, observamos una señal comparable a la de la RN, distribuida en todo el espesor de las estructuras y sin discriminar capas de somas o prolongaciones celulares (Fig. 11I a J).

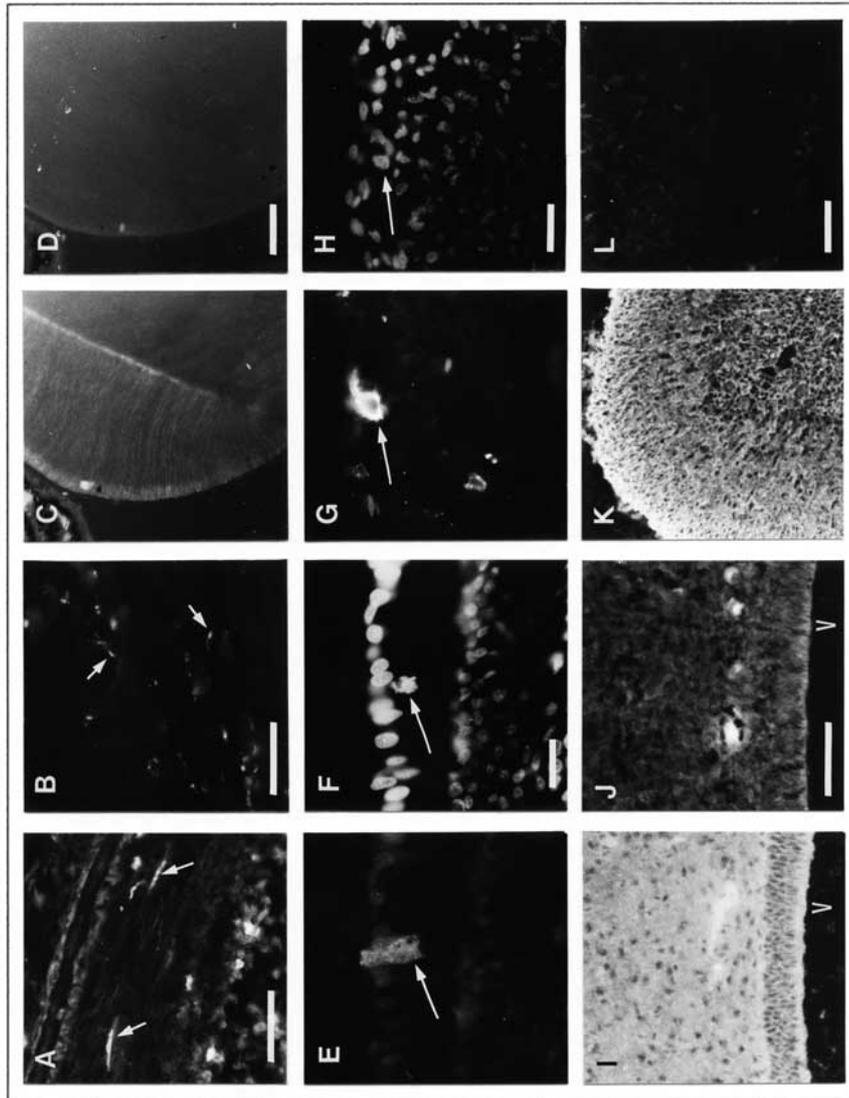


Figura 11: Otros órganos y tejidos marcados con el Acm 3C3. A, corte de ojo de embrión de pollo en E17, donde se observa la región circundante al limbo corneal; las flechas indican estructuras filamentosas positivas para 3C3 ubicadas en el estroma. B, corte de músculo estriado esquelético (P1); las flechas indican estructuras filamentosas positivas para 3C3, que se ubican entre las fibras musculares. C, parte del cristalino (a nivel del “annular pad”) en un corte de ojo de pollo (P1), marcado con el Acm 3C3. D, control negativo de C. E y F, corte a nivel del cuerpo ciliar, marcado con 3C3 (E) y con Hoechst (F); la flecha señala una célula en mitosis (prometáfase). G y H, corte similar a nivel del iris, marcado con el Acm 3C3 (G) y con Hoechst 33342 (H); la flecha señala una célula en mitosis (profase) marcada con 3C3. I y J, cortes de lóbulo óptico de pollo de E12, incubados con 3C3 (I) y con sobrenadante de mieloma (J). K y L, cortes de cerebelo de pollo de E18 incubados con el Acm 3C3 y con sobrenadante de mieloma, respectivamente. Todos los cortes fueron realizados a congelación, a partir de piezas fijadas. V, cavidad ventricular. Barras: A, B, C, D, I, J, K y L, 60 μm ; E, F, G y H, 20 μm .

4 - Análisis bioquímico primario del Ag 3C3:

Dadas las características descritas de la señal obtenida por inmunohistoquímica con el Acm 3C3, emprendimos la caracterización, al menos parcial, del epítipo y del o los antígenos a los que se une. Para esto realizamos distintos experimentos sobre cortes, células en cultivo y/o retinas aisladas.

4.1 – Tratamientos químicos sobre cortes y células en cultivo:

Para tener algún indicio inicial de la naturaleza bioquímica del/los antígeno/s que reconoce el Acm 3C3, hicimos diferentes tratamientos sobre cortes de ojo embrionario de pollo o células cultivadas de RN previo a su procesamiento para inmunofluorescencia. Algunos de los resultados obtenidos aparecen en la figura 12.

El tratamiento de cortes fijados con el detergente no iónico Tritón X-100 (TX100) produjo una reducción importante de la señal de una forma que depende de la concentración de detergente, del tiempo de incubación y del grado de fijación de la muestra (Fig. 12C). Algo similar ocurrió al tratar células en cultivo con TX100, como se ve en la figura 10C (Panel inf.) y analizamos en mayor detalle más adelante.

También observamos una disminución en la señal al incubar con tripsina los cortes fijados. Esta disminución depende del tiempo de incubación y de la concentración de la enzima (Fig. 12D a F).

El tratamiento con ácido periódico (Fig. 12H e I) o periodato de sodio (Fig. 12J a Ñ), sustancias que son capaces de oxidar y, por lo tanto, destruir muchos epítipes glucídicos, no produjo una disminución en la señal apreciable por inmunofluorescencia, incluso al usar altas concentraciones de reactivo por períodos relativamente largos de tiempo.

Tampoco pudimos apreciar ninguna disminución de la señal al incubar con solventes de lípidos, tanto en cortes como en células en cultivo. Por ejemplo: cortes tratados por 30 minutos con una mezcla en partes iguales de metanol y cloroformo (Fig. 12G), y células en cultivo con acetona fría al 50% en PBS por 1 minuto (Fig. 10, Panel inf., F y G).

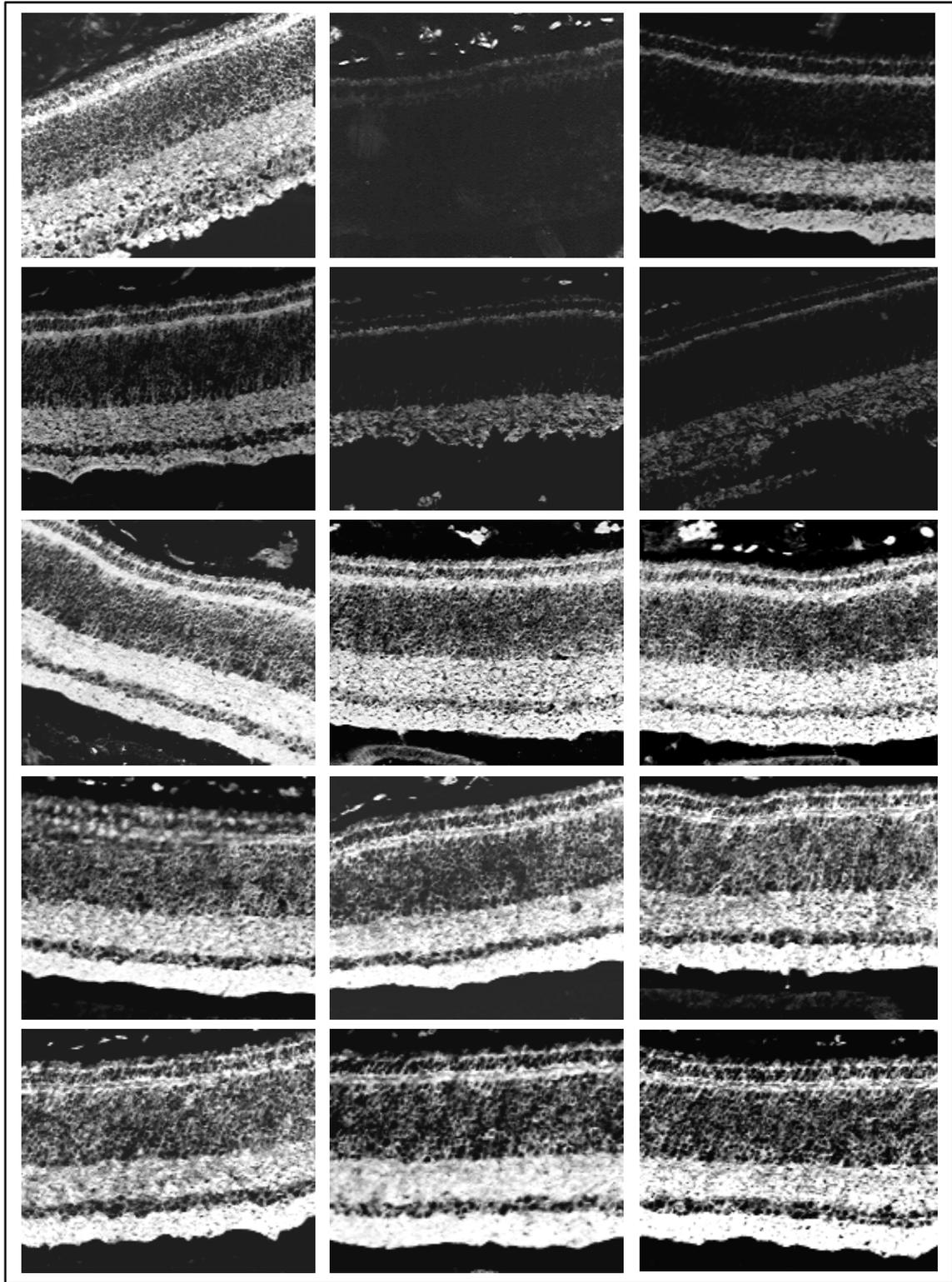


Figura 12: Efecto de tratamientos químicos en el marcado de 3C3 sobre cortes de RN (E15). A, control positivo (corte no tratado). B, control negativo. C, Tritón X-100 0.2% en PBS por 45 min. D, E y F, tratamientos con tripsina (0.2, 1.0 y 2.0 mg/ml, respectivamente) por 30 min., a temperatura ambiente. G, tratamiento con cloroformo-metanol (1:1) por 30 min. a temperatura ambiente. H e I, tratamientos con ácido periódico al 0.1 y 1%, respectivamente, por 45 min. a temperatura ambiente. J a Ñ, tratamientos con periodato de sodio a pH ácido a distintas concentraciones y por distintos tiempos, seguido de una incubación en borohidruro de sodio por 30 min.: J, 10 mM, 1 h; K, 20 mM, 1 h; L, 40 mM, 1 h; M, 20 mM, 30 min.; N, 20 mM, 45 min.; Ñ, 20 mM, 1:30 hs.

4.2 - Análisis del Ag 3C3 por electroforesis

Con el fin de analizar el comportamiento electroforético del/los antígeno/s que reconoce el Acm 3C3, separamos muestras de RN tanto en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) como por isoelectroenfoque (IEF). Luego, transferimos las moléculas separadas en los geles a membranas de nitrocelulosa, sobre las cuales realizamos la inmunodetección (ver Materiales y Métodos). Muchos ensayos primarios de muestras fueron realizados por dot-blot, aunque no mostramos resultados de ninguno de ellos.

4.2.1 – SDS-PAGE:

Tras la solubilización de RNs de embriones de pollo de E12 a E15 en SDS al 2%, y someter la muestra a SDS-PAGE, obtuvimos un patrón de bandas como se muestra en la figura 13A al colorear las proteínas en el gel con Azul Brillante de Coomassie R250 (CBB). En estas condiciones, el Western-blot, realizado por transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa e inmunodetección con el Acm 3C3, reveló una sola banda bien definida con una Mr correspondiente a una proteína de un peso molecular aparente de alrededor de 72000 ± 2000 (Fig. 13B). Encontramos que esta banda no se corresponde con ninguna observada en tinciones generales para proteínas, ya sea del gel con CBB como de la membrana de nitrocelulosa con Rojo Ponceau S en las preparaciones de RN que utilizamos habitualmente.

La mayor parte de los análisis fue realizada en condiciones de reducción, agregando al buffer de muestra agentes reductores como el β -mercaptoetanol o el ditioneitol (DTT). Sin embargo, la banda mantuvo sus características tanto en condiciones reductoras como no reductoras, como pudimos observar al correr en SDS-PAGE muestras que no contenían dichos agentes (Fig. 13B).

Encontramos una banda con las mismas características en muestras de distintas regiones del SNC embrionario, tales como el cerebro, tectum óptico, cerebelo y tronco encefálico (Fig. 14A y B). A juzgar por la intensidad de la tinción con Ponceau sobre la membrana, la proporción de Ag 3C3 es similar en cada uno de estos órganos, al menos en la edad analizada. Otros tejidos, como el hígado o la sangre no mostraron señal (Fig. 14B).

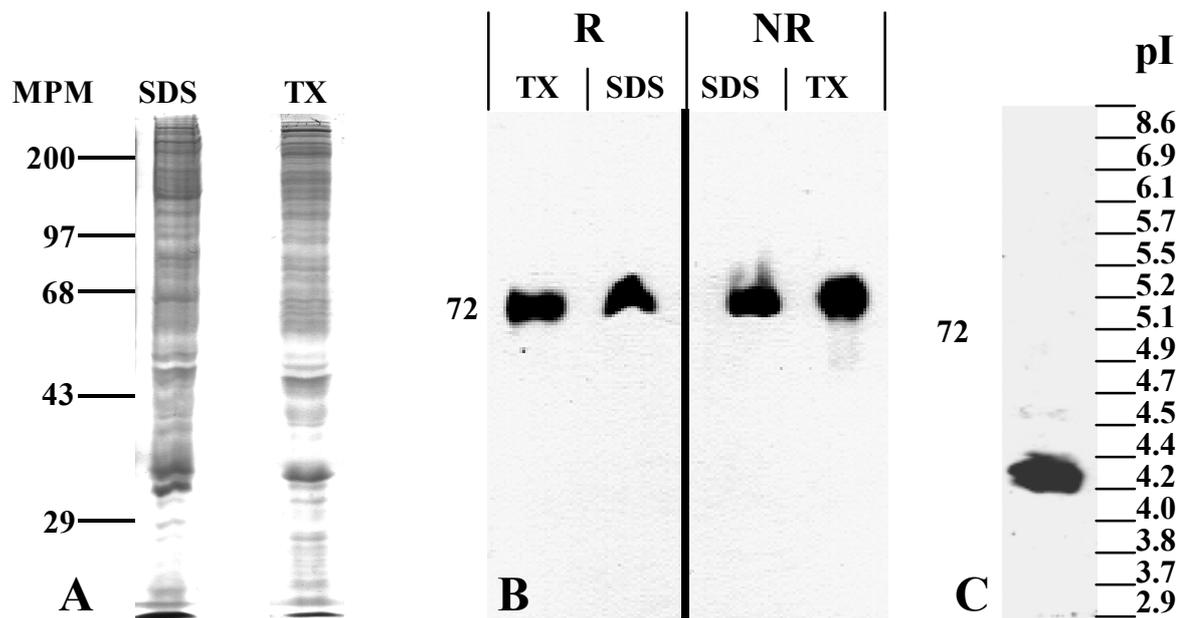


Figura 13: Análisis del comportamiento electroforético del Ag 3C3. A, perfil electroforético en SDS-PAGE de muestras de RN embrionaria de pollo, coloreadas con CBB R250; izquierda, muestra de RN de E15 solubilizada en SDS al 2%; derecha, fracción soluble en Tritón X-100 (TX100) al 0.2% de una muestra de RN de E12. B, Western-blot con el Acm 3C3 de muestras de RN embrionaria solubilizadas en SDS 2% (SDS) o en TX100 0.2% (TX) y separadas en SDS-PAGE en condiciones reductoras (R, “TX” en presencia de **b**-mercaptoetanol y “SDS” en presencia de ditioneitol) y no reductoras (NR). C, inmunodetección con el Acm 3C3 sobre una muestra de RN embrionaria de pollo (E12) separada por isoelectroenfoque (IEF) en presencia de urea 6 M.

MPM, marcadores de peso molecular (valores en KDa). pI, punto isoeléctrico.

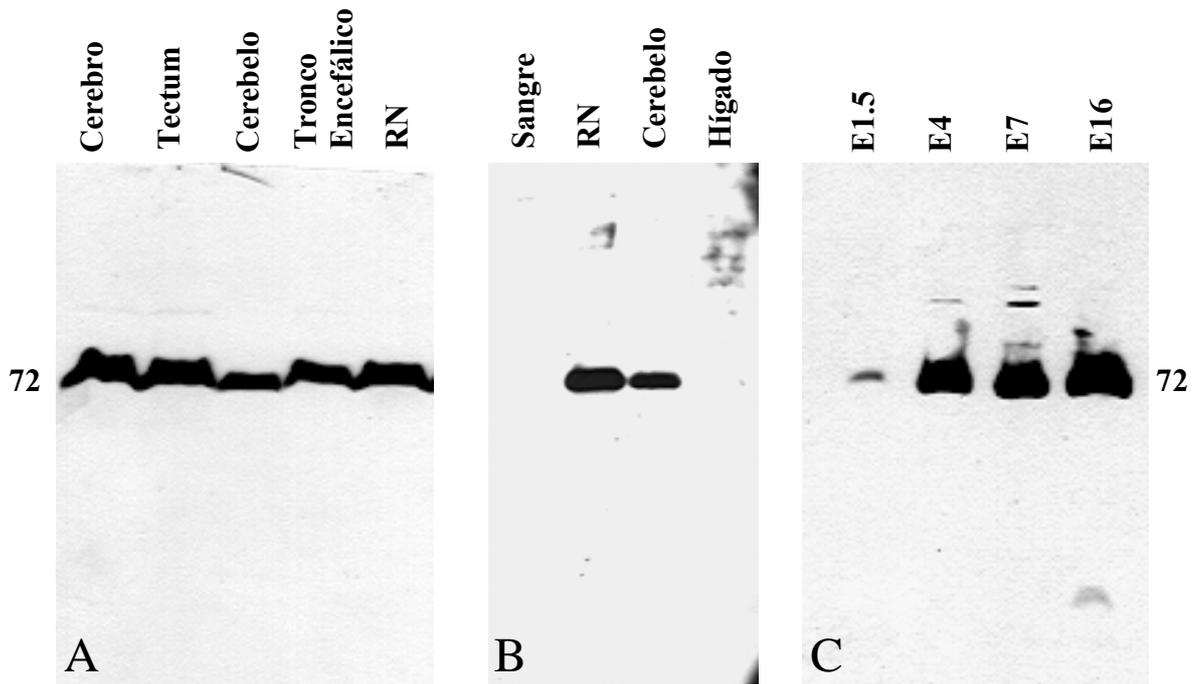


Figura 14: Western-blots con el Acm 3C3 sobre distintas muestras de tejidos embrionarios de pollo. *A*, muestras solubles en TX100 al 0.1% de distintas regiones del sistema nervioso central de E12. La tinción con Rojo Ponceau S sobre la membrana de nitrocelulosa previo a la inmunodetección, mostró que en todos los carriles habían cantidades de proteína muy similares (excepto en la muestra de cerebelo, donde había un poco menos que en las demás). *B*, muestras de sangre entera, RN, cerebelo e hígado embrionarios (E15), solubilizados en SDS 2%. *C*, muestras de embriones de diferentes edades, donde en E2 solubilizamos en SDS 2% el embrión entero, en E4 el encéfalo, en E7 los hemisferios cerebrales y en E16 la RN.

