

Tesis de Posgrado

Regulación y síntesis de glicoproteínas en el sistema nervioso central en desarrollo; efecto del suero

Rossi, Susana Graciela

1989

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rossi, Susana Graciela. (1989). Regulación y síntesis de glicoproteínas en el sistema nervioso central en desarrollo; efecto del suero. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2219_Rossi.pdf

Cita tipo Chicago:

Rossi, Susana Graciela. "Regulación y síntesis de glicoproteínas en el sistema nervioso central en desarrollo; efecto del suero". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1989. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2219_Rossi.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

REGULACION Y SINTESIS DE GLICOPROTEINAS
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
EN DESARROLLO: EFECTO DEL SUERO

SUSANA GRACIELA ROSSI

Director de Tesis: Héctor Carminatti

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas

"Fundación Campomar"

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

- 1989 -

- 2219 -
y.2

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud:

Al Dr. Héctor Carminatti, por el apoyo y el afecto que me ha brindado a lo largo de toda la tarea.

A las autoridades del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" que me permitieron trabajar en esta institución.

Al Dr. Víctor Idoyaga, por sus importantes sugerencias y por el productivo intercambio de ideas.

A la memoria de dos grandes científicos a quienes tuve el enorme honor de conocer, Dres. Luis Federico Leloir y Eduardo De Robertis.

Al Dr. Jorge Pecci Saavedra, director del Instituto de Biología Celular y Profesor Titular de la Ira. Cátedra de Citología, Histología y Embriología de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, por su ayuda y estímulo.

A los Dres. S. Quiroga y E. Ochoa, por sus valiosos consejos.

Al Dr. Mario Alperín por el estímulo y la confianza que me dispensó.

Al Dr. Julio M. Azcurra, que fue mi consejero desde que ingresé a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales como estudiante, hasta ahora.

A los Dres. Carlos Cardini, Marcelo Dankert, Israel Algranati, Armando Parodi, José M. Olavarría, Luis R. Marechal, Oscar Burrone, Manuel García-Patrone, Luis Quesada, Juana Tandecarz, Roberto Couso y a todos los miembros del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar" porque han contribuido al logro del presente trabajo.

A los Licenciados Roxana Tabakman, Martín Radrizzani, Eduardo Pagani y la Dra. Viviana Sánchez, por el generoso aporte personal en la discusión de los resultados.

A Tony Coira, Eduardo Cafferata y Silvia Leis, por la colaboración en las técnicas de cultivo.

A Soledad Giménez, Francisco Irusta y Salvador Genovese, por el generoso apoyo.

A Tilda Saba, Beile Wolf y Manon Angel, por la ayuda desde el área administrativa.

A Irene Cangiano y Norberto Malarini, por la eficiencia y dedicación puestos para el procesamiento del texto, la impresión y la confección de los gráficos de esta Tesis.

INDICE

	Página N°
OBJETIVOS	10
1. INTRODUCCION	11
1.1. El lóbulo óptico de pollo; características.	14
1.2. Desarrollo embrionario del pollo.	14
1.3. Desarrollo del cerebro: lóbulo óptico.	19
1.4. Descripción del lóbulo óptico maduro.	22
1.5. Desarrollo del lóbulo óptico.	28
1.6. Glicoproteínas en el sistema nervioso central.	32
1.7. Biosíntesis de las glicoproteínas.	33
2. MATERIALES Y METODOS	37
2.1. Animales.	37
2.2. Incubaciones.	37
2.2.a. Medios.	37
2.2.b. Incubador de CO ₂	37
2.2.c. Precursores radioactivos.	38
2.2.d. Preparación de medios de incubación radioactivos.	38
2.3. Técnica de microcultivos.	38
2.3.a. Disección de los lóbulos ópticos.	38
2.3.b. Obtención de partículas.	38
2.3.c. Siembra e incubación de las partículas de lóbu- lo óptico.	39
2.3.d. Detención de la incubación y procesamiento para la medición de radioactividad en proteínas.	39
2.4. Determinación de proteínas.	41
2.5. Medición de Man-2 ³ H en el medio de incubación.	41
2.6. Determinación de glucosa en el medio de incubación.	42
2.7. Captación de azúcares radioactivos.	42
2.7.a. Captación de Man-2 ³ H.	42
2.7.b. Captación de glucosa-1 ⁴ C.	43
2.7.c. Captación de deoxiglucosa-1 ⁴ C.	43
2.8. Acumulación de deoxiglucosa-6-P-(¹⁴ C). Modificación del método de Sokoloff.	43