Al comparar muestras de tejido nervioso de diferentes edades, vemos una banda de Mr similar en todas ellas, igual a su vez a la observada a partir de muestras de embriones tempranos solubilizados enteros (Fig. 14C).

4.2.2 - Punto isoelectrico del Ag 3C3:

Analizamos varias muestras de RN solubilizadas en Nonidet P40 o en Tritón X-100 por isoelectroenfoque (IEF) en gel de poliacrilamida en presencia de urea y, luego de transferir a membranas de nitrocelulosa, procedimos a la inmunodetección con 3C3. La figura 13C, muestra una imagen de la localización del Ag 3C3 en un isoelectroenfoque. Existe una banda principal, bordeada por al menos dos bandas menores, pero detectables. El punto isoelectrico aproximado del Ag 3C3, calculado a partir de estos ensayos, es de 4.2.

4.3 - Análisis de la solubilidad del Ag 3C3

Tras la homogeneización de RNs en distintas soluciones salinas tamponadas (ej: PBS) y la ultracentrifugación a 100.000 g por 1 h, observamos que el Ag 3C3 se encuentra enriquecido en el sedimento, sugiriendo que no es salino-soluble (no mostrado).

El hecho de que la señal de 3C3 en inmunofluorescencia disminuyera ante tratamientos con TX100, sugirió que el Ag podía ser extraíble con este detergente. El Ag 3C3 mostró ser altamente extraíble por TX100 de RNs aisladas, ya sea frescas (Fig. 15B) o fijadas con PFA al 4% por 1 h (Fig. 15A). Encontramos que la solubilidad a partir de RNs frescas depende de la concentración de detergente, siendo por debajo de la concentración micelar crítica (cmc), que para el TX100 es de 0.016% (Harlow y Lane, 1988; figura 15B).

Para analizar mejor la extractabilidad del Ag 3C3 con este detergente, incubamos cultivos de RN de embriones de pollo de 7-8 días, con 3 días *in vitro*, con TX100 al 0.5% por distintos tiempos y analizamos por Western-blot la presencia del Ag en el buffer de extracción (ver Apéndice) y en los residuos celulares no solubilizados. Los resultados aparecen en la figura 16A (ver también Fig. 10, Panel inf., D y E). Podemos apreciar que el Ag 3C3 es altamente extraíble con TX100 de una forma que depende del tiempo de incubación, y que la solubilización es máxima a los 5 min.

4.4 - Sensibilidad a tripsina

Para comprobar la sensibilidad del Ag 3C3 a la proteasa tripsina indicada por los tratamientos *in situ* (Fig. 12), incubamos muestras de RN de pollo de E12 solubilizada en TX100 al 0.1% en PBS con distintas concentraciones de tripsina (5.0 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$) y luego las analizamos por Western-blot con el Acm 3C3. Luego de un tratamiento de 5 min. a 37°C, aparece un patrón de degradación que es dependiente de la concentración de la enzima (Fig. 16B). A concentraciones muy altas de tripsina (0.5 mg/ml), el Acm 3C3 no marcó ninguna banda, en una transferencia de un gel donde se había interrumpido la electroforesis cuando el frente de bromofenol estaba a 0.5 cm del borde inferior del gel (no mostrado).

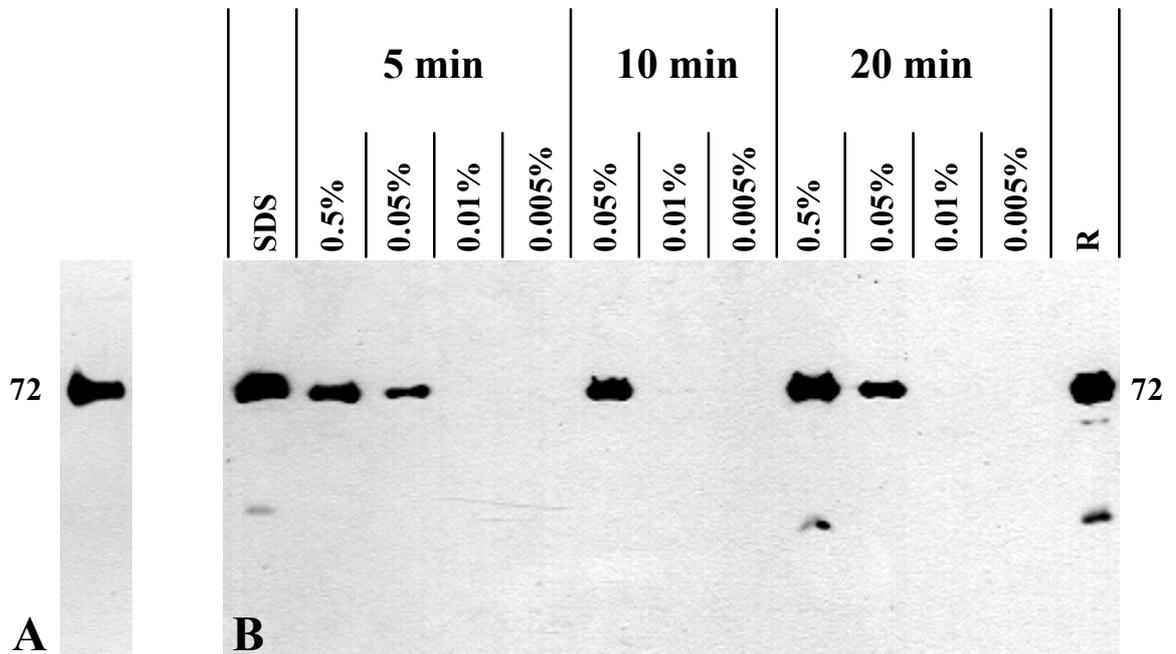


Figura 15: Solubilidad del Ag 3C3 en Tritón X-100. A, Western-blot con el Acm 3C3 de una muestra de RN de E13 fijada y solubilizada en Tritón X-100 al 0.2%. B, Extractabilidad del Ag 3C3 con Tritón X-100 en función de la concentración de detergente: Western-blot con el Acm 3C3 de muestras de RN embrionaria (E15) solubilizada con distintas concentraciones de TX100 (0.005% a 0.5%), en distintos tiempos de incubación (5, 10 y 20 min); R, fracción insoluble luego de incubar una RN con TX100 al 0.05% por 10 min; SDS, muestra de RN de E16 solubilizada con SDS al 2%.

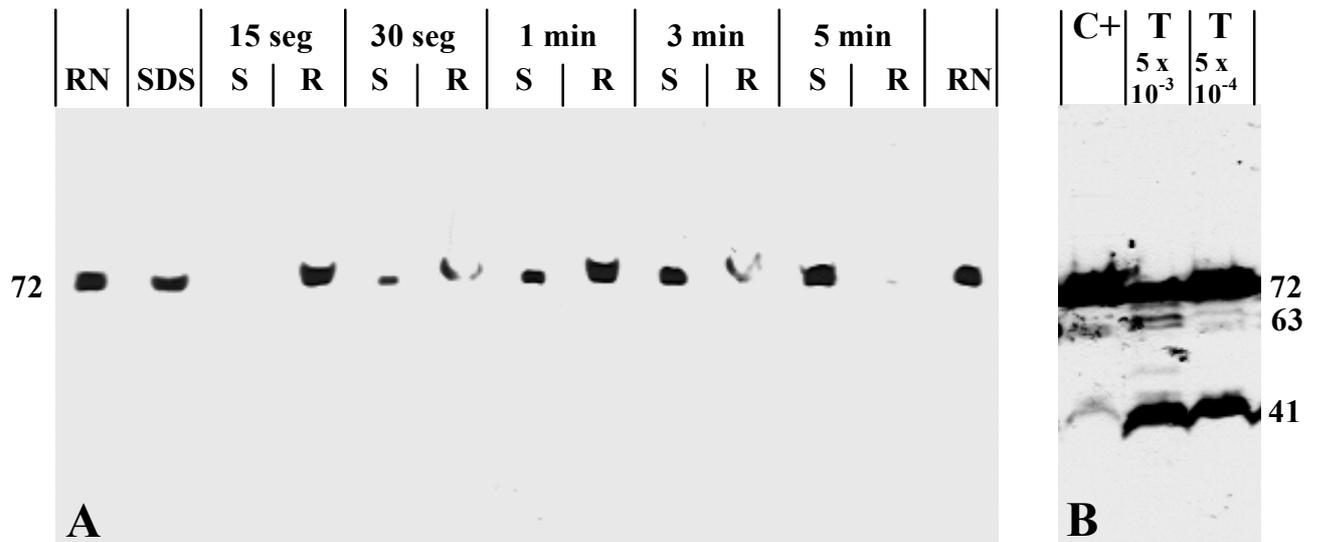


Figura 16: Solubilidad en Tritón X-100 y fragmentación por tripsina del Ag 3C3. A, extractabilidad del Ag 3C3 con Tritón X-100 en función del tiempo: Western-blot con el Acm 3C3 de las fracciones solubles (S) e insolubles (R) en el detergente de células de RN embrionaria de pollo en cultivo (E7 con 3 días *in vitro*); SDS, muestra obtenida de la solubilización directa de las células en SDS al 2%; RN, muestras de retina neural embrionaria (E15), solubilizada en SDS 2%. B, Western-blot de muestras de RN embrionaria de pollo (E12) solubilizadas en TX100 al 0.1% y digeridas con tripsina 5×10^{-3} y 5×10^{-4} mg/ml (concentración final) por 5 min a 37°C; C+, muestra no tratada con tripsina.

5 - Reactividad cruzada con otras especies de vertebrados:

Estudiamos la posibilidad de que el Acm 3C3 fuera capaz de reconocer un epítotope similar en especies diferentes al pollo por inmunofluorescencia de cortes en algunos casos y por Western-blot en otros. Las especies en las que encontramos reactividad cruzada son las siguientes: cobayo, entre los mamíferos; tortuga morrocuyo (*Trachemys dorbigni*) y víbora ciega (*Amphisbaena sp.*), entre los reptiles. Otras especies ensayadas, y en las que no se encontró señal, fueron: conejo (*Oryctolagus cuniculus*), por inmunofluorescencia; ratón (*Mus musculus*), por inmunofluorescencia; rata (*Rattus norvegicus*), por Western-blot; vaca (*Bos taurus*), por Western-blot y rana toro (*Rana catesbeiana*), por las dos técnicas.

5.1 - Cobayo (*Cavia porcellus*):

Probamos cortes a congelación de ojo de un cobayo adulto, por inmunofluorescencia. Observamos que la señal se distribuye de una manera similar, aunque no idéntica que en el pollo adulto. Solamente encontramos señal en la RN, y principalmente en la capa de fibras del nervio óptico, como se ve en la figura 17 (A a D). En otras capas más externas se puede apreciar una señal mucho más débil, que si bien parece ser significativa, no es mucho más fuerte que el ruido de fondo. Por otro lado, la señal en la capa de fibras, en cuanto a su intensidad general, es mucho más débil que en el pollo.

5.2 - Tortuga (*Trachemys dorbigni*):

Realizamos cortes de ojo maduro de tortuga morrocuyo a partir de una pieza fijada por perfusión con una mezcla de PFA al 2 % y glutaraldehído al 0.2 %. La señal es muy fuerte en toda la RN y, en la porción central presenta un patrón similar a la RN del pollo post-natal, con una mayor intensidad en las capas más internas. En la periferia, sin embargo, observamos una distribución prácticamente homogénea en toda la RN, en una disposición que recuerda a la RN embrionaria del pollo (Fig. 17E a H).

5.3 - *Amphisbaena*:

De este reptil también analizamos cortes a congelación de ojo de un animal adulto. En este caso, la RN, al igual que el resto del ojo, se encuentra poco desarrollada, aunque se puede distinguir un patrón laminado. La señal, relativamente débil, parecía distribuirse por todo el órgano, aunque observamos una señal notablemente más fuerte en la capa plexiforme interna (Fig. 17I y J).

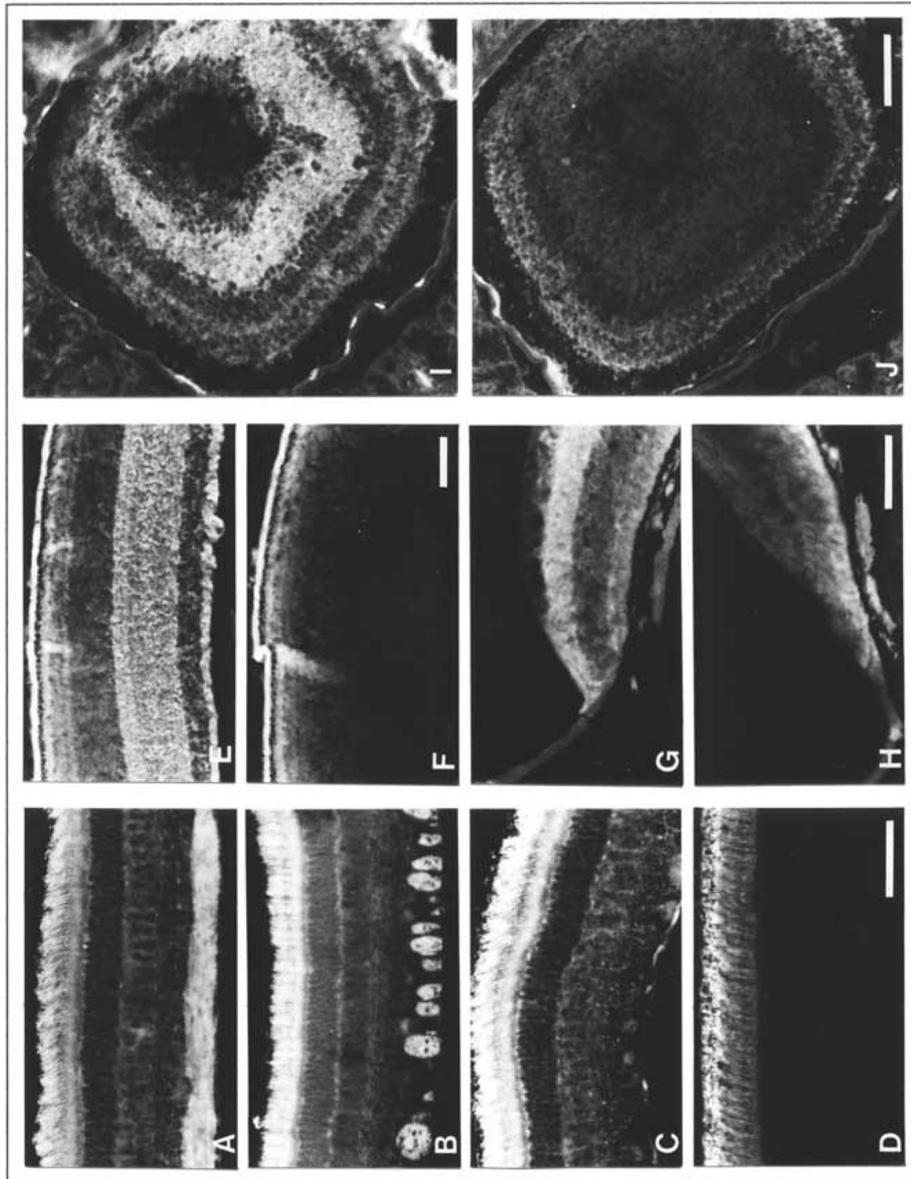


Figura 17: Marcado de RN de otras especies de vertebrados con el Acm 3C3. A-D, cortes de ojo de cobayo; A, corte a nivel de la región central de la RN, donde la mayor parte de la señal se encuentra en la gruesa capa de fibras del nervio óptico; B, corte de una región similar, pero donde los haces de fibras aparecen en sección transversal; C, región periférica de la RN, donde la capa de fibras aparece disminuida a delgadas haces dispersos; D, control negativo (sobrenadante de mieloma en lugar de 3C3), donde se aprecia la intensa autofluorescencia de los fotorreceptores. E-H, cortes de ojo de tortuga morrocoyo; E y F, cortes a nivel de la región central de la RN, incubados con el Acm 3C3 y con sobrenadante de X63, respectivamente (control negativo); G y H, cortes a nivel de la RN periférica, con el Acm 3C3 y sobrenadante de X63, respectivamente. I y J, cortes de ojo de *Amphisbaena*, incubados con el Acm 3C3 y sobrenadante de X63, respectivamente. Todos son cortes a congelación de piezas fijadas. Barras: A, B y C como en D, E como en F, G como en H e I como en J, 60 μm .

DISCUSION

Los anticuerpos monoclonales como aproximación al estudio del desarrollo de la RN del pollo

La generación de Acms contra tejidos enteros como herramienta para encontrar moléculas con una distribución y/o función particular ha sido una aproximación muy utilizada desde comienzos de la década pasada, y aún hoy sigue dando frutos (ver Tabla 1 en Introducción). Esta aproximación puede ser aplicada al análisis de la diferenciación celular y la histogénesis normales, así como a ciertas contrapartidas patológicas, tal como el cáncer.

Como se describió en la Introducción, suele resultar difícil obtener Acms que reconozcan Ags raros cuando se inmuniza al animal con un tejido complejo. Muchas veces son necesarios procedimientos especiales, como los descritos de inmunización diferencial, que aumentan la probabilidad de obtener Acms de interés (Hockfield, 1987; Mathew y Sandrock, 1987). Otra forma de encarar este problema puede ser tratando de aumentar la probabilidad de sobrevivencia de los híbridos recién obtenidos. Una de las razones principales por las cuales es difícil obtener Acms contra Ags raros puede ser que, generalmente, la respuesta inmune secundaria no es equitativa para todos los Ags y existen muchas células B que secretan Acs contra unos pocos Ags (llamados por esto Ags inmunodominantes), mientras que para otros, son pocas las clonas que responden (Harlow y Lane, 1988). Así, al realizar un procedimiento de fusión convencional, sembrando las células híbridas en una alta densidad, los híbridos de interés pueden quedar “ocultos” entre los que secretan Acs poco interesantes. Esto se suma al problema de que tras una fusión, muchos de los híbridos generados no secretan ningún Ac y, por razones no bien conocidas, suelen crecer mucho más rápido que los que sí lo hacen, con la consecuencia de que los segundos desaparecen rápidamente si ambos coinciden en un mismo pocillo (Campbell, 1984). El procedimiento usado en este trabajo, que implica la dilución de las células inmediatamente después de la fusión y una siembra en una concentración tal que resulta muy baja la probabilidad de que se encuentren dos líneas diferentes en un mismo pocillo (“fusión-clonaje”), permite evitar gran parte de estos inconvenientes. En nuestro caso, obtuvimos un promedio de 10 pocillos con crecimiento de células híbridas por cada placa de 96 (en un total de 10 placas en cada fusión), lo cual si bien es un número relativamente pequeño de híbridos, teniendo en cuenta que sólo una pequeña proporción de ellos suelen resultar de interés, asegura una alta probabilidad de que las células ya estén clonadas desde el inicio. Seguramente son muchas las razones por las cuales no obtuvimos Acms de interés en las primeras dos fusiones,

realizadas del modo clásico, y sí en las dos últimas, en las cuales se aplicó la fusión-clonaje, pero es posible que esta diferencia sea una de ellas.