2.9.	Extensión temporal del micrométodo de incubación de partículas de tejido nervioso.	45
2.10.	Ensayo de incorporación de ^{32}P . Gel de poliacrilamida. Autorradiografía.	46
2.11.	Incorporación de uridina- ^3H al tejido nervioso.	46
2.12.	Medición de la síntesis de gangliósidos a partir de glucosamina- ^3H	47
2.13.	Caracterización de productos.	48
	2.13.1. Proteólisis.	48
	2.13.2. Labilidad al ácido.	50
	2.13.3. Cromatografía en papel.	50
	2.13.4. Tratamiento con álcali suave.	51
	2.13.5. Obtención de oligosacáridos a partir de lípido-oligosacáridos intermediarios.	51
	2.13.6. Cromatografía de oligosacáridos.	53
2.14.	Determinaciones enzimáticas.	53
	2.14.1. Hexoquinasa.	53
	2.14.2. Tripsina y quimiotripsina.	55
2.15.	Determinación de azúcares totales.	57
2.16.	Aislamiento y purificación del factor inhibidor sérico. ..	57
	2.16.1. Ultrafiltrado del suero.	57
	2.16.2. Columna de intercambio iónico. FPLC.	57
	2.16.3. Gel de poliacrilamida. Autorradiografía.	58
3.	RESULTADOS	61
3.1.	Cantidad de proteína por lóbulo óptico en función de la edad.	61
3.2.	Medición de azúcares totales por unidad de lóbulo óptico en función de la edad.	61
3.3.	Cinética de la incorporación de leucina tritiada a proteínas durante el desarrollo del lóbulo óptico de pollo.	64
3.4.	Incorporación de tritio a proteínas a partir de Man- $^2^3\text{H}$ en función de la cantidad de proteína incubada.	66
3.5.	Incorporación de tritio a proteínas a partir de Man- $^2^3\text{H}$ en función de la oferta de glucosa en el medio de incubación.	69
3.6.	Concentración de azúcares en el medio durante la incubación.	72

3.7. Incorporación de tritio a proteínas a partir de Man-2 ³ H ...	74
3.7.a. Durante el desarrollo del lóbulo óptico de pollo. ..	74
3.7.b. Caracterización de los productos formados a partir de Man-2 ³ H.	78
3.8. Extensión temporal del micrométodo de incubación de partículas de tejido nervioso.	81
EFFECTO DEL SUERO.	86
3.9. Sobre la cinética de incorporación de Man-2 ³ H a proteína en lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días durante incubaciones cortas (3 horas).	86
3.10. Efecto de distintas concentraciones de suero sobre la incorporación de Man-2 ³ H a proteínas en lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días.	86
3.11. Efecto de distintas concentraciones de suero fetal bovino sobre la incorporación de tritio a proteína a partir de Man-2 ³ H en el lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días, durante 18 horas de incubación.	88
3.12. Efecto del suero sobre la desaparición de glucosa o manosa del medio después de 18 horas de incubación.	91
3.13. Incubaciones de partículas de lóbulo óptico de animales de distintas edades en presencia de suero.	91
3.13.a. Efecto de distintas concentraciones de suero sobre la incorporación de Man-2 ³ H a proteínas en lóbulo óptico de embrión de pollo de 10 días.	91
3.13.b. Efecto de distintas concentraciones de suero sobre la incorporación de tritio a proteínas en lóbulo óptico de pollitos de 8 días.	93
3.13.c. Efecto del suero fetal bovino sobre la incorporación de tritio a proteínas durante el desarrollo de lóbulos ópticos de pollo.	96
3.14. Efecto del suero sobre la incorporación de Leu-4,5 ³ H a proteína en lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días.	99
3.15. Efecto del suero sobre la incorporación de uridina- ³ H a RNA en lóbulos ópticos de embriones de pollo de 19 días.	99
3.16. Efecto del suero sobre la incorporación de tritio a gangliosidos a partir de glucosamina- ³ H en lóbulos ópticos de embriones de 17 días.	102
3.17. Efecto de la luz o de la oscuridad durante el desarrollo del lóbulo óptico sobre la cinética de incorporación de radioactividad de proteínas a partir de Man-2 ³ H.	102