El sistema de estudio en particular, la RN del pollo, es además ideal para una aproximación como ésta, especialmente por tratarse de una especie lo suficientemente alejada del ratón desde el punto de vista filogenético como para que se genere una respuesta importante de anticuerpos. Al usar tejidos de mamíferos, por ejemplo, la respuesta suele ser débil y la mayor parte de los Acs son de la clase IgM y, por lo tanto, de baja afinidad (Goding, 1983). El usar una especie alejada del ratón tiene varias ventajas. Una de ellas es la posibilidad de realizar protocolos de inmunización no excesivamente largos, con la ventaja de que no se favorece la maduración de la respuesta inmune y, por lo tanto, aumenta la probabilidad de obtener Acms contra Ags no inmunodominantes. Otra ventaja es que permite usar cantidades relativamente pequeñas de tejido en la inmunización. Por otro lado, los procedimientos de inmunización diferencial fueron diseñados para obtener Acms contra Ags de roedores, lo que es difícil de conseguir utilizando procedimientos convencionales. Es probable que, si bien aumentan la eficiencia de la generación de Acms, estos métodos no sean estrictamente necesarios cuando se usan tejidos de especies filogenéticamente alejadas del ratón. Finalmente, el hecho de que la RN de las aves sea avascular facilita la “disección inmunológica” del órgano, ya que no existen en ella tejidos distintos al nervioso contra los cuales se puedan generar Acms.

En nuestro caso, podemos considerar que las inmunizaciones resultaron exitosas, ya que la mayor parte de los ratones generaron una buena respuesta de Acs contra la RN y otros tejidos del pollo tras una o dos inoculaciones de Ag, como pudimos comprobar por ELISA sobre células (Fig. 1 en Resultados), o por inmunofluorescencia sobre cortes, donde observamos una señal muy intensa sobre todos los tejidos del ojo. Este último era un resultado esperado, ya que en cualquier tejido, la mayor parte de las macromoléculas existentes son compartidas con otros tejidos y es normal, por lo tanto, generar Acs que reconocen epítopes de distribución ubicua. Es ésta la principal razón por la cual es necesario aplicar la tecnología de los Acms, que permite separar (clonar) las células productoras de Acs de interés cuando se parte de una mezcla compleja de Ags como la RN.

Alrededor de E12 una gran parte de la RN del pollo ya tiene una organización general en capas similar a la adulta, pero aún no se han diferenciado los segmentos externos de los fotorreceptores (Romanoff, 1960), por lo que ésta es una etapa ideal para analizar antígenos de expresión singular. De esta manera, nos aseguramos que ya existieran representantes de todos los tipos celulares diferenciados, evitando, a la vez, la

presencia de cantidades demasiado abundantes de proteínas mayoritarias de la RN adulta como las opsinas, que no eran de interés para nuestro trabajo.

El Acm 3C3 y su antígeno en el desarrollo

La obtención de una línea de hibridoma que secreta un Acm como 3C3 es quizás una de las mejores demostraciones de la efectividad del procedimiento utilizado. Este hibridoma presenta muchas características que lo hacen una herramienta de gran valor. En primer lugar, presenta un comportamiento excelente desde el punto de vista de su mantenimiento, ya que es capaz de crecer muy bien tanto en cultivo, como en ascitis y es posible congelarlo y re-clonarlo las veces que sea necesario, sin detrimento de su capacidad secretora ni de crecimiento. Segundo, el hibridoma parece ser capaz de secretar cantidades inusuales de Acm, como indica el título de trabajo del sobrenadante de cultivo en inmunohistoquímica (hasta 1/40) y la cantidad de Acm purificado (medida por absorbancia a 280 nm) a partir de un litro de sobrenadante (alrededor de 24 mg, cuando lo habitual son de 1 a 10 mg). Tercero, si bien no fue determinada la afinidad del Acm 3C3 por su Ag, ésta es probablemente alta, ya que es capaz de unirse al Ag en bajas concentraciones y dar de todos modos una señal apreciable (especialmente en inmunohistoquímica). Cuarto, el Acm 3C3 reconoce a su epítoto prácticamente en cualquier condición de las usadas, como por ejemplo, en inmunohistoquímica sobre cortes de piezas muy fijadas, lo cual es de gran utilidad para obtener buenas imágenes microscópicas y analizar mejor la distribución del Ag.

Patrón de expresión del epítoto reconocido por el Acm 3C3:

Uno de los rasgos más llamativos de la señal dada por el Acm 3C3 en inmunohistoquímica es la enorme variación de su distribución espacial a lo largo del desarrollo del pollo. Observamos que pasa de ser generalizada en el embrión muy temprano, a encontrarse sólo en algunas neuronas en el adulto. Esta restricción gradual de la señal es relativamente inusual, ya que lo habitual en los Acs de diferenciación celular es un aumento en la expresión de las células que se diferencian, sin ser expresado previamente en otras (Gilbert, 1997). Además, el epítoto reconocido por 3C3 sufre un incremento notorio en las neuronas durante el proceso de diferenciación, al mismo tiempo que sufre un decremento dramático en las células que no se van a convertir en neuronas. Por un lado, la expresión generalizada en etapas tempranas del desarrollo es interesante porque puede implicar una función también general del Ag 3C3. Más tarde, el que en algunas células del organismo (las neuronas) aumente la señal, y en las otras disminuya, sugiere que esta función no debe ser necesaria para todas las células diferenciadas, a la vez que sugiere la existencia de estrictos mecanismos de regulación

positiva y negativa de la presencia del epítotope en distintos tipos celulares. Interesa, entonces, analizar en detalle este comportamiento dicotómico tan particular.

Expresión del epítotope en embriones tempranos:

Hay dos aspectos a destacar de la señal dada por 3C3 en inmunohistoquímica de embriones tempranos: a) su ubicuidad y b) que aparenta ser más fuerte en algunas células que en otras. Respecto al primer punto, si bien aún no tenemos indicios acerca de la posible función del antígeno, el hecho de que presente una distribución tan amplia sugiere que pueda tener una función importante para todas o casi todas las células indiferenciadas. Resulta de sumo interés, también, que no todos los tejidos tempranos muestran una señal positiva, ya que la notocorda aparece totalmente negativa en inmunofluorescencia. Esto indica que la disponibilidad y/o presencia del epítotope 3C3 ya es regulada en etapas muy tempranas y abre la pregunta de qué diferencia a las células de la notocorda de todas las demás células del embrión temprano en cuanto a su expresión. Por otro lado, en todos los tejidos que dan una señal, se encuentran células con una marca de mayor intensidad que sus semejantes. En el neuroepitelio es donde es posible caracterizarlas mejor: la ocurrencia de estas células en el borde ventricular y el hecho de que al menos algunas de ellas presentan cromosomas mitóticos cuando se realiza una contratinción con un colorante de ADN, indican que al menos la mayor parte de ellas son células en proceso de división mitótica. Hay dos causas primarias que podrían explicar este aumento de señal en células mitóticas: a) la disponibilidad del epítotope y/o la expresión del antígeno son reguladas en el ciclo celular, siendo mayor durante la mitosis, o b) los cambios de distribución de la membrana plasmática, a la cual podría estar asociado el Ag, harían aumentar la densidad local del epítotope y, por lo tanto, aumentarían la señal sin necesidad de que haya una mayor cantidad de éste. Los datos disponibles hasta el momento no favorecen ninguna de estas posibilidades en particular.

Expresión del epítotope en neuronas:

Como fue descrito en Resultados, el Acm 3C3 marca fuertemente las células de la línea neuronal desde etapas muy tempranas. Además de la señal débil observada en todo el neuroepitelio indiferenciado (al igual que en otras células, en la misma etapa), es muy evidente la señal observada en las neuronas en formación, tales como las células ganglionares, que son las primeras neuronas en diferenciarse en la RN. En éstas es destacable la intensidad de marca de los axones que ya es importante en E5, cuando aún se está formando la capa de fibras del nervio óptico. En RNs de esta etapa del desarrollo es muy notoria la diferencia entre la región periférica y la central, ya que ésta presenta una mayor intensidad de señal. Este resultado no es sorprendente, dado que la diferenciación celular en la RN avanza desde el centro a la periferia, de manera que las primeras neuronas se forman en la región central cuando la periferia aún se encuentra totalmente indiferenciada. Más tarde, cuando la señal disminuye en las células no-neuronales, todas las neuronas son aparentemente positivas, presentando una marca muy fuerte. El hecho de que en los cultivos primarios de células de RN la señal de 3C3 sea importante en las células que tienen extensiones neuríticas y nula en las células aplanadas, sugiere que *in vivo*, al menos en las etapas del desarrollo analizadas, este Acm debe reconocer solamente neuronas en el tejido nervioso. Esto también es sugerido, en forma más indirecta, por la observación hecha en cortes de RN, donde la membrana limitante externa, en la que participan las terminaciones ventriculares de las células de Müller, es totalmente negativa. En los cortes es difícil distinguir el resto del cuerpo de estas células gliales, dada su forma particular, que está determinada por la forma de las neuronas que las rodean. Como las células de Müller se ubican “rellenando” los intersticios de las neuronas y tienen poca superficie de contacto entre ellas mismas, siempre se va a encontrar señal de 3C3 alrededor de una de ellas, aunque pertenezca a las neuronas. El único punto donde son evidentes en cortes es, entonces, la membrana limitante externa y la ausencia de señal en ella es otra evidencia a favor de que las células de Müller no se marcan con el Acm 3C3..

La inmunohistoquímica y el Western-blot muestran también que el epítotope se encuentra en otros órganos del SNC, tales como el cerebro, el cerebelo, el tectum óptico y el tronco encefálico, sugiriendo que el Ag 3C3 se expresa en la mayor parte, sino todas, las neuronas en diferenciación. Además, la banda observada por Western-blot presenta las mismas características en todos estos tejidos, indicando que se trataría del mismo antígeno. Todavía no hemos explorado su distribución en estos órganos en animales adultos.

La presencia de filamentos 3C3-positivos en tejidos sumamente innervados, como la córnea y el músculo esquelético, sugiere que puedan ser axones y/o terminaciones nerviosas periféricas. Esta sería la única evidencia hasta el momento de que 3C3 es capaz de marcar elementos del sistema nervioso periférico, tales como axones de motoneuronas y terminaciones sensitivas, al menos en etapas embrionarias (E15-18).

Expresión del epítotope 3C3 en células no-neuronales:

Los ensayos de inmunohistoquímica muestran que ningún otro tipo de célula diferenciada, de las observadas hasta el momento (fibras musculares esqueléticas, condrocitos, fibroblastos, células epiteliales de diversos tipos, fibras cristalineanas, etc.), da una señal importante para 3C3. Todas las evidencias recogidas hasta el momento, indican que el epítotope se expresa de forma diferencial y en mucho mayor proporción en neuronas que en otras células del organismo. Esto no significa que no pueda existir, en menor proporción, en los otros tipos celulares y, de hecho, en muchos tejidos diferenciados se observa una señal que, aunque mucho más débil que en el tejido nervioso, es detectable por inmunofluorescencia, al menos en embriones tardíos. En algunos casos, como el de las fibras cristalineanas, la señal es homogénea en toda la población celular, y en cada célula se observa una marca que se extiende por toda la periferia, en otros, como el epitelio del cuerpo ciliar, o el epitelio y “annular pad” cristalineanos, solamente aparecen algunas células aisladas con señal positiva. Esto sugiere que el epítotope al que se une el Acm 3C3 no se encuentra exclusivamente en neuronas, aunque no es posible afirmar si se trata del mismo Ag, o si se trata de reactividad cruzada con otro que presenta un epítotope similar.

Regulación del epítotope 3C3 en el desarrollo:

La distribución ubicua de la señal dada por el Acm 3C3 en embriones tempranos, no sería un resultado interesante si no se supiera el comportamiento posterior de esta señal. Es difícil entender porqué ocurre una segregación posterior a las neuronas sin tener idea de cuál puede ser la función del o los Ags detectados por 3C3.

Resulta muy interesante investigar los mecanismos de esta expresión diferencial tan marcada, aunque no absoluta del epítotope. Si se trata en todos los casos

del mismo Ag, es decir la proteína de 72 KDa, estos cambios podrían explicarse en principio de dos maneras posibles: a) el epítipo podría sufrir ciertos cambios que hagan que sólo sea reconocido por el Acm en neuronas luego de la diferenciación celular, sin necesidad de que exista una regulación de la expresión de la proteína, o b) la proteína podría ser expresada y/o degradada diferencialmente. Los datos de que se dispone actualmente no son suficientes para determinar la importancia relativa de ambos mecanismos, que no son mutuamente excluyentes.

Existen algunas evidencias que apoyan la idea de que, al menos en la mayor parte de los casos analizados, el Acm 3C3 reconoce siempre el mismo Ag. El hecho de que desde las etapas más tempranas (E1.5) hasta las más tardías (P60) observemos una banda con las mismas características en Western-blot, sugiere que se trata del mismo Ag, que no es modificado de ninguna manera detectada por esta técnica (al menos no parece cambiar su peso molecular a lo largo del tiempo). Otra evidencia a favor de la identidad constante del antígeno reconocido en cada etapa del desarrollo es que el patrón de marcado subcelular en inmunocitoquímica, se mantiene de una manera extraordinaria, ya que tanto en células mesenquimatosas, como en fibras cristalíneas, como en células neuroepiteliales, como en neuronas, la señal es predominantemente periférica y en pequeños parches irregulares. Lo único que parece variar entre estas células es la intensidad de la marca.

La posibilidad de que el Acm 3C3 reconozca una única proteína que se expresa en forma diferencial en el desarrollo, sin cambiar atributos tales como la migración relativa en gel de SDS, es sumamente interesante, pero aún no es posible asegurar estrictamente que esto ocurra con el Ag 3C3.

Localización subcelular del epítipo de 3C3:

El experimento de marcado *in vivo* (es decir, sobre células en cultivo vivas) con el Acm 3C3 indica que muy probablemente el epítipo que reconoce se ubica intracelularmente. Seguramente la propia fijación con paraformaldehído y/o la incubación con BSA previas a la inmunodetección convencional son las responsables de permeabilizar las células lo suficiente como para permitir la entrada de las moléculas de Ig. Así, solamente las células vivas son capaces de excluir el Acm 3C3 e impedir que exista unión al epítipo. Si bien esta hipótesis es la más plausible, no se puede descartar la posibilidad de que el Ac no sea capaz de reconocer eficientemente al epítipo cuando

el Ag se encuentra en su forma nativa y que el PFA, por ejemplo, sea capaz de modificarlo de tal manera que lo vuelve más accesible.

Este experimento no es suficiente para localizar completamente al Ag con relación a la membrana plasmática, ya que tanto podría tratarse de una proteína no asociada a la membrana, pero ubicada en el interior celular cerca de ésta, como podría ser una proteína extrínseca de membrana, ubicada en la cara citoplásmica de la misma o también, una proteína transmembranaria, con el epítipo reconocido por 3C3 localizado en su sector citoplásmico. De tratarse de ésta última, esperaríamos que sea una proteína glucosilada, por lo cual el análisis de la presencia de grupos azúcar sobre el Ag 3C3 sería de importancia para resolver este problema. También podrían realizarse modificaciones de las proteínas sobre células vivas, con lo cual se afectarían sólo aquellas que tienen al menos una porción extracelular.

Distribución del Ag 3C3 en la RN del pollo:

Es importante diferenciar en primer lugar la descripción de la distribución del Ag 3C3 en el espacio de su variación temporal. La presencia y distribución del Ag en neuronas y su variación en el tiempo ya fueron discutidos. Resta por analizar su distribución con relación a las capas retinianas, que, como ya fue expresado, son un fiel reflejo de la organización funcional de la RN.

En embriones de 12 a 16 días, la señal de 3C3 se extiende por toda la RN, de forma casi homogénea. En conjunto, se ve que es mayor en las capas neuropílicas, lo cual es esperado para una molécula asociada a la periferia celular, ya que es allí donde la relación superficie/volumen de las células es mayor. En las capas nucleares, los núcleos y el pericarion ocupan la mayor parte de la célula, lo que puede resultar en una “dilución” de la señal.

También observamos una menor señal en sub-láminas delgadas de la plexiforme interna, que podrían corresponderse con las láminas sinápticas descritas originalmente por Ramón y Cajal. Estas son regiones de la plexiforme interna donde ocurren la mayor parte de las sinapsis entre distintos tipos de bipolares, amacrinas y ganglionares. Una señal baja en estas láminas podría ser explicada al menos de dos maneras: a) existe una menor cantidad del epítipo reconocido por 3C3 en la región sináptica de las neuronas o b) la relación superficie/volumen de las terminaciones sinápticas es más baja que en el resto de las prolongaciones neuríticas, causando el mismo efecto de dilución observado en las capas nucleares. Si bien los datos no son suficientes aún, en neuronas en cultivo,

la señal se ve distribuida homogéneamente por toda la periferia celular, incluyendo las terminaciones neuríticas, lo cual, con las reservas necesarias al comparar situaciones *in vitro* con situaciones *in vivo*, sugiere que la segunda posibilidad puede ser más creíble, aunque es importante tener en cuenta que las terminaciones neurales observadas *in vitro* no estaban formando sinapsis. Es interesante, además, que este patrón se mantiene a lo largo del desarrollo y se encuentra incluso en la RN adulta (P60).

En el adulto, las capas más externas de la RN no presentan señal, lo cual representa un hecho destacable, ya que implica un nuevo paso de regulación negativa de la presencia del epítotope de 3C3, que se suma al de la desaparición en las células no-neuronales. Los fotorreceptores en particular resultan totalmente negativos y la desaparición del epítotope en ellos podría correlacionarse con su diferenciación terminal, aunque faltan datos para asegurarlo. La disminución en la marca de las células más externas de la capa nuclear interna, incluyendo seguramente a las bipolares junto con las horizontales es también muy interesante. El resultado es que solamente se detecta una señal relativamente fuerte en las células más internas de esta capa (seguramente amacrinas) y en las ganglionares. Quedan por analizar muchos aspectos de esta restricción tan importante en la distribución del epítotope 3C3. En primer lugar, sería de interés demostrar la identidad de las células que lo retienen, mediante el uso de otros marcadores específicos de tipos celulares en la RN. En segundo lugar, más allá de no conocer la función del Ag, interesaría entender la relación existente entre ésta y su localización espacial. La pregunta primordial es si tiene que ver 3C3 con la función o identidad de las células en que se encuentra o con la posición de estas células dentro de la RN. Ya que en la RN las células se distribuyen en capas según su función, probablemente esta pregunta será difícil de responder. Tal vez una aproximación que permita responderla sea el análisis de la diferenciación celular *in vitro*, usando cultivos primarios de RN embrionaria de pollo de distintas edades y siguiendo el patrón de expresión del Ag 3C3 en distintos tipos celulares, identificados por medio de otros marcadores.

También resulta interesante correlacionar la expresión del Ag 3C3 con la distribución temporal de la diferenciación celular en la RN, ya que parece expresarse en mayor concentración y mantenerse a lo largo del desarrollo en las células que primero se diferencian (que tienden a ser las más internas). Sin embargo esta correlación no es aún válida, a la luz de los escasos datos obtenidos hasta el momento.

Algunas propiedades bioquímicas del Ag 3C3:

Como hemos demostrado por Western-blot, el Acm 3C3 reconoce siempre una única banda con una Mr de 72000 en RNs de diferentes edades, indicando que, al menos en la RN, se une a un sólo Ag. Que este Ag es una proteína es indicado por varias evidencias. Una de las más importantes es la alta sensibilidad que presenta al tratamiento con tripsina sobre cortes y en solución. Otros tratamientos sobre cortes que dieron resultado negativo, tales como la incubación con metanol-cloroformo durante media hora, que solubilizaría gran parte de los lípidos y tratamientos con ácido periódico y periodato de sodio, que pueden destruir por oxidación la mayor parte de los epítopes glucídicos, apoyan indirectamente esta suposición. Este último ensayo, por supuesto, no permite descartar que el Ag 3C3 pueda ser una glucoproteína, pero sugiere que el epítipo reconocido por el Acm puede encontrarse en la porción peptídica.

La migración del Ag 3C3 en SDS-PAGE no es afectada por la utilización de agentes reductores como el ditioneitol (DTT) o el β -mercaptoetanol, lo cual muestra que no se encuentra unido covalentemente a otras moléculas a través de puentes disulfuro. También sugiere que no forma puentes disulfuro intracatenarios que modifiquen mucho la estructura de la molécula, de otro modo se esperaría una alteración, al menos leve, de su movilidad relativa debida a cambios en su forma.

El Ag 3C3 no resultó solubilizable en solución salina, ya que tras la ultracentrifugación de un homogenato de RN embrionaria en PBS, se encuentra todo en el precipitado. Sí es soluble en detergente no-iónico en concentraciones superiores a la concentración micelar crítica (cmc), lo cual sugiere que:

- a) el Ag 3C3 puede encontrarse asociado a grandes complejos macromoleculares, como membranas biológicas o el citoesqueleto;
- b) esta unión debe darse mediante interacciones no covalentes que puedan ser liberadas por la acción de detergentes, tales como interacciones hidrofóbicas;
- c) el Ag 3C3 no debe formar parte del citoesqueleto, ya que es fácilmente solubilizado con Tritón X-100 (la insolubilidad de una proteína en este detergente es uno de los criterios usados para considerarla parte del citoesqueleto);
- d) la hidrofobicidad del Ag es probablemente alta, ya que requiere de la formación de micelas para solubilizarse.

En suma, el Ag 3C3 es muy probablemente una proteína, con un peso molecular aproximado de 72 ± 2 KDa y un pI relativamente ácido, de 4.2. No existen evidencias aún si es glucosilada, pero el epítipo reconocido por 3C3 seguramente no es de naturaleza glucídica. Parece estar asociada a complejos macromoleculares que, a juzgar por el patrón de distribución observado en inmunohistoquímica, podrían ser la membrana

plasmática o el citoesqueleto cortical. No hay que descartar tampoco la posibilidad de que se asocie a membranas internas subplasmalémicas de la célula. Esta asociación debe estar mediada por uniones relativamente débiles, como interacciones hidrofóbicas, iónicas o fuerzas de van der Waals, a juzgar por el hecho de que es fácilmente solubilizable por detergentes no iónicos. No hay evidencias acerca de la contribución relativa de estos tipos de unión, aunque los experimentos de extracción con detergentes sugieren una importante hidrofobicidad del Ag. Los datos disponibles no alcanzan tampoco para decir si el Ag es o no una proteína integral de membrana, y la única evidencia que hay respecto a su relación con la membrana plasmática indica que al menos el epítipo reconocido por el Acm es intracelular.

La aproximación que daría datos acerca de la identidad del Ag 3C3 en forma más directa, es la purificación a partir de tejido nervioso (RN y/o sistema nervioso central) de embrión de pollo y la determinación, al menos parcial, de su secuencia aminoacídica. Esto permitiría rápidamente comparar la secuencia obtenida con las de proteínas ya descritas y saber, al menos, si este Ag es o tiene similitudes con alguna proteína ya conocida. En caso de que esta comparación diera resultados totalmente negativos, sería de sumo interés obtener información acerca del gen que codifica la proteína. Si la proteína resultara similar, aunque no idéntica, a otra conocida, podríamos al menos inferir su función más probable.

Reactividad cruzada del Acm 3C3 con otras especies de vertebrados

El Acm 3C3 demostró ser capaz de reconocer Ags de distribución similar en otras especies de vertebrados, lo cual muestra que se une a un epítipo relativamente conservado. La señal más fuerte fue observada en la tortuga, donde presenta un comportamiento muy similar a su contrapartida en pollo. Resulta de sumo interés que en una RN en crecimiento constante como ésta, la región que permite este crecimiento constante y contiene, por lo tanto, células indiferenciadas de tipo neuroepitelial, presenta un patrón de marcado muy similar a la RN temprana del pollo. En el resto de la RN, sin embargo, la distribución de la señal recuerda a lo que se ve en el pollo post-natal. En el límite entre estas dos regiones, existe un gradiente de variación de la distribución que “recapitula” en cierto modo lo que observamos en el desarrollo del pollo.

Lo observado en cobayo, el único positivo de los cinco mamíferos ensayados, es, sin embargo, diferente a lo que se observa en la RN adulta del pollo. Aquí la mayor parte de la señal es detectable en los axones de las células ganglionares, mientras en el

pollo adulto, la mayor parte de la señal se ve en la capa plexiforme interna, con un marcado más débil en la capa de fibras del nervio óptico. Esta diferencia es llamativa y podría tener relación con la aún desconocida función del Ag 3C3. También parece existir algo de señal en capas más internas de la RN del cobayo, aunque esto es algo muy difícil de afirmar, ya que es sumamente débil cuando se compara con la de las fibras del nervio óptico.

La señal detectada en el reptil ápodo *Amphisbaena* es algo más difícil de interpretar, dado que el ojo es una estructura vestigial en estos animales de costumbres fosoriales. En este caso, si bien es posible distinguir un patrón laminado en la RN, las capas parecen estar menos desarrolladas. La marca dada por 3C3 se distribuye por todo el espesor de la RN, aunque parece ser más intensa en capa plexiforme interna.

El hecho de haber obtenido una señal positiva en al menos tres de las especies de vertebrados ensayadas resulta muy interesante, sobre todo teniendo en cuenta que el patrón de distribución en el espesor de la RN se mantiene relativamente constante. El punto en común es que en todos la señal es más intensa en la RN interna que en la externa. Los dos reptiles son los que presentan un patrón más parecido al del pollo, ya que en ellos la señal en el adulto es muy fuerte en la capa plexiforme interna. En la tortuga, la capa de fibras del nervio óptico también muestra una señal importante. No tenemos aún datos suficientes como para comprender si las diferencias encontradas en cobayo encierran alguna importancia real, ya sea desde el punto de vista filogenético como funcional.

El que no hayamos encontrado una señal positiva en cinco de las nueve especies ensayadas indica que el epítotope no es conservado entre todos los vertebrados, pero no dice nada respecto a qué ocurre con el Ag en sí. Esto es porque el epítotope reconocido por un Acm representa habitualmente una porción mínima de una proteína y bastaría un cambio muy pequeño en esa porción para que baje enormemente la afinidad de la unión. La mayor parte de estas especies (cuatro), son mamíferos, de las cuales una es la misma en que generamos el Acm y otra muy emparentada (rata), y no resulta extraño que el Acm 3C3 no sea capaz de reconocer ningún epítotope en ellas, ya que el sistema inmune del animal debería ser tolerante para Acs propios y, por extensión, Acs de especies cercanas (Abbas et al., 1991).

Una forma de poder analizar la presencia de este Ag en otras especies de una manera más eficiente sería generar anticuerpos policlonales contra el Ag 3C3 purificado de pollo. De esta manera aumentaría muchísimo la probabilidad de que exista reactividad cruzada entre especies, ya que se estarían reconociendo varios determinantes antigénicos a la vez, muchos de los cuales podrían ser más conservados que el del Acm 3C3. Esta sería, por la misma razón, una herramienta poderosísima como complemento

del Acm 3C3, en el análisis de distintos aspectos de la expresión y/o función del Ag en el desarrollo del pollo.

Comparación del Ag 3C3 con otros marcadores de la RN

Las características encontradas en el Ag 3C3 hasta el momento lo hacen único, ya que siempre existe al menos alguna que lo hace diferente a otras moléculas descritas que se expresan en el desarrollo de la RN.

El Acm PM1 (Hernández-Sánchez et al., 1994), por ejemplo, también reconoce un Ag de pollo que tiene una movilidad relativa en gel similar a 3C3 (el peso molecular aparente calculado por los autores es de 73000) y que se encuentra en la mayor parte, sino todas, las células neuroepiteliales de la copa óptica. Más tarde (a partir de los 5 días de desarrollo), este Acm es capaz de diferenciar algunas células neuroepiteliales de otras y luego, a medida que desaparece la señal de marcado con este Acm de las células neuroepiteliales, aparece en las células ganglionares que se van diferenciando. Una de las diferencias más importantes con 3C3 es que el Ag PM1 disminuye rápidamente su nivel de expresión general entre los 4 y los 12 días de desarrollo en la RN, mientras que ocurre exactamente lo contrario con 3C3, que presenta una expresión mucho más importante tras la diferenciación celular. Además, 3C3 se restringe a células ganglionares y, posiblemente, amacrinas recién en las etapas finales del desarrollo embrionario y no tempranamente como PM1.

RA4 es un Acm que reconoce un Ag que se expresa solamente en las células ganglionares desde muy poco después de su última división mitótica hasta el adulto en la retina del pollo, lo cual resultó útil para determinar que dichas células comienzan a expresar un antígeno de diferenciación específico inmediatamente después de su nacimiento (McLoon y Barnes, 1989; Waid y McLoon, 1995). Si bien este Ag se encuentra desde muy temprano en el neuroepitelio retiniano y luego se encuentra en células ganglionares, al igual que el reconocido por 3C3, su expresión es mucho más restringida, ya que el Ag 3C3 reconoce la mayor parte de (sino todas) las células neuroepiteliales y otros tipos celulares en la RN adulta.

En el pollo se han descrito tres proteínas ácidas específicas de neuronas, llamadas *drebrins*, que se asocian al citoesqueleto de actina y tienen, por lo tanto una localización subcortical, al igual que el epítipo de 3C3. Las tres proteínas son generadas por procesamiento alternativo del ARN a partir de un mismo gen y dos de estas isoformas (E_1 y E_2) son embrionarias, mientras que la restante (A) se encuentra en el adulto (Shirao et al., 1990). La menor de estas proteínas, drebrin E_2 , sin embargo, que tiene 553 aminoácidos, presenta un peso molecular aparente en SDS-PAGE de 95000 (Obata et al., 1987), lo cual excluye a cualquiera de estas proteínas como candidatas a ser el Ag 3C3. Además, las evidencias que existen hasta el momento indican que el Acm

3C3 reconoce una única proteína que mantiene un peso molecular constante a lo largo de todo el desarrollo.

Si el Ag 3C3 fuera una proteína transmembrana, podría pensarse en un rol en la adhesión celular. Se ha descrito una cadherina específica de tejidos neurales en el pollo, denominada R-cadherina (porque fue descubierta en la RN). Sin embargo, esta molécula de adhesión celular tiene un peso molecular calculado de su secuencia aminoacídica de unos 100 KDa (que probablemente sea más en gel, ya que está glucosilada), empieza a expresarse recién en E8 y se encuentra tanto en neuronas como en glía (Inuzuka et al., 1991). La N-cadherina, por otro lado, presenta una distribución muy similar al Ag 3C3 durante el desarrollo embrionario, comenzando por las primeras etapas y continuando por las etapas de diferenciación neuronal. Pero, hacia etapas finales del desarrollo se restringe a la membrana limitante externa, donde se encuentra formando parte de las uniones adherentes entre las terminaciones de las células de Müller y los fotorreceptores (Roark et al., 1992; Gilbert, 1997).

Otra molécula de adhesión celular, el Ag 5A11/HT7, comparte con el Ag 3C3 la característica de ser expresado por todas las células neuroepiteliales de la RN en etapas tempranas del desarrollo. Más tarde, al ocurrir la diferenciación celular, este Ag se restringe a las células de Müller (Fadool y Linser, 1993).

Jensen y Wallace (1997) mostraron que *Sonic hedgehog* (SHH), un factor difusible importante en distintos procesos morfogénéticos, se expresa en la RN en desarrollo del ratón. Allí, se encuentra primero en la región vítrea, asociado a las primeras células post-mitóticas y más tarde en células ganglionares y amacrinas. El ARNm de *Patched* (*ptc*), una proteína transmembrana que suele encontrarse en células adyacentes a las que expresan SHH, se encuentra en dominios adyacentes también en la RN (primero en la porción interna de la capa de neuroblastos y más tarde en la región central de la capa nuclear interna). La localización de SHH es, entonces, similar a la que muestra 3C3 en etapas avanzadas del desarrollo y en el adulto, sin embargo también presenta una distribución restringida en el desarrollo temprano, cuando 3C3 presenta una distribución generalizada.

A partir de una biblioteca de cDNA de embrión de pollo de 9 días, se aisló un gen, llamado *nel*, que codifica para una proteína transmembrana que se expresa en el neuroepitelio y otros tejidos en el desarrollo temprano, mientras que se restringe a tejidos neurales tales como la RN y el cerebro más tarde (Matsuhashi et al., 1995). Las diferencias con el Ag 3C3 son que la proteína codificada por este gen tiene un peso molecular, calculado a partir de la secuencia peptídica, de 93 KDa y que su distribución espacio-temporal exacta es muy diferente a la del Ag 3C3.

A pesar de que todas las moléculas descritas presentan suficientes diferencias con el Ag 3C3, como para excluir que sea alguna de ellas, la similitud existente en algunos aspectos con ellas, tales como la localización subcelular y/o el patrón de expresión espacio-temporal dentro de la RN permite especular acerca de la posible relación que pueda tener con alguna de ellas. Sobre todo, es interesante que existen varios marcadores moleculares de RN que se expresan en la porción interna de la RN desde etapas muy tempranas del desarrollo. Esto podría estar relacionado simplemente con el hecho de que ésta es la porción de la RN donde comienza la diferenciación celular. De acuerdo a la hipótesis de Adler acerca de la diferenciación celular por defecto de los fotorreceptores (Adler y Hatlee, 1989; Adler, 1993), al menos en el pollo, no sería extraño encontrar una mayor heterogeneidad molecular en la RN interna, donde serían más importantes las interacciones entre las células para determinar el destino de diferenciación celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos (Sección Biología Celular) de la Facultad de Ciencias, en colaboración con la Cátedra de Inmunología de la Facultad de Química. En este último laboratorio realizamos los procedimientos de generación de Acms, incluyendo inmunizaciones, fusiones, parte del proceso de screening, así como la purificación por afinidad del Acm 3C3. En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, por otra parte, realizamos el screening primario y el análisis del patrón de marcado de los Acms por inmunohistoquímica y la caracterización bioquímica del Acm 3C3 y su Ag.

1 - Animales

Para todos los procedimientos de generación de Acms utilizamos ratones de la cepa Balb/C, mantenidos en el bioterio de la Cátedra de Inmunología.

Los embriones de pollo fueron incubados a 100°F en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos, a partir de huevos fértiles donados por Granja Moro SA (Montevideo). Los pollos adultos fueron obtenidos de la Avícola Santa María (Montevideo).

2 - Generación de anticuerpos monoclonales

Básicamente, para generar Acms, utilizamos los procedimientos habituales, extensivamente descritos en la bibliografía (Kohler y Milstein, 1975; Galfrè y Milstein, 1981; Løvborg, 1982; Goding, 1983; Campbell, 1984; Harlow y Lane, 1988; Liddell y Cryer, 1991), con algunas modificaciones que son aclaradas en cada caso. En la Figura 18 se resumen los procedimientos de generación y producción de Acms utilizados en este trabajo.

2.1 - Inmunización

Inmunizamos varios lotes de ratones Balb/C hembra, con variantes en la forma de inocular el inmunógeno.

Como inmunógeno, utilizamos la RN de embriones de pollo de entre 12 y 13 días de incubación. La disección de la RN fue realizada en PBS de Eisen (solución salina con tampón fosfato, sin calcio ni magnesio, ver Apéndice), por abordaje anterior del globo ocular, separando en primer lugar córnea, iris, cristalino y cuerpo vítreo. Luego, separamos la RN cuidadosamente del epitelio pigmentario, al que se asocia en forma no demasiado estrecha en estas etapas del desarrollo. Usamos dos tratamientos diferentes para inocular el inmunógeno, de manera de ensayar aquel con el que se lograra una mejor respuesta de anticuerpos. En el primero (“retina fresca”), cortamos las RNs con dos escalpelos n° 11 (“chopping”) en trozos pequeños que colocamos a razón de 1 RN cada 500 μ l (volumen final) en PBS de Eisen para la inoculación inmediata. Así, esperábamos que la mayor parte de las células de RN se encontraran vivas en el momento de la inoculación. En el segundo (“retina fijada”), fijamos las RNs en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS de Eisen, durante 1:15 hs a 4°C y, tras varios lavados de 5 a 6 min. cada uno en un volumen abundante de PBS de Eisen, las trozamos finamente con dos bisturíes. Los fragmentos fueron resuspendidos en PBS de Eisen para la inoculación (1 RN/ 250 μ l, volumen final) y luego homogeneizados por sonicación, con 5 pulsos de 10 segundos a máxima potencia, en baño de hielo. El inmunógeno así preparado fue usado inmediatamente o guardado congelado a -20°C hasta el momento de su utilización.

Para las fusiones cuyos resultados se describen, inoculamos con retina fresca dos lotes de cinco ratones Balb/C hembra cada uno y con retina fijada otro lote, también de cinco ratones. De este último, tres ratones recibieron el inmunógeno en un volumen igual de adyuvante de Freund completo en la primera inoculación e incompleto en las

siguientes, mientras que los dos restantes fueron inoculados con el inmunógeno solo. En todos los casos las inoculaciones fueron por inyección intraperitoneal (IP), con una RN en 250 o 500 µl, según el caso. A todos los ratones les realizamos dos inoculaciones consecutivas, separadas por un lapso de 7 días y, según la respuesta de anticuerpos determinada ensayando los sueros de los animales a distintos tiempos mediante la técnica de ELISA (ver más adelante), algunos recibieron una o dos inoculaciones más antes de la fusión (ver Resultados). Para la obtención de los sueros, sangramos los animales antes de la primera inoculación y a distintos tiempos después, por extracción a partir del plexo retro-ocular con un tubo capilar. Luego de un breve período en que se permitió la coagulación, la sangre fue centrifugada y el suero resultante guardado a -20°C hasta su uso.

2.2 – Generación de líneas de hibridoma

2.2.1 – Obtención de las células

Las células del mieloma P3-X63-Ag8.653 (X63, Kearney et al., 1979, ATCC CRL 1580) fueron mantenidas en RPMI 1640 (Sigma Hybrimax) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Sigma Hybrimax), inactivado por incubación por 1 h a 56°C. Poco antes de la fusión las tratamos durante una semana con 8-azaguanina (Sigma) para eliminar posibles revertantes. El día de la fusión las lavamos en RPMI libre de suero, las contamos en cámara de Neubauer y determinamos el porcentaje de viabilidad celular por el método del Azul Tripán (ver más adelante). Seguimos adelante con el proceso de fusión sólo cuando el porcentaje de viabilidad celular era superior al 90%.

Para cada fusión, inoculamos un ratón (seleccionado sobre la base de la respuesta de Acs medida en suero por ELISA de células) con inmunógeno tres días antes de ser sacrificado para obtener los esplenocitos. El ratón fue sangrado, sacrificado por dislocación cervical e ingresado al cuarto de cultivo sumergido en etanol al 70%. El resto del procedimiento fue realizado en condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar. Tras la disección, colocamos el bazo en una placa de Petri de 60 mm con 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640. Los esplenocitos fueron aislados perforando la cápsula del bazo en varios sitios con una aguja e inyectando medio de cultivo repetidas veces, haciendo salir las células por las perforaciones de la cápsula. Lavamos la suspensión de células así obtenida tres veces en un volumen abundante de RPMI.

2.2.2 - Fusión

Mezclamos las células a razón de 4 células de bazo por cada una de mieloma y luego de ser centrifugadas en conjunto, realizamos la fusión a 37°C, agregando lentamente al sedimento celular 1 ml de polietilen-glicol (PEG 3000-3700, Sigma) al 50% en PBS 2x, pH 8.0 pre-calentado a 37°C. Luego de 1 min., resuspendimos las células muy lenta y cuidadosamente en RPMI sin SFB (agregando primero 1 ml durante 1 min. y luego 20 ml en 5 min.). Las células fusionadas fueron centrifugadas y resuspendidas nuevamente en RPMI suplementado con 20% SFB.

2.2.3 – Siembra, selección y cultivo de las células híbridas

Usamos dos procedimientos diferentes de siembra de células tras la fusión. En las primeras dos fusiones, usamos el método convencional, sembrando en placas de 96 pozos (Nunclon), a razón de 3×10^5 esplenocitos por pocillo. En las dos fusiones restantes, usamos un protocolo denominado “fusión-clonaje”, con el fin de aumentar la probabilidad de éxito en el mantenimiento de las células híbridas (L. Borsche, comunicación personal). En este caso, diluimos las células fusionadas a razón de 3.3×10^5 esplenocitos por ml. Fueron entonces sembrados 100 µl por pocillo de esta suspensión en placas de cultivo de 96 pocillos (3.3×10^4 esplenocitos por pocillo), junto con células “feeder” obtenidas de bazos de ratones no inmunizados, sembradas a razón de 3.0×10^5 células por pocillo. Se ha determinado empíricamente que las células híbridas viables quedan diluidas de tal manera al usar este procedimiento, que es muy grande la probabilidad de que ya se encuentren en forma de colonias monoclonales en los pocillos de las placas de cultivo.

Las células fueron puestas a incubar en estufa a 37°C, en atmósfera húmeda y con un 5% de CO₂ y, 24 hs después, agregamos 100 µl más de medio suplementado con SFB y con hipoxantina, aminopterina y timidina como medio selectivo (medio HAT, Sigma). Durante los primeros 15 días, mantuvimos las células en medio suplementado con HAT, luego retiramos la aminopterina, manteniendo la hipoxantina y la timidina (medio HT, Sigma) en dos o tres cambios de medio para permitir la adaptación de las células y finalmente usamos medio suplementado solamente con SFB.

Seguimos el crecimiento de colonias de células híbridas por observación periódica al microscopio y cuando éstas alcanzaron un tamaño suficiente ($1/4 - 1/2$ de la superficie del fondo del pocillo), generalmente entre 10 y 15 días después de la fusión, tomamos 100 μl del medio para ensayar la presencia de anticuerpos específicos para la RN (“screening primario”). Este ensayo fue realizado por ELISA sobre células en las dos primeras fusiones y por inmunofluorescencia en las últimas (ver más adelante). Pasamos las colonias que secretaban Ac de interés a recipientes de tamaño creciente y las mantuvimos en frascos de cultivo de 25 cm^2 en RPMI 1640 con 10% SFB y/o guardamos congeladas en nitrógeno líquido, suspendidas en 50% SFB, 40% RPMI 1640 y 10% dimetil-sulfóxido (DMSO), a razón de 5 a 10×10^6 cél/ml.

2.2.4 – Clonado por dilución límite

Finalmente, sometimos a las células a uno o dos pasos adicionales de clonado por dilución límite en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo (Nunclon). Para esto, contamos las células y realizamos diluciones crecientes, hasta llegar a sembrar una cantidad aproximada de 1 célula cada tres pocillos en una o dos filas de la placa. Con el fin de favorecer la sobrevivencia de los híbridos ante diluciones tan grandes, los incubamos en presencia de esplenocitos normales como “feeder layer”, en la misma cantidad que fuera usada para la fusión-clonaje (ver antes).

2.2.5 - Determinación de viabilidad celular

La suspensión de células en medio de cultivo fue centrifugada y el sedimento resuspendido en medio de cultivo sin suero o en una solución salina balanceada. En un tubo mezclamos 500 μl de solución de azul Tripán al 0.4% en PBS, 300 μl de PBS y 200 μl de la suspensión celular. Luego de mezclar bien por agitación, dejamos reposar por 5 a 15 min. La mezcla fue transferida a una cámara cuentaglóbulos de Neubauer para contar las células. Determinamos el porcentaje células viables como el número de células que no incorporaron el colorante respecto al número total de células.

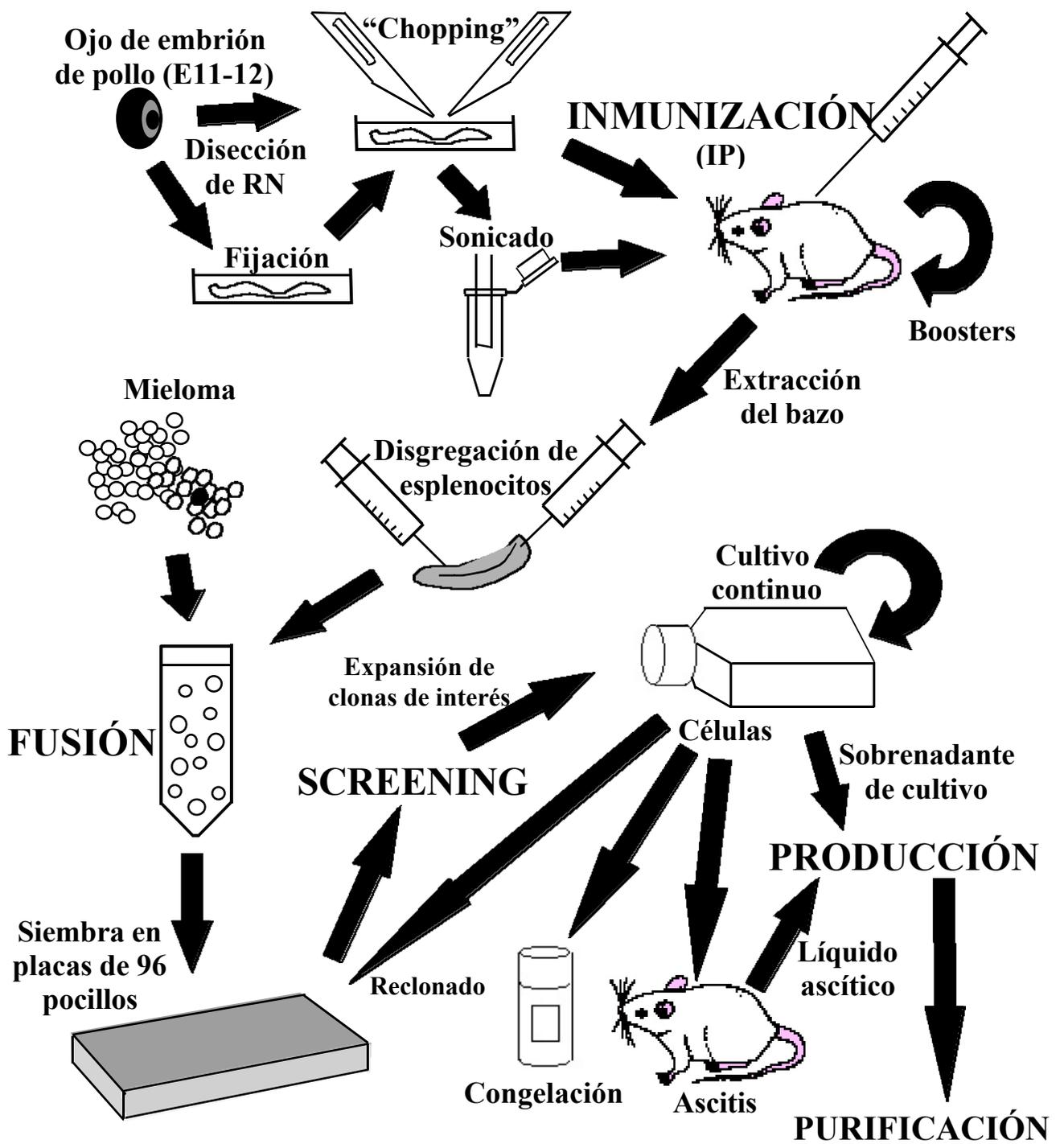


Figura 18: Representación esquemática de los procedimientos utilizados para la generación y producción de Acms. IP, intraperitoneal.

3 - Producción de los Acms

Los Acms de interés fueron producidos de dos maneras posibles: cultivando las células de hibridoma en frascos de 75 o 175 cm², en RPMI 1640 o DMEM suplementados con 10% SFB (Sigma Hybrimax o Gibco) inactivado o generando tumores ascíticos en ratones Balb/C. Uno de los Acms, 3C3, fue purificado por afinidad a partir de sobrenadante de cultivo.

3.1 – Producción de sobrenadante de cultivo de hibridoma

Como regla general, tomábamos el sobrenadante de cultivo cuando era evidente la acidificación del medio por virado del rojo fenol al amarillo (2 a 4 días después del último cambio de medio). Guardamos los sobrenadantes a 4°C o a -20°C, luego de ser centrifugados para eliminar las células y de agregarles NaN₃ al 0.02% (concentración final, solución madre 2%) y tampón tris-HCl pH 8.0 a una concentración final de 50 mM (solución madre 1 M) (Harlow y Lane, 1988).

3.2 – Producción de líquido ascítico

Para generar tumores ascíticos en ratones, les inyectamos intraperitonealmente 500 µl de pristane. Entre 10 y 20 días después, los animales recibieron una inoculación IP de 5 a 10 x 10⁶ células de hibridoma centrifugadas y resuspendidas en 500 µl de medio de cultivo sin SFB. Sacrificamos los ratones algunos días después, cuando presentaban una importante cantidad de líquido en la cavidad peritoneal, evidenciable desde el exterior. El líquido fue extraído con una jeringa, luego de separar la piel y dejar al descubierto la pared abdominal. Separamos las células del líquido ascítico por centrifugación y, en algunos casos, fueron vueltas a cultivar durante un tiempo. Luego, realizamos un procedimiento de deslipidificación del líquido, incubando por 10 min. en un 5% de sulfato de dextrano al 5% en agitación suave, seguido de una incubación con 9% de CaCl₂ 1 M por 10 min. y una centrifugación en minífuga (12000 rpm) por 20 min. (Aceti et al., 1989). El líquido ascítico (sobrenadante) fue entonces alicuotado y guardado a -20°C.

3.3 - Purificación del Acm 3C3

Purificamos el Acm 3C3 a partir de sobrenadante de cultivo, mediante una columna de afinidad conteniendo proteína G unida a sefarosa. Previo al pasaje por la columna, 1 l de sobrenadante centrifugado, conteniendo NaN_3 y buffer tris-HCl pH 8.0 (ver antes), fue filtrado en filtros Millipore de poro de $0.22\ \mu\text{m}$ para clarificarlo.

El procedimiento de purificación fue el siguiente: lavamos la columna (con un lecho de sefarosa-proteína G de 3.0 ml) con 2 volúmenes de glicina-HCl 0.1 M, pH 2.7 y luego con PBS de Eisen hasta que el pH a la salida fue de 7.2-7.4. Realizamos el pasaje del sobrenadante de cultivo a un flujo de alrededor de 0.75 ml/min. (unas 22 hs, tiempo total) a 4°C . Luego, lavamos extensivamente la columna con PBS, hasta que la DO_{280} a la salida fue menor que 0.05 unidades de absorbancia. El Ac fue eluido entonces, pasando unos 15 a 25 ml de glicina-HCl 0.1 M, pH 2.7 y recogiendo fracciones de 1 ml en tubos conteniendo $50\ \mu\text{l}$ de tris-HCl 2M, pH 11.

Medimos por DO_{280} la concentración aproximada de proteínas en cada fracción y guardamos aquellas que presentaban un valor mayor que 0.1 unidades de absorbancia. Luego de ser reunidas, estas fracciones fueron dializadas extensivamente por 24 hs en dos cambios de 2 l de PBS de Eisen, a 4°C . La solución fue guardada a 4°C , luego de ser filtrada en Millipore de $0.22\ \mu\text{m}$ en tubos estériles o de agregar NaN_3 al 0.02%.

4 - Métodos de ensayo de los Acms obtenidos

El método que utilizamos para analizar rápidamente la respuesta inmune de los ratones inoculados con RN, fue el enzimoimmunoensayo (ELISA, Nieto y Carbonetto, 1989) en placas sensibilizadas con células de RN.

Para el screening primario, utilizamos dos técnicas: el ELISA sobre células de RN y la inmunofluorescencia indirecta sobre cortes (Willingham, 1990). El ELISA fue la técnica seleccionada en las dos primeras fusiones y la inmunofluorescencia en las dos últimas. Los resultados obtenidos en estas fusiones, sugirieron que la segunda técnica es mucho más efectiva que la primera en el screening primario, ya que si bien es más laboriosa y permite el análisis de pocos sobrenadantes de cultivo diferentes por vez, permite detectar Acms de interés desde un primer momento según su patrón de marcado en el corte y no solamente según la intensidad de la señal (que en muchos Ac que resultaron de interés era mínima o inexistente en ELISA).

Finalmente, para la caracterización de los Acms obtenidos y sus Ags, utilizamos principalmente dos métodos: a) la inmunohistoquímica sobre cortes o células en cultivo y b) la inmunodetección sobre membranas de nitrocelulosa de muestras líquidas (“dot-blot”) o transferidas desde un gel de electroforesis (Western-blot).

4.1 - ELISA sobre células de RN

4.1.1 – Sensibilización de las placas

Las placas de ELISA (Nunc Maxisorp) fueron sensibilizadas con células de RN de embriones de pollo (Liddell y Cryer, 1991). Para esto, extrajimos RNs de embriones de pollo de 13 a 16 días de incubación por un procedimiento similar al descrito para la inmunización, en una solución salina sin calcio ni magnesio y con glucosa (CMFG, ver Apéndice) y disociamos las células por tratamiento controlado con tripsina, deteniendo su actividad por la adición de medio de cultivo suplementado con SFB al 10%. Luego de contarlas, lavamos las células dos veces en PBS y las sembramos a razón de 1×10^6 células por pocillo en 50 μ l de PBS en placas de ELISA pre-tratadas con poli-L-lisina 10 μ g/ml en PBS. Luego de incubar 1 h a 37°C en cámara húmeda, centrifugamos las placas a 100 g por 4 min., a temperatura ambiente y descartamos el sobrenadante. Las células fueron entonces fijadas a la placa mediante un tratamiento de 5 min. con 100 μ l de glutaraldehído al 0.1% en PBS y luego lavadas dos veces con volumen abundante de PBS. Los sitios de unión inespecíficos fueron saturados con 300

μl de gelatina al 0.25% en PBS, durante 30 min. a 37°C. Guardamos las placas así sensibilizadas con el buffer de saturación a 4°C, en cámara húmeda hasta el día siguiente o a -70°C por varios días.

4.1.2 – Protocolo de inmunodetección en ELISA

Para la inmunodetección, lavamos los pocillos 3 veces con 200 μl de PBS más Tween 20 al 0.05% (PBS-T, lavados de 5 min.) e incubamos con 100 μl de sobrenadantes de cultivo y/o sueros diluidos en BSA al 1 % en PBS-T (PBS-T-BSA), durante 1:30 hs a 37°C o toda la noche a 4°C, en cámara húmeda. El blanco fue hecho incubando una columna de pocillos con el mismo medio que se usó para mantener las células cuyo sobrenadante era ensayado (generalmente, RPMI 1640 con 10% SFB). Luego de los lavados con PBS-T (iguales a los anteriores), incubamos las placas con anticuerpos de cabra anti IgG y anti IgM de ratón conjugados a peroxidasa del rábano (HRP), diluidos 1/1000 en PBS-T-BSA, durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Finalmente, lavamos con PBS-T tres veces y una con PBS y revelamos la actividad peroxidasa incubando con 200 μl por pocillo de DMAB 40 mM, MBTH 0.8 mM y H₂O₂ 0.01% en agitación, a temperatura ambiente hasta que la reacción era visible. Usando un lector automático de ELISA, medimos los valores de absorbancia a 600 nm del contenido de los pocillos, generalmente luego de 10 a 20 min. de comenzada la reacción.

4.2 - Inmunolocalización *in situ*

Esta técnica fue usada tanto para el screening primario durante la generación de los Acms, como para analizar el patrón de distribución temporal y espacial de los antígenos reconocidos por algunos de ellos. En el caso del screening primario de las dos últimas fusiones y el análisis del patrón de marcado de la mayor parte de los Acms, usamos la inmunofluorescencia sobre cortes a congelación de piezas no fijadas. Para el Acm 3C3 en particular, usamos piezas fijadas, ya sea cortadas a congelación o tras la inclusión en parafina.

4.2.1 - Cortes a congelación

Para screening, usamos cortes a congelación de ojos enteros de embriones de pollo de 14 a 15 días de incubación, no fijados ni crioprottegidos e incluidos en OCT (Tissue-Tek, Miles Inc.).

Para otros usos, fijamos las piezas relativamente grandes (ej.: globos oculares enteros, fragmentos de órganos de embriones avanzados, embriones de más de 72 hs) en PFA al 4% en PBS por tiempos que variaron entre 1 h a temperatura ambiente y 24 hs a 4°C y las crioprotégimos por incubación en soluciones de sacarosa en PBS de concentración creciente, entre 5 y 20%. Las incubaciones en sacarosa fueron prolongadas hasta que la pieza quedara totalmente sumergida en la solución. Analizamos el patrón témporo-espacial de distribución del antígeno reconocido por el Acm 3C3 por inmunofluorescencia sobre cortes a congelación de piezas fijadas por 12 a 24 hs en PFA al 4% en PBS, a 4°C. Para congelar, sumergimos las piezas en OCT en moldes de aluminio del tamaño adecuado y las enfriamos con nitrógeno líquido en forma indirecta (ver figura 19). Cortamos las piezas inmediatamente o las guardamos hasta varios meses a -80°C.

Los embriones más pequeños (menos de 72 hs), fueron extraídos cuidadosamente del huevo, cortando la membrana vitelina alrededor y transfiriéndolos con un poco de vitelo a una placa de 60 mm con PBS, usando una cuchara de metal. Luego de separarlo del vitelo y de la membrana vitelina, transferimos cada embrión a una placa de 35 mm con PBS. Retiramos el PBS lentamente con una pipeta Pasteur, tratando que el embrión quedara aplanado y estirado sobre el fondo de la placa. Entonces, agregamos PFA 4%-PBS goteando lentamente alrededor del embrión para evitar que se plegara. Después fijar por 1 h a temperatura ambiente, lavamos los embriones tres veces por 15 min. en PBS. Los incubamos luego en sacarosa, primero al 5% y después al 20% en PBS, a 4°C, hasta que se sumergieron en dichas soluciones (en la última, toda la noche a 4°C). Realizamos una inclusión en gelatina de estos embriones, incubándolos hasta sumergirse en una solución de gelatina 7.5% y sacarosa 15% en PBS, a 38°C en la misma placa de Petri. Luego de dejar gelificar, primero a temperatura ambiente y después 4°C, cortamos un bloque del tamaño y forma adecuados, según la orientación deseada para los cortes histológicos. El bloque fue guardado a 4°C hasta 4 días o congelado inmediatamente usando nitrógeno líquido, como se muestra en la figura 19.

Realizamos los cortes (5 a 10 μm) a una temperatura de entre -20 y -23°C, según la temperatura del ambiente, las características de la pieza y el medio de inclusión y los levantamos directamente de la cuchilla con portaobjetos cubiertos con gelatina crómica

(gelatina 0.5%, alumbre de cromo 0.05%). Una vez en el portaobjetos, secamos los cortes de piezas incluidas en OCT al aire a temperatura ambiente, al menos por 1 h y luego los usamos inmediatamente o los guardamos a -80°C envueltos en papel de aluminio por hasta varios meses. Por otro lado, los de piezas incluidas en gelatina fueron dejados secar a -20°C por unas horas y luego guardados pocos días a 4°C hasta ser usados.

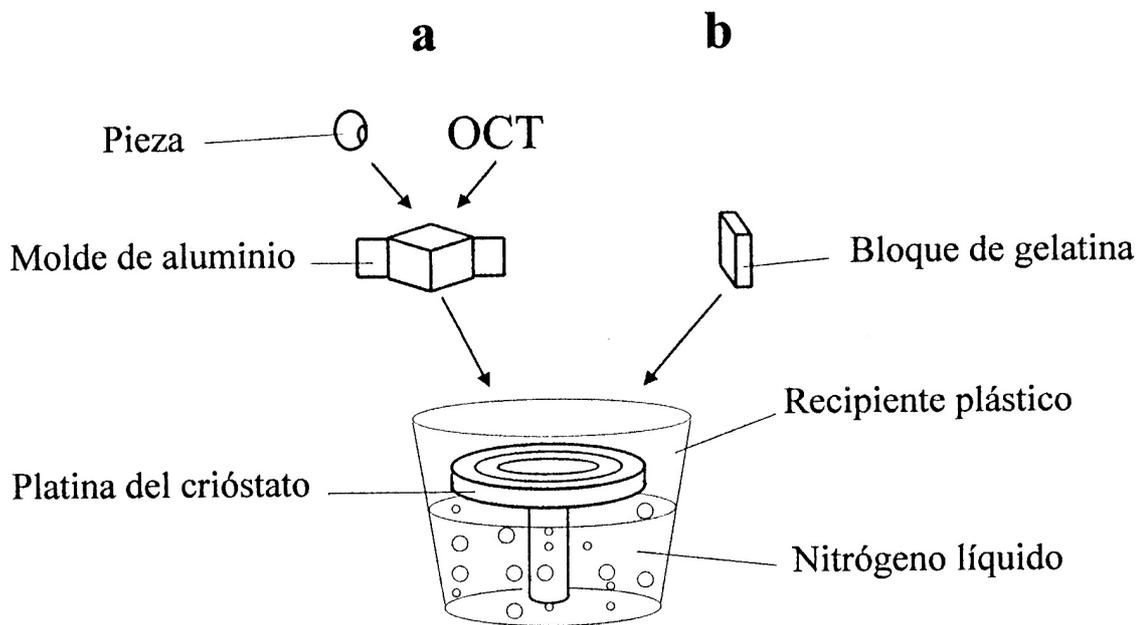


Figura 19: Congelación de piezas para ser cortadas en el crióstato. *a:* inclusión en OCT, *b:* piezas incluidas en gelatina.

4.2.2 - Cortes en parafina

Para ser incluidas en parafina, fijamos las piezas de tejido en PFA al 4% en PBS toda la noche a 4°C. Luego de lavar en agua destilada por 30 min., las deshidratamos en concentraciones crecientes de etanol, de 70, 95 y 100%, con baños de 30 min. en cada uno, más otro baño de 30 min. en etanol al 100%. En algunos casos, las piezas permanecieron varios días en alcohol 70%, antes de proseguir con la deshidratación. Tras tres baños de 30 min. cada uno en cloroformo, iniciamos la inclusión, que consistió en tres baños en parafina de 30 min. cada uno a 60°C. Los bloques fueron hechos usando barras de Leuckart, donde dimos orientación a las piezas y los guardamos a temperatura ambiente hasta cortarlos.

Los cortes de entre 3 y 5 μm fueron estirados en agua a 45°C y levantados en portaobjetos cubiertos con gelatina crómica. Los colocamos en una estufa a 37°C por unas horas para favorecer su adherencia y luego los guardamos a temperatura ambiente hasta ser usados.

4.2.3 - Inmunohistoquímica indirecta sobre cortes

Para comenzar el procedimiento, fue necesario extraer el medio de inclusión usado. Eliminamos el OCT mediante tres lavados en PBS, de 2 min. cada uno y la gelatina por incubación a 38°C durante 30 min. en PBS. Finalmente, eliminamos la parafina por solubilización en dos baños de xilol de 10 min. cada uno, a temperatura ambiente, seguidos de una hidratación en alcoholes de concentración decreciente.

En el caso de las piezas no fijadas, luego de remover el OCT, fijamos los cortes con PFA al 4% en PBS durante 10 min. a temperatura ambiente y los lavados con PBS (5 lavados de 2-3 min.).

Bloqueamos los sitios de unión inespecífica con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS por 30 min. a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Los cortes fueron entonces cubiertos con 50 μl de anticuerpo primario puro (sobrenadante de cultivo) o diluido en BSA 1%-PBS (suero, líquido de ascitis, anticuerpo purificado, sobrenadante de cultivo de hibridoma 3C3) e incubados por 1 h a 37°C, 2 hs a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, en cámara húmeda. Como control positivo en los ensayos de screening primario, utilizamos suero de ratones inmunizados con RN, diluido en BSA 1%-PBS. En todos los casos, como control negativo, utilizamos sobrenadante de cultivo de células de mieloma (X63) puro o diluido, según el caso. Luego de 5 lavados de 2-3 min. con PBS, los cortes fueron incubados por 1 h a 37°C o 2

hs a temperatura ambiente con un anticuerpo comercial de cabra anti IgG de ratón (H+L) conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). En el screening primario, usamos una dilución $1/150$ en BSA 1%-PBS de este Ac.

Para el Acm 3C3, usamos el sobrenadante de cultivo del hibridoma como Ac primario, ya sea puro o diluido hasta 40 veces en BSA 1%-PBS y el Ac conjugado diluido $1/200$ - $1/250$ en la misma solución.

Luego de la incubación de los cortes con el Ac secundario, realizamos 5 lavados en PBS, de 2 a 3 min. cada uno. En algunos casos, sustituimos el tercer lavado por una incubación en el colorante fluorescente Hoechst 33342 diluido en PBS, con el fin de obtener una adecuada contratinción nuclear.

Tras el montaje en glicerol al 90% en PBS y sellado de los bordes de los cubreobjetos con esmalte de uñas, observamos los preparados inmediatamente en un microscopio dotado de óptica de fluorescencia y luego los guardamos a -20°C hasta ser microfotografiados en un microscopio Nikon Microphot FXA.

4.2.4 – Inmunocitoquímica sobre células cultivadas

Obtención de cultivos de células de RN embrionaria: Extrajimos embriones de pollo de alrededor de 7 días de incubación del huevo en forma aséptica, tomándolos por el cuello con un pinza curva. Los ojos fueron extraídos retirando los tegumentos con pinzas y colocados en una placa, sumergidos en CMFG. Para acceder a la RN, cortamos la pared ocular alrededor de la córnea y ésta fue retirada, junto con el iris, cristalino y cuerpo vítreo. Opuesto a la cisura coroidea, realizamos un pequeño corte en el borde para luego abrir la esclerótica con dos pinzas a lo largo de la línea del corte. Sacamos las retinas cortando con la pinza a nivel de la cisura coroidea y las pasamos a una plaquita con poco CMFG. Luego de limpiarlas bien, las dejamos incubando en esta solución por 15 min. a temperatura ambiente. Entonces, transferimos las retinas a una solución de tripsina-EDTA (ver apéndice) y las incubamos por 20 a 22 min. a temperatura ambiente (tiempo variable según la edad del embrión). Concluido este tiempo, retiramos la tripsina rápidamente y agregamos un volumen adecuado de medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Disgregamos las retinas mecánicamente, pasándolas repetidas veces por la punta de una pipeta y sembramos las células así obtenidas en placas de cultivo según las necesidades. Para inmunodetección *in situ*, sembramos las células en placas de 35 o 60 mm, sobre un número variable de laminillas de vidrio. En otros casos, usamos placas múltiples de 24 pozos, o placas de Petri de 35 o 60 mm, pero sin laminillas. Las células fueron mantenidas a 37°C , en

atmósfera húmeda con CO₂ al 5% y realizamos cambios totales de medio cuando fue necesario.

Inmunofluorescencia sobre células en cultivo: Cultivamos las células explantadas de tejidos embrionarios sobre laminillas de vidrio por tiempos variables antes de procesarlas para inmunodetección. En primer lugar, lavamos el medio de cultivo en la propia placa de Petri, con tres cambios de PBS de 3 min. cada uno. Fijamos las células en PFA al 2 o al 4% en PBS por 1 a 2 hs a temperatura ambiente y luego las lavamos en PBS como antes. En algunos casos, permeabilizamos las células por tiempos variables (5 a 15 min.) con Tritón X-100 en PBS, en concentraciones de 0.1 a 0.5%. A partir del bloqueo de los sitios de unión inespecífica, realizamos el procedimiento con las laminillas colocadas en vidrios de reloj individuales y los pasos de la inmunodetección como se describiera para los cortes histológicos. Para el montaje, las laminillas fueron apoyadas invertidas sobre portaobjetos, de manera que la misma funcionara como cubreobjetos.

4.3 - Inmunolocalización sobre membranas de nitrocelulosa

Utilizamos este procedimiento para detectar la presencia de los Ags reconocidos por los Acms en muestras líquidas (“dot-blot”), en geles de electroforesis en presencia de SDS (“Western-blot”), así como en geles de isoelectroenfoque.

4.3.1 - Dot-blot

Aplicamos las muestras líquidas conteniendo proteínas (sin SDS) sobre un trozo de membrana de nitrocelulosa húmeda en PBS a la cual aplicamos presión negativa del otro lado, para forzar el pasaje del líquido a su través (ver figura 3). El volumen de las muestras varió de 1 a 50 µl. Luego de breves lavados en PBS, procesamos las membranas para inmunolocalización como se describe más adelante.

4.3.2 - Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y Western-blot

Preparación de la muestra: Solubilizamos las muestras de distintas procedencias de distintas maneras. Para extraer la mayor cantidad de proteínas posibles, las piezas de tejido o las células fueron solubilizadas en una solución de tris-HCl 10 mM, pH 7.2 conteniendo SDS al 2%. Dado el alto grado de celularización de la RN, así como la elevada relación núcleo-citoplasma de sus células, la lisis en SDS causa una liberación masiva de ADN. Ya que suele formar un gel bastante consistente, parte fue sacado directamente con una pinza. El resto fue generalmente fragmentado mediante sonicación. El antígeno 3C3 también fue extraído utilizando su alta solubilidad en detergentes no-iónicos, tales como Tritón X-100 o Nonidet P40. Uno de los procedimientos usados implicó la fijación de RNs aisladas en PFA al 4% por 1:30 hs a temperatura ambiente. Luego de extensivos lavados en PBS, incubamos varias RNs en agitación energética a temperatura ambiente en un volumen pequeño de Tritón X-100 al 0.2 % en PBS más PMSF 5 µg/ml como inhibidor de proteasas (ej.: 6 a 9 RNs en 500 µl), por 80 min. Finalmente, las centrifugamos en minífuga (13000 g) por 10 min. y guardamos el sobrenadante alicuotado a -20°C. De esta forma obtuvimos muestras conteniendo una gran cantidad del antígeno 3C3.

Para sembrar en el gel, mezclamos las muestras solubilizadas directamente en SDS con un 25% de buffer de muestra JP [ditiotreitól (DTT) 140 mg, glicerol 800 µl, agua bidestilada 800 µl y 3 cristales de bromofenol]. Por otro lado, las muestras no solubilizadas en SDS, fueron mezcladas con buffer de muestra van Blerkom 4x (SDS 8%, Tris-HCl 0.25 M pH 8.8, β-mercaptoetanol 20%, glicerol 50%, azul de bromofenol) en la misma proporción. Una vez hecho esto, incubamos todas las muestras a 100°C por 2 min. En el caso de no desear correr las muestras en condiciones reductoras, usamos los mismos buffers de muestra, pero sin DTT o β-mercaptoetanol.

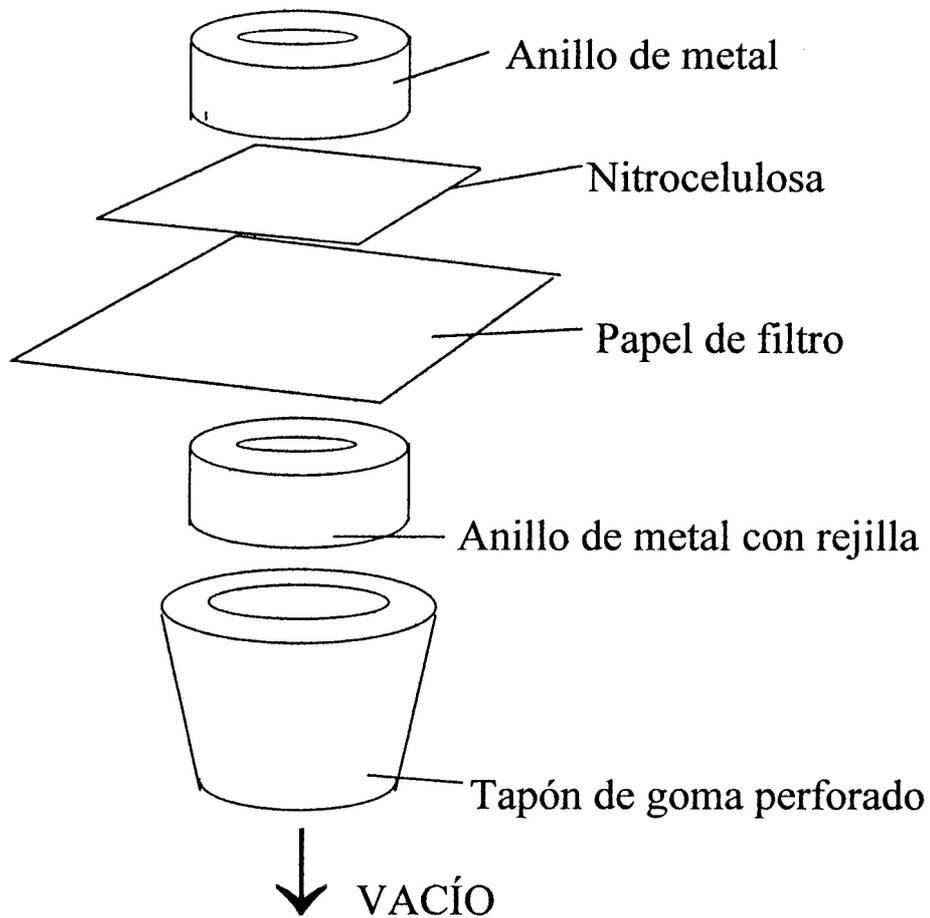


Fig. 20: *Dispositivo para la fijación de proteínas en nitrocelulosa para dot-blot. La muestra líquida es depositada lentamente sobre la nitrocelulosa a través del orificio del anillo metálico superior. Tanto la nitrocelulosa como el papel de filtro (Whatman 3MM) están humedecidos en PBS.*

Electroforesis: Sembramos las muestras en geles de poliacrilamida 8 a 15% de 0.75 a 1 mm de espesor, con 1.5 a 2 cm de gel de concentración (“stacking”) al 3% (ver apéndice) luego de realizar una pre-corrida de 15 min a 80 V. Realizamos la concentración (“stacking”) por 30 a 35 min a 80 V y la separación por 2:00 a 4:30 hs a 120 V. Como buffer de electroforesis, usamos Tris 50 mM pH 8.6, glicina 380 mM, SDS 0.1% (ver el apéndice para más detalles) (Laemmli, 1970; Dunbar, 1987).

Transferencia: Las proteínas separadas en los geles fueron transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Towbin et al., 1979), por 16 hs a 100 a 120 mA (alrededor de 40 V) en Tris 25 mM, glicina 190 mM, etanol 20%. Antes de comenzar la transferencia, equilibramos el gel en el buffer de transferencia por 15 min. Armamos un “sandwich” como aparece en la figura 21, que fue introducido en la cuba de transferencia con la membrana de nitrocelulosa dirigida hacia el ánodo. Al finalizar, coloreamos las membranas con rojo Ponceau S 0.2% en ácido tricloroacético (TCA) al 3% por 15 min a temperatura ambiente para verificar la presencia de proteínas. Decoloramos luego las membranas en PBS en agitación a temperatura ambiente antes de iniciar el procedimiento de inmunolocalización. Las proteínas restantes en el gel fueron visualizadas por tinción con Coomassie Blue R250 0,25 %, etanol 30%, ácido acético 7% por 1 h en agitación a temperatura ambiente y decoloración en etanol 30%, ácido acético 10% o en varios cambios de agua caliente. (Para detalles del procedimiento y soluciones usadas en SDS-PAGE, ver apéndice).

4.3.3 - IEF

Preparación de la muestra: Para analizar el punto isoelectrico del antígeno reconocido por el Acm 3C3, preparamos muestras de fracción soluble en Tritón X-100 (TX100) o Nonidet P40 (NP40) al 0.5% en PBS más PMSF 5 µg/ml. Para ésto, incubamos fragmentos finos de RN en dicha solución durante 30 min en agitación en hielo, a razón de 1 RN en 0.1 a 1 ml. Como muestra, utilizamos el sobrenadante luego de centrifugar en minífuga por 10 min.

Unos minutos antes de sembrar en el gel, mezclamos las muestras con dos volúmenes de buffer de muestra, conteniendo: urea 9.0 M, NP40 3%, β-mercaptoetanol 0.15%, anfólicas de rango amplio (pH 3,5 a 10 aprox.) 3.6% y anfólicas de rango estrecho (rango de pH variable) 0.9%. Cuando fue necesario explorar un

espectro de puntos isoeléctricos grande, usamos solamente anfolinas de rango amplio al 4.5%. Este buffer de muestra fue siempre preparado inmediatamente antes de ser usado.

Electroforesis: Cargamos las muestras en un gel horizontal (“flat bed”) de poliacrilamida al 5.25%, conteniendo urea 6.0 M, NP40 2%, anfolinas de rango amplio y estrecho (cuando fue necesario) 2.4 y 0.6% respectivamente, temed 0.075% y persulfato de amonio 0.025%.

Realizamos la electroforesis sobre una plancha de refrigeración horizontal, mantenida a 2.9°C. En el sistema usado, el ánodo contacta con un borde del gel a través de una tira de papel de filtro mojada en ácido fosfórico 1 N, mientras que el cátodo lo hace a través de uno mojado en hidróxido de sodio 1 N. La corrida fue realizada a potencia constante, según el tamaño del gel, entre 8 y 10 W, durante 2:30 a 3:00 hs.

Para conocer las características del gradiente de pH generado por las anfolinas, cortamos de cada gel una banda longitudinal (de electrodo a electrodo) de 1.5 cm de ancho, que luego dividimos en pequeños segmentos de 0.5 cm de largo. Incubamos cada uno de estos fragmentos en 0.5 ml de agua bidestilada a 4°C durante 24 hs. Luego de este tiempo, medimos el pH de cada tubo y construimos una curva estándar de pH sobre la cual calcular el pI de la proteína problema.

Transferencia: Luego, equilibramos el gel durante 15 min en buffer de transferencia, compuesto por ácido acético al 0.7% y etanol al 20%. Armamos un sandwich de transferencia similar al descrito para el SDS-PAGE, con la diferencia que la membrana de nitrocelulosa fue ubicada hacia el cátodo. La transferencia fue realizada a unos 200 mA (90 a 100 V) durante 2:30 a 3:00 hs (Wilson et al., 1982).

Después de finalizada, separamos cuidadosamente el gel y la nitrocelulosa y ésta fue coloreada con rojo Ponceau S por 15 min (ver antes). El procedimiento que sigue es igual que para el Western-blot.

4.3.4 – Protocolo de inmunodetección sobre nitrocelulosa

Incubamos las membranas conteniendo proteínas por 1:30 a 3 hs en leche en polvo descremada (Conaprole) al 5% en PBS (PBS-L5), a 37° o a temperatura ambiente en agitación, o toda la noche a 4°C para bloquear los sitios de unión inespecífica. Luego, las incubamos sin lavar en el sobrenadante de hibridoma puro o diluído hasta $1/100$ en leche al 1% en PBS (PBS-L1), o en líquido ascítico diluído en la misma solución por 1 h a temperatura ambiente, en agitación. Tras un lavado en PBS-L1 más 0.1% Tween 20 (PBS-L1-T) de 10 min y tres lavados de 5 min en PBS-L1, las incubamos en las mismas condiciones en un Ac de cabra anti-IgG de ratón (H+L), conjugado a peroxidasa, diluído 2500 veces en PBS-L1, durante 1:00 a 1:30 hs a temperatura ambiente, en agitación. Luego de varios lavados de 5 min en PBS-L1-T, PBS-L1 y PBS (tres lavados en cada uno), revelamos la presencia de peroxidasa por quimioluminiscencia (ECL, Amersham) sobre placas radiográficas. El tiempo de exposición varió, según la intensidad de la señal, entre 15 seg y 20 min.

4.3.5 - Determinación de peso molecular aparente y de punto isoeléctrico de las bandas detectadas

Para determinar el peso molecular aparente de las proteínas detectadas por Western-blot, incluimos en las electroforesis y transferencias marcadores de peso molecular comerciales (Sigma o Gibco BRL). Con las medidas de las distancias migradas por dichos marcadores (visualizados sobre la membrana de nitrocelulosa por tinción con Rojo Ponceau S) realizamos gráficos de logaritmo del peso molecular en función de la distancia de migración sobre los cuales calculamos por extrapolación el peso molecular aparente de las bandas inmunodetectadas.

El pI fue calculado a partir de la comparación de la posición final de las bandas inmunodetectadas con la medida del pH de segmentos contiguos del gel de 5.0 mm de largo. Dado que el IEF fue realizado en presencia de urea, realizamos un ajuste del valor así obtenido, restándole 0.42 (Ui, 1971).

5 - Análisis del Ag 3C3

Para caracterizar primariamente el Ag reconocido por el Acm 3C3, fueron realizados algunos procedimientos, cuyos resultados fueron puestos en evidencia ya sea por inmunolocalización *in situ* como sobre nitrocelulosa.

5.1 - Extracción con Tritón X-100

Realizamos diferentes ensayos de solubilidad del antígeno en el detergente no iónico Tritón X-100, tanto sobre cortes como sobre células en cultivo y retinas enteras.

5.1.1 - Células en cultivo

Explantamos células de RN de embriones de 7 días (E7) en placas de cultivo de 35 mm, a alta densidad celular ($\frac{1}{2}$ RN por placa) según el procedimiento descrito previamente. Luego de lavar el medio de cultivo de las placas con PBS Dulbecco frío, las incubamos durante tiempos variables (15 seg a 5 min) en 200 μ l de Tritón X-100 al 0.5% en buffer de extracción (ver apéndice), en hielo. Luego de quitar el sobrenadante (“fracción soluble”), al que agregamos inmediatamente SDS al 2% (concentración final), lavamos el residuo (“fracción insoluble”) con PBS Dulbecco frío y lo solubilizamos con 250 μ l de SDS al 2% en Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Ambas fracciones fueron posteriormente analizadas por Western-blot (ver antes).

5.1.2 - Cortes

Incubamos los cortes a congelación de ojos fijados en PFA 4% con TX100 diluído en PBS, por tiempos variables previo al procesamiento para inmunofluorescencia.

5.1.3 – Retinas enteras

Realizamos también extracciones del Ag 3C3 a partir de RNs enteras, ya sea trozadas con bisturíes (“chopping”) u homogeneizadas a mano en un homogeneizador Potter-Elvehjem. Para esto, las incubamos en agitación durante tiempos diferentes en soluciones de detergente en buffer de extracción o en PBS, con concentraciones de entre 0.005 y 0.5%. Cuando la extracción fue hecha a partir de fragmentos de RN fresca, realizamos la incubación en hielo y agregamos inhibidores de proteasas (5 $\mu\text{g/ml}$ o 1mM de PMSF, 1 mM EDTA y/o cocktail comercial “Complete” de Boheringer-Manheim) si el detergente se encontraba disuelto en PBS. Con el fin de analizar la extractabilidad del Ag en relación a la fijación, repetimos el procedimiento con RNs fijadas por hasta 1.5 hs en PFA al 4% en PBS (ver más arriba) y trozadas por “chopping”.

5.2 – Análisis de la naturaleza bioquímica del epítotope y el Ag 3C3

5.2.1 – Oxidación de glúcidos

Para estudiar la posibilidad de que el Acm 3C3 reconociera un epítotope glucídico, realizamos tratamientos oxidantes de glúcidos tales como la incubación con ácido peryódico o con periodato de sodio sobre cortes a congelación a partir de ojos fijados.

Tratamiento con ácido peryódico: Previo al procesamiento para inmunofluorescencia, incubamos los cortes de ojos fijados por tiempos variables con ácido peryódico al 1 o al 0.1% a temperatura ambiente.

Tratamiento con periodato de sodio: En este caso, lavamos los cortes con buffer acetato 0.2 M, pH 4.5 y luego los incubamos por 1 h a temperatura ambiente y en la oscuridad con NaIO_4 20 mM en el mismo buffer (tratamiento standard) o variando el tiempo entre 30 y 90 min y la concentración entre 10 y 40 mM. Después de lavar brevemente con buffer acetato, fueron incubados en las mismas condiciones, por 30 min en boro hidruro de sodio (NaBH_4) 50 mM en este buffer. Tras lavar extensivamente con PBS, los procesamos para inmunofluorescencia como de costumbre. Como controles, omitimos las incubaciones en uno u otro reactivo.

5.2.2 – Tratamiento con tripsina

Analizamos la posibilidad de que el Ag 3C3 sea sensible a proteasas mediante el uso de una enzima proteolítica general, la tripsina.

Incubamos los cortes de ojos fijados por tiempos variables con distintas concentraciones de tripsina (0.2, 1.0 y 2.0 mg/ml) diluida en PBS de Eisen (a partir de una solución stock de tripsina 5.0 mg/ml, ver Apéndice) y luego los procesamos para inmunofluorescencia con el Acm 3C3.

También realizamos digestiones en solución, agregando distintas concentraciones de enzima (500, 5 y 0.5 μ g/ml) a sobrenadantes (13.000 g) de extracciones con TX100 de RNs enteras e incubando a 37°C por 5 a 15 min. El resultado de estas digestiones fue analizado por Western-blot.

5.2.3 – Solventes orgánicos

La solubilidad del Ag 3C3 en solventes orgánicos fue probada con cloroformo-metanol (1:1) sobre cortes y con acetona sobre células en cultivo. Incubamos cortes de ojos fijados por media hora en cloroformo-metanol, a temperatura ambiente y las laminillas con células de RN embrionaria en cultivo primario con acetona por 5 min en hielo, luego de una fijación en PFA al 4% por 30 min. Ambas preparaciones fueron posteriormente procesadas para inmunofluorescencia con el Acm 3C3.

APÉNDICE

1 – Algunas soluciones utilizadas

A - PBS de Eisen*:

NaCl ----- 8.0 g
KCl ----- 0.2 g
Na₂HPO₄ ----- 2.3 g
KH₂PO₄ ----- 0.2 g
H₂O destilada ----- csp. 1 l

El pH debe estar entre 7.2 y 7.4.

*Solución de trabajo, es posible preparar una solución stock 5X. Ambas soluciones se guardan en heladera.

B - PBS de Dulbecco :

- NaCl ----- 8 g
- KCl ----- 0,2 g
- Na₂HPO₄ (12 H₂O) ----- 2,3 g
- KH₂PO₄ ----- 0,2 g
- CaCl₂ ----- 0,1 g
- MgCl₂ (6 H₂O) ----- 0,1 g
- Agua destilada ----- csp 1 l

Se disuelven en orden. pH 7,2 - 7,4

C – CMFG (“Calcium and Magnesium Free Glucose”):

- NaCl ----- 4.0 g
- KCl ----- 0.2 g
- NaHCO₃ ----- 0.29 g
- Glucosa ----- 0.5 g
- Agua tridestilada ----- csp 500 ml

La solución es esterilizada por filtración y guardada en heladera.

D – Tripsina-EDTA:

- NaCl ----- 4.0 g
- KCl ----- 0.2 g
- NaHCO₃ ----- 0.29 g
- Glucosa ----- 0.5 g
- EDTA ----- 0.1 g
- Tripsina ----- 0.25 g
- Agua tridestilada ----- csp 500 ml

La solución es esterilizada por filtración y guardada alicuotada a -20°C.

Solución 10× (5 mg/ml): agregar 450 mg de tripsina a 100 ml (volumen final) de la solución 1× (0.5 mg/ml).

D - Paraformaldehido (PFA) en PBS :

Calentar PBS de Eisen hasta 60°C y, agitando, agregar la cantidad adecuada (para 2 o 4%) de PFA lentamente.

Mantener agitando a 60°C, hasta que se disuelva totalmente.

Cuando se enfría, enrasar con PBS al volumen deseado.

E - Buffer de extracción en Tritón X-100 :

- Tris-HCl ----- 10 mM, pH7.5
- NaCl ----- 120 mM
- KCl ----- 30 mM
- EDTA ----- 0.1 mM
- DTT ----- 0.1 mM
- PMSF ----- 1 mM
- Tritón X100 ----- 0.5% *

*concentración variable según las necesidades

2 – SDS-PAGE:

A – Solución de acrilamida-bisacrilamida al 30%:

- Acrilamida ----- 15 g (30%)
- Bis acrilamida ----- 400 mg (0.8%)
- H₂O (bidestilada) ----- csp 50 ml

Disolver la acrilamida en el agua bidestilada, en un volumen final de unos 40 ml.

Cuando está completamente disuelta, agregar la bis-acrilamida.

Filtrar con Millipore si se ven partículas en suspensión.

Guardar en heladera, envuelto en papel de aluminio.

B - Tris 1.5 M, pH 8,8 (Para gel de separación):

- Tris ----- 18,15 g
- H₂O (bidestilada) ----- csp 100 ml

Disolver el Tris en unos 70 ml de agua, ajustar pH a 8,8 con HCl 1 N*, luego llevar a 100 ml con agua.

Guardar en heladera.

C - Tris 0.5 M, pH 6,8 (Para gel de stacking):

- Tris ----- 6 g
- Agua bidestilada ----- csp 100 ml

Disolver el Tris en unos 35 ml de agua, ajustar el pH con HCl 1 N

Ajustar el volumen a 100 ml con agua.

Guardar en heladera.

D - SDS 10%

- SDS ----- 5 g
- H₂O ----- csp 50 ml

Guardar a temperatura ambiente.

E – Buffer de corrida:

- Tris ----- 6 g
- Glicina ----- 28,8 g
- SDS ----- 1 g
- Agua bidestilada ----- csp 1 l

Disolver en orden, ajustar volumen a 1 l, y medir pH, que debe ser 8,6 (no se puede agregar nada para variar el pH).

Anotar en la botella el valor del pH medido.

Guardar a temperatura ambiente.

Este buffer puede ser reusado

F – Persulfato de amonio al 10 %

- Disolver 50 mg de persulfato de amonio en 500 ml de agua bidestilada.

Preparar inmediatamente antes de usar (puede guardarse en heladera, sólo por 24 hs.), o guardar alicuotado a -20°C .

G – Armado del gel:

1 – Ensamblado del cassette:

- poner las placas de vidrio con los separadores, a los que se les pasa una capa muy delgada de aceite de siliconas.

- apretar con pinzas, asegurándose de que no quede luz en las esquinas inferiores, entre los separadores.

- sellar los bordes con agar.

- colocar el cassette bien nivelado sobre la mesa.

2 - Preparación del gel:

a) Gel de separación:

SOLUCIONES	8%	10%	12%
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	4.0 ml	5.0 ml	6.0 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml
Agua bidestilada	7.25 ml	6.25 ml	5.25 ml
DESGASIFICAR			
SDS 10%	150 µl	150 µl	150 µl
Temed	7.5 µl	7.5 µl	7.5 µl
Persulfato de amonio 10%	75 µl	75 µl	75 µl

b) Volcar entre las placas con una pipeta de 10 ml, dejando espacio para el gel de stacking (se puede marcar con una línea el nivel definitivo, debe quedar 1 cm por debajo de los peines). Verificar que está bien nivelado.

c) Poner isobutanol saturado con agua sobre la superficie. Verificar que a los 15 a 20 min se haya contraído el gel (indica que comenzó la polimerización).

e) El gel de stacking se puede poner 1 h después: antes sacar el butanol y lavar dos veces con agua destilada.

f) Gel de stacking:

SOLUCIONES	3%	5%
Acrilamida-Bisacrilamida 30%	1.0 ml	1.7 ml
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	2.5 ml	0.93 ml
Agua bidestilada	6.5 ml	7.36 ml
DESGASIFICAR		
SDS 10%	100 µl	100 µl
Temed	10 µl	10 µl
Persulfato de amonio 10%	30 µl	50 µl

g) Llenar bien el cassette y colocar el peine, asegurándose que no queden burbujas.

El gel puede utilizarse luego de una a dos horas de preparado, o se puede dejar hasta el otro día, en un lugar fresco, envuelto en una bolsa de nylon negro y con agua para mantener la humedad.

H – Carga de las muestras y electroforesis:

- 1 - Sacar el peine y numerar los pocillos sobre la placa de vidrio
- 2 - Sacar las pinzas y el separador de la parte inferior del cassette.
- 3 - Poner grasa de silicona sobre la banda de goma de la cuba superior.
- 4 - Colocar el cassette con la placa que tiene una hendidura hacia la cuba superior.
- 5 - Poner buffer de corrida en la cuba superior, hasta cubrir totalmente los pocillos.

Verificar que el buffer no filtra hacia abajo.

6 - Poner buffer en la cuba inferior. Las burbujas que quedan debajo del gel se quitan tirando chorros de buffer con una jeringa con la aguja doblada.

7 - Realizar una precorrida de 15 min, a 80 V. Se debe ver el frente de persulfato, que migra rápidamente y se detiene la precorrida al llegar éste a unos 5 mm del borde inferior de los pocillos.

8 - Cargar las muestras rápidamente en los pocillos, usando una jeringa Hamilton.

9 - Corrida:

- Concentración: 20 a 35 min, a 80 a 100 V.
- Cuando el frente de bromofenol pasa unos 5 mm del límite entre los geles de concentración y separación, aumentar el voltaje a 120 a 140 V.
- La separación dura entre 1:30 y 4 hs. (depende de las proteínas que se estudien y la concentración y largo del gel).

10 - Al finalizar la corrida, desarmar el sistema lo más rápido posible y marcar con un corte una esquina del gel. Si no es necesario, separar el gel de concentración y deshecharlo.

El gel está listo para ser sometido a una transferencia electroforética o para la tinción inmediata.

I – Coloración del gel con Azul Brillante de Coomasie (CBB) R250:

1 – Preparación del colorante (250 ml):

- Etanol ----- 30% (75 ml)
- Acido acético ----- 7% (17,5 ml)
- CBB R250 ----- 0,25 % (0,62 g)

Disolver el CBB en agua, agitando durante varios minutos. Agregar el etanol y el ácido acético y enrasar con agua a 250 ml.

2 – Preparación del decolorante:

- Etanol ----- 30% (hasta 40%)
- Acido acético ----- 10%

NOTA: Tanto el colorante como el decolorante pueden prepararse usando metanol, pero teniendo la precaución de usar el mismo alcohol en todas las soluciones.

3 – Procedimiento de coloración:

a) Colorear con CBB R 250, durante 1 hora (cuando el colorante es nuevo).

b) Decolorar en la solución decolorante. Generalmente el proceso de decoloración lleva varias horas. Es necesario realizar cambios del decolorante, que se satura fácilmente. Se puede acelerar colocando trozos de espuma de poliuretano, que adsorben el colorante. El decolorante es reusable, siempre y cuando sea filtrado con carbón activado.

También es posible decolorar el gel incubándolo en agua caliente (recién hervida). Realizando varios cambios de agua, la decoloración tarda sólo unos minutos.

Si el gel no queda bien coloreado, o se destiñe mucho, se puede volver a colorear.

J – Almacenamiento del gel:

El gel puede guardarse sumergido en ácido acético al 7 % en un recipiente plástico a temperatura ambiente o drenado, en una bolsa de nylon cerrada, en la heladera. También se puede secar envolviéndolo en celofán sobre un vidrio para evitar deformaciones.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Lichtman AH y Pober JS (1991) - Cellular and molecular immunology - W.B. Saunders Company, USA.
- Aceti A, Celestino D, Teggi A, Caferro M, Pennica A, Grilli A, Sebastiani A y De Rosa F (1989) - Histamine release test in the diagnosis of human hydatidosis - Clin. Exp. Allergy 19: 335-339.
- Adler R (1993) - Determination of cellular types in the retina - Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 34: 1677-1682.
- Adler R y Hatlee M (1989) - Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis - Science 243:391-393.
- Ahmad I, Dooley CM y Polk DL (1997) - Delta-1 is a regulator of neurogenesis in the vertebrate retina - Dev. Biol. 185: 92-103.
- Albini A, Noonan DM, Melchiori A, Fassina GF, Percario M, Gentleman S, Toffenetti J y Chader GJ (1992) - Laminin-induced retinoblastoma cell differentiation: possible involvement of a 100-kDa cell surface laminin-binding protein - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2257-2261.
- Altshuler D y Cepko C (1992) - A temporally regulated, diffusible activity is required for rod photoreceptor development in vitro - Development 114: 947-957.
- Altshuler D, Lo Turco JJ, Rush J y Cepko C (1993) - Taurine promotes differentiation of a vertebrate retinal cell type in vitro - Development 119: 1317-1328.
- Arikawa K, Molday LL, Molday RS y Williams DS (1992) - Localization of peripherin/*rds* in the disk membranes of cone and rod photoreceptors: relationship to disk membrane morphogenesis and retinal degeneration - J. Cell Biol. 116: 659-667.
- Arruti C y Cirillo A (1995) - Effects of suramin and FGF2 on neural retina cells - Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36: S255.
- Austin CP, Feldman DE, Ida JA y Cepko CL (1995) - Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of *Notch* - Development 121: 3637-3650.
- Barnstable C (1980) - Monoclonal antibodies which recognize different cell types in the rat retina - Nature 286: 231-235.
- Bormann J y Feigenspan A (1995) - GABA_C receptors - Trends Neurosci. 18: 515-519.

- Boxberg YV, Deiss S y Schwarz U (1993) - Guidance and topographic stabilization of nasal chick retinal axons on target-derived components in vitro - *Neuron* 10: 345-357.
- Brackenbury R, Thiery JP, Rutishauser U y Edelman GM (1977) - Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding – *J. Biol. Chem.* 252: 6835-6840.
- Brückner K, Pasquale EB y Rüdiger K (1997) - Tyrosine phosphorylation of transmembrane ligands for Eph receptors - *Nature* 275: 1640-1643.
- Buskirk DR, Thiery J-P, Rutishauser U y Edelman GM (1980) - Antibodies to a neural cell adhesion molecule disrupt histogenesis in cultured chick retinae - *Nature* 285: 488-489.
- Camu W y Henderson CE (1992) - Purification of embryonic rat motoneurons by panning on a monoclonal antibody to the low-affinity NGF receptor - *J. Neurosci. Methods* 44: 59-70.
- Campbell AM (1984) - *Monoclonal Antibodies Technology - The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas* - Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.
- Cirillo A, Arruti C, Courtois Y y Jeanny J-C (1990) - Localization of basic fibroblast growth factor binding sites in the chick embryonic neural retina - *Differentiation* 45: 161-167.
- Cole GJ, Bond R y Glaser L (1986) - Monoclonal antibodies specific for ganglion cells in the embryonic chicken neural retina - *Brain Res.* 391: 133-143.
- Cohen J, Burne JF, Winter J y Bartlett P (1986) - Retinal ganglion cells lose response to laminin with maturation - *Nature* 322: 465-467.
- Cohen J, Nurcombe V, Jeffrey P y Edgar D (1989) – Developmental loss of functional laminin receptors on retinal ganglion cells is regulated by their target tissue, the optic tectum – *Development* 107: 381-387.
- Cuadros MA, García-Martín M, Martín C y Ríos A (1991) - Haemopoietic phagocytes in the early differentiating avian retina - *J. Anat.* 177 : 145-158.
- de Curtis I y Reichardt LF (1993) - Function and spatial distribution in developing chick retina of the laminin receptor α_1 and its isoforms - *Development* 118: 377-388.
- DeSimone D (1994) - Adhesion and matrix in vertebrate development - *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 747-751.

- De Vries SH y Baylor DA (1993) - Synaptic circuitry of the retina and olfactory bulb - Cell 72 / Neuron 10 (Suppl.): 139-149.
- Dorsky RI, Rapaport DH y Harris WA (1995) - *Xotch* inhibits cell differentiation in the *Xenopus* retina - Neuron 14: 487-496.
- Dräger UC (1983) - Coexistence of neurofilaments and vimentin in a neurone of adult mouse retina - Nature 303: 169-172.
- Drazba J, Pierce M y Lemmon V (1991) - Studies of the developing chick retina using monoclonal antibody 8A2 that recognizes a novel set of gangliosides - Dev. Biol. 145: 154-163.
- Dunbar, BS (1987) - Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques - Plenum Press, New York.
- Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM y Yamada T (1992) - Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1* - Science 256: 1555-1560.
- Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT y La Vail MM (1990) - Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor - Nature 347: 83-86.
- Fadool JM y Linser PJ (1993) - 5A11 antigen is a cell recognition molecule which is involved in neuronal-glial interactions in avian retina - Dev. Dynamics 196: 252-262.
- Finnegan SG, Lemmon VP y Koenig E (1993) - Monoclonal antibody 8A2-induced retraction appears to be mediated by protein phosphorylation in goldfish retinal ganglion cell axons - Dev. Biol. 156: 230-242.
- Fry KR y Lam DM (1986) - Specific labelling of ganglion cells in the cat retina by a monoclonal antibody - Vision Res. 26: 373-382.
- Galli-Resta L, Resta G, Tan SS y Reese BE (1997) - Mosaics of *islet-1*-expressing amacrine cells assembled by short-range cellular interactions - J. Neurosci. 17: 7831-7838.
- Gilbert SF (1997) - Developmental Biology - 5ª edición - Sinauer Associates, Inc., USA.
- Galfrè G y Milstein C (1981) - Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures - Methods in Enzimology 73: 3-47.
- Goding JW (1983) - Monoclonal Antibodies: Principles and Practice - London Academic Press, Londres.

- Griffiths AD (1993) - Production of human antibodies using bacteriophage - *Curr. Opin. Immunol.*, 5 :263-267.
- Guillemot F y Cepko CL (1992) - Retinal fate and ganglion cell differentiation are potentiated by acidic FGF in an *in vitro* assay of early retinal development - *Development* 114: 743-754.
- Grunwald GB, Fredman P, Magnani JL, Trisler D, Ginsburg V y Nirenberg M (1985) - Monoclonal antibody 18B8 detects gangliosides associated with neuronal differentiation and synapse formation - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4008-4012.
- Hageman GS, Kirchoff-Rempe MA, Lewis GP, Fischer SK y Anderson DH (1991) - Sequestration of basic fibroblast growth factor in the primate retinal interphotoreceptor matrix - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6706-6710.
- Halfter W (1989) - Antisera to basal lamina and glial endfeet disturb the normal extension of axons on retina and pigment epithelium basal laminae - *Development* 107: 281-297.
- Halfter W (1993) - A heparan sulfate proteoglycan in developing avian axonal tracts - *J. Neurosci.* 13: 2863-2873.
- Halfter W y Schurer B (1994) - A new heparan sulfate proteoglycan in the extracellular matrix of the developing chick embryo - *Exp. Cell Res.* 214: 285-296.
- Hamburger V y Hamilton HL (1951) - A series of normal stages in the development of the chick embryo - *J. Morph.* 88: 49-92.
- Harlow E y Lane D (1988) - *Antibodies, A Laboratory Manual* - Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- Hatta K, Okada TS y Takeichi M (1985) - A monoclonal antibody disrupting calcium-dependent cell-cell adhesion of brain tissues: Possible role of its target antigen in animal pattern formation - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 2789-2793.
- Hawkes R, Niday E y Matus A (1982) - Monoclonal antibodies identify novel neural antigens - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2410-2414.
- Hernandez-Sanchez C, Frade JM y de la Rosa EJ (1994) - Heterogeneity among neuroepithelial cells in the chick retina revealed by immunostaining with monoclonal antibody PM1 - *Eur. J. Neurosci.* 6: 105-114.
- Hicks D y Molday RS (1986) - Differential immunogold-dextran labeling of bovine and frog rod and cone cells using monoclonal antibodies against bovine rhodopsin - *Exp. Eye Res.* 42: 55-71.

- Hockfield S (1987) - A Mab to a unique cerebellar neuron generated by immunosuppression and rapid immunization - *Science* 237: 67-70.
- Hockfield S y McKay RDG (1983) – A surface antigen expressed by a subset of neurons in the vertebrate central nervous system - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5758-5761.
- Hoogenboom HR, Marks JD, Griffiths AD y Winter G (1993) - Building antibodies from their genes - *Rev. Fr. Transfus. Hémobiol*, 36: 19-47.
- Holash JA y Pasquale EB (1995) - Polarized expression of the receptor protein tyrosine kinase Cck5 in the developing avian visual system - *Dev. Biol.* 172: 683-693.
- Holash JA, Soans C, Chong LD, Shao H, Dixit VM y Pasquale EB (1997) - Reciprocal expression of the Eph receptor Cck5 and its ligand(s) in the early retina - *Dev. Biol.* 182: 256-269.
- Hunter DD, Shah V, Merlie JP y Sanes JR (1989) - A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction - *Nature* 338: 229-234.
- Hunter DD, Murphy MD, Olsson CV y Brunken WJ (1992) - S-laminin expression in adult and developing retinae: a potential cue for photoreceptor morphogenesis - *Neuron* 8: 399-413.
- Hyatt GA, Schmitt EA, Fadool JM y Dowling JE (1996) - Retinoic acid alters photoreceptor development in vivo - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13298-13303.
- Inuzuka H, Miyatani S y Takeichi M (1991) - R-cadherin: a novel Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina - *Neuron* 7: 69-79.
- Jaffredo T, Horwitz AF, Buck CA, Rong PM y Dieterlen-Lievre F (1988) - Myoblast migration specifically inhibited in the chick embryo by grafted CSAT hybridoma cells secreting an anti-integrin antibody - *Development* 103: 431-446.
- Jay DG (1988) - Selective destruction of protein function by chromophore-assisted laser inactivation - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5454-5458.
- Jensen AM y Wallace VA (1997) - Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina - *Development* 124: 363-371.
- Kandel ER, Schwartz JH y Jessell TM (1995) - *Essentials of neural science and behavior* - Appleton & Lange, USA
- Kearney JF, Radbruch A, Liesegang B y Rajewsky K (1979) - A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines - *J. Immunol.* 123: 1548-1550.

- Kelley MW, Turner JK y Reh TA (1995) - Ligands of steroid/thyroid receptors induce cone photoreceptors in vertebrate retina - *Development* 121: 3777-3785.
- Kenny D, Bronner-Fraser M y Marcelle C (1995) - The receptor tyrosine kinase QEK5 mRNA is expressed in a gradient within the neural retina and the tectum - *Dev. Biol.* 172: 708-716.
- Knight JK y Raymond PA (1990) - Time course of opsin expression in developing rod photoreceptors - *Development* 110: 1115-1120.
- Köhler G y Milstein C (1975) - Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity - *Nature* 256: 495-497.
- Kolb H (1994) - The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina (The Proctor Lecture) - *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 : 2385-2404.
- Kuwabara T (1983) - en *Histology, Cell and Tissue Biology*, 5^a ed., L. Weiss - Elsevier Science Publishing Co., Inc., USA.
- Laemmli, UK (1970) - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 - *Nature*, 227: 680-688.
- Lagenauer C y Lemmon V (1987) - An L1-like molecule, the 8D9 antigen, is a potent substrate for neurite extension - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7753-7757.
- Larison KD y BreMiller R (1990) - Early onset of phenotype and cell patterning in the embryonic zebrafish retina - *Development* 109: 567-576.
- Layer PG (1983) - Comparative localization of acetylcholinesterase and pseudocholinesterase during morphogenesis of the chicken brain - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 6413-6417.
- Layer PG y Sporns O (1987) - Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 284-288.
- Lemmon V y Gottlieb DI (1982) - Monoclonal antibodies selective for the inner portion of the chick retina - *J. Neurosci.* 2: 531-535.
- Lemmon V y McLoon SC (1986) - The appearance of an L1-like molecule in the chick primary visual pathway - *J. Neurosci.* 6: 2987-2994.
- Liddell JE y Cryer A (1991) - *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies* - John Wiley & Sons, England.

- Lillien L y Cepko C (1992) - Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF β - Development 115: 253-266
- Lillien L (1995) - Changes in retinal cell fate induced by overexpression of EGF receptor - Nature 377: 158-162.
- Løborg U (1982) - Monoclonal Antibodies: Production & Maintenance - William Heineman Medical Books, London.
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG Schieffer E y Bernstein KE (1995) - Electroporation of pp60c-src antibodies inhibits the angiotensin II activation of phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells - J. Biol. Chem. 270: 15734-15738.
- Mathew WD y Sandrock AW (1987) - Cyclophosphamide treatment used to manipulate the immune response for the production of monoclonal antibodies - J. Immunol. Meth. 100: 73-82.
- Matsubishi S, Noji S, Koyama E, Myokai F, Ohuchi H, Taniguchi S y Hori K (1995) - New gene, nel, encoding a M(r) 93 K protein with EGF-like repeats is strongly expressed in neural tissues of early stage chick embryos - Dev. Dynamics 203: 212-222.
- McKay RDG y Hockfield SJ (1982) - Monoclonal antibodies distinguish antigenically discrete neuronal types in the vertebrate central nervous system - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6747-6751.

- McLoon SC y Barnes RB (1989) - Early differentiation of retinal ganglion cells: an axonal protein expressed by pre migratory and migrating retinal ganglion cells - *The J. Neurosci.* 9: 1424-1432.
- McLoon SC (1991) - A monoclonal antibody that distinguishes between temporal and nasal retinal axons - *J. Neurosci.* 11: 1470-1477.
- Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW y Barres BA (1995) - Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture - *Neuron* 15: 805-819.
- Mudhar HS, Pollock RA, Wang C, Stiles CD y Richardson WD (1993) - PDGF and its receptors in the developing rodent retina and optic nerve - *Development* 118: 539-552.
- Müller BK y Bonhoeffer F (1995) - Spatially and temporally defined molecular knockouts - *Curr. Biol.* 5:1255-1256.
- Neophytou C, Vernallis A., Smith A y Raff M (1997) - Müller-cell-derived leukaemia inhibitory factor arrests rod photoreceptor differentiation at a postmitotic pre-rod stage of development - *Development* 124: 2345-2354.
- Nieto A y Carbonetto CH (1989) - Enzimoinmunoensayo (ELISA) - en Margni, *Inmunología e Inmunoquímica* - 4ª ed., Editorial Médica Panamericana.
- Obata K, Shirao T, Kojima N y Tanaka H (1987) - Molecular events associated with neural development - *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* 41: 3-7.
- Price J, Turner D y Cepko C (1987) - Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 154-160.
- Rabacchi SA, Neve RL y Dräger UC (1990) - A positional marker for the dorsal embryonic retina is homologous to the high-affinity laminin receptor - *Development* 109: 521-531.
- Ramón y Cajal S (1911) – *Histologie du système nerveux de l’homme et des vertébrés – Vol. 2 – A. Maloine, Paris.*
- Raviola E (1995) - El ojo, en *Tratado de Histología de Bloom Fawcett*, 12ª edición - Fawcett DW, ed.; Madero S., Serrano B y Camps P, trad. - Interamericana/McGraw-Hill, España.
- Reh TA, Nagy T y Gretton H (1987) - Retinal pigmented epithelial cells induced to transdifferentiate to neurons by laminin - *Nature* 330: 68-71.
- Reiss Y, Kröger S, Grassi J, Tsim KWK, Willbold E y Layer PG (1996) - Extracellular and asymmetric forms of acetylcholinesterase are expressed on cholinergic and

- noncholinergic terminal neuropil of the developing chicken retina - Cell Tissue Res. 286: 13-22.
- Repka A y Adler R (1992) - Differentiation of retinal precursor cells born in vitro - Dev. Biol. 153: 242-249.
- Ring C, Lemmon V y Halfter W (1995) - Two chondroitin sulfate proteoglycans differentially expressed in the developing chick visual system - Dev. Biol. 168: 11-27.
- Roark EF, Paradies NE, Lagunowich LA y Grunwald GB (1992) - Evidence for endogenous proteases, mRNA level and insulin as multiple mechanisms of N-cadherin down regulation during retinal development - Development 114: 973-984.
- Rohrer H, Hofer M, Hellweg R, Korsching S, Stehle AD, Saadat S y Thoenen H (1988) - Antibodies against mouse nerve growth factor interfere *in vivo* with the development of avian sensory and sympathetic neurones - Development 103: 545-552.
- Romanoff AL (1960) - The Avian Embryo - The Macmillan Company, New York, USA.
- Rösner H, Greis C y Henke-Fahle S (1988) - Developmental expression in embryonic rat and chicken brain of a polysialoganglioside-antigen reacting with the monoclonal antibody Q 211 - Dev. Brain Res. 42: 161-171.
- Rougon G, Hirn M, Hirsch MR, Guenet JL y Goridis C (1984) - Identification and immunolocalization by monoclonal antibody of NSP-5, a surface polypeptide of neural cells - J. Neuroimmunol. 6: 411-426.
- Savitt JM, Trisler D y Hilt DC (1995) - Molecular cloning of TOPAP: A topographically graded protein in the developing chick visual system - Neuron 14: 153-161.
- Schlosshauer B, Schwarz U y Rutishauser U (1984) - Topological distribution of different forms of neural cell adhesion molecule in the developing chick visual system - Nature 310: 141-143.
- Schlosshauer B y Wild M (1991) - Generation of monoclonal antibodies specific for developmentally regulated antigens of the chicken retina - Dev. Brain Res. 59: 197-208.
- Schlosshauer B, Stier H y Egert U (1993) - Graded distribution of the neural 2A10 antigen in the developing chicken retina - Brain Res. and Dev. Brain Res. 76: 13-22.
- Schlosshauer B, Bauch H y Stier H (1997) - Photoreceptor differentiation analyzed by the novel monoclonal antibody 1G1 - Eur. J. Cell Biol. 73: 150-157.

- Schmucker D, Su AL, Beermann A, Jäckle H y Jay DG (1994) - Chromophore-assisted laser inactivation of *patched* protein switches cell fate in the larval visual system of *Drosophila* - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2664-2668.
- Schulte T, Paschke KA, Laessing U, Lottspeich F y Stuermer CAO (1997) - Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration - Development 124: 577-587.
- Sheppard AM, Konopka M y Jeffrey PL (1988) - Thy-1 expression in the retinotectal system of the chick - Dev. Brain Res. 43: 49-60.
- Shirao T, Kojima N, Terada S y Obata K (1990) - Expression of three drebrin isoforms in the developing nervous system - Neurosci. Res. Suppl. 13: S106-S111.
- Sinclair CM, Bartlett PF, Greig PI y Jeffrey PL (1986) - Distribution of Thy-1 in the avian nervous system: Immunohistochemical and absorption analysis with a monoclonal antibody - Brain Res. 398: 91-105.
- Skerra A (1993) - Bacterial expression of immunoglobulin fragments - Curr. Opin. Immunol., 5 :256-262.
- Sretavan DW, Puré E, Siegel MW y Reichardt LF (1995) - Disruption of retinal axon ingrowth by ablation of embryonic mouse optic chiasm neurons - Science 269: 98-101.
- Stenkamp DL, Gregory JK y Adler R (1993) - Retinoid effects in purified cultures of chick embryo retina neurons and photoreceptors - Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 34: 2425-2436.
- Thiery JP, Brackenbury R, Rutishauser U y Edelman GM (1977) - Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina – J. Biol. Chem. 252: 6841-6845.
- Thomas WA y Yancey J (1988) - Can retinal adhesion mechanisms determine cell-sorting patterns: a test of the differential adhesion hypothesis - Development 103: 37-48.
- Towbin H, Staehelin T y Gordon J (1979) - Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.
- Trisler D, Rutin J y Pessac B (1996) - Retinal engineering: engrafted neural cell lines locate in appropriate layers - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6269-6274.
- Turner DL y Cepko CL (1987) - A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development - Nature 328: 131-136.

- Ui N (1971) - Isoelectric points and conformation of proteins. I. Effect of urea on the behavior of some proteins in isoelectric focusing - *Biochim. Biophys. Acta* 229: 567-581.
- Vielmetter J, Lottspeich F y Stuermer CA (1991) - The monoclonal antibody E587 recognizes growing (new and regenerating) retinal axons in the goldfish retinotectal pathway - *J. Neurosci.* 11: 3581-3593.
- Waid DK y McLoon SC (1995) - Immediate differentiation of ganglion cells following mitosis in the developing retina - *Neuron* 14: 117-124.
- Watanabe T y Raff MC (1988) - Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve - *Nature* 332 : 834-837.
- Watanabe T y Raff MC (1992) - Diffusible rod-promoting signals in the developing rat retina - *Development* 114: 899-906.
- Wetts R y Fraser SE (1988) - Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina - *Science* 239: 1142-1145.
- Wetts R y Fraser SE (1991) - Microinjection of fluorescent tracers to study neural cell lineages - *Development Suppl.* 2: 1-18.
- Wikler KC y Rakic P (1991) – Relation of an array of early-differentiating cones to the photoreceptor mosaic in the primate retina – *Nature* 351: 397-400.
- Williams RW y Goldowitz D (1992a) - Lineage versus environment in embryonic retina: a revisionist perspective - *Trends Neurosci.* 15:368-373.
- Williams RW y Goldowitz D (1992b) - Structure of clonal and polyclonal cell arrays in chimeric mouse retina - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1184-1188.
- Willingham MC (1990) - Immunocytochemical methods: useful and informative tools for screening hybridomas and evaluating antigen expression - *Focus* 12: 62-67.
- Wilson JM, Daddona PE, Simmonds HA, Van Acker KJ y Kelley WN (1982) - Human adenine phosphoribosyltransferase. Immunochemical quantitation and protein blot analysis of mutant forms of the enzyme - *J. Biol. Chem.* 257: 1508-1515.
- Winter G (1993) - Immunological techniques, Editorial overview - *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 253-255.
- Yin X, Watanabe M y Rutishauser U (1995) - Effect of polysialic acid on the behavior of retinal ganglion cell axons during growth into the optic tract and tectum - *Development* 121: 3439-3446.

Zipser B y McKay R (1981) - Monoclonal antibodies distinguish identifiable neurones in the leech - Nature 289: 549-554.

Zisch AH, Stallcup WB, Chong LD, Dahlin-Huppe K, Voshol J, Schachner M y Pasquale EB (1997) - Tyrosine phosphorylation of L1 family adhesion molecules: implication of the Eph kinase Cek5 - J. Neurosci. Research 47: 655-665.