3.18. Medición de la incorporación de radioactividad a proteína a partir de manosa tritiada con y sin suero, variando las condiciones de stress (ayuno de agua o de comida).	106
3.18.a. Privación estricta de agua.	106
3.18.b. Ayuno de comida.	108
3.19. Efecto del corte de las principales aferencias nerviosas del lóbulo óptico sobre la síntesis y glicosilación de sus proteínas.	110
3.19.a. Cinética de incorporación de Man-2 ³ H a proteína en lóbulos ópticos de pollos de 6 días, luego de 5 días de enucleados.	110
3.19.b. Incorporación de Leu-4,5 ³ H a proteína.	111
3.19.c. Pollos de 9 días, luego de 5 días de enucleados.	111
3.19.d. Pollos de 19 días, luego de 5 días de enucleados.	114
3.19.e. Efecto del suero en los estudios anteriores.	114
3.20. Cinética de incorporación de Man-2 ³ H a proteínas en hígado de embrión de pollo de 17 días.	116
3.20.a. Efecto del suero.	116
3.20.b. Incorporación de Leu-4,5 ³ H a proteínas de hígado.	116
3.21. Efecto del suero sobre la cinética de incorporación de radioactividad a proteínas de la corteza cerebral de rata de 5 días.	119
3.21.a. Incorporación de Man-2 ³ H en presencia de 20% de suero en el medio.	119
3.21.b. Incorporación de Man-2 ³ H a proteína en función de la concentración de suero utilizada en el medio.	119
3.21.c. Incorporación de Leu-4,5 ³ H en presencia de distintas concentraciones de suero en el medio de incubación.	121
3.22. Efecto del suero sobre la incorporación de radioactividad a proteínas de la corteza cerebral de rata de 90 días.	123
3.22.a. Incorporación de Man-2 ³ H en presencia de 20% de suero.	123
3.22.b. Incorporación de Leu-4,5 ³ H en presencia de 20% de suero.	123
3.23. Captación de Man-2 ³ H en lóbulos ópticos de embrión de pollo de 20 días.	123
3.23.a. En presencia de glucosa frente a dos dosis distintas de oferta de Man-2 ³ H.	125
3.23.b. En presencia o no de glucosa en el medio.	125
3.23.c. Efecto del suero sobre la captación de Man-2 ³ H. ...	129

3.24.	Cinética de captación de glucosa- ¹⁴ C y de 2-deoxiglucosa en lóbulos ópticos de embrión de pollo. Efecto del suero.	132
3.25.	Modificaciones al método de la deoxiglucosa- ¹⁴ C para la medición de la utilización de glucosa.	135
3.26.	Efecto del suero en la utilización de glucosa en el lóbulo óptico de embriones de pollo de 6, 10 y 18 días.	137
3.27.	Medición "in vitro" de la actividad de la hexoquinasa de lóbulo óptico de pollo. Efecto del suero.	137
3.28.	Medición de lípido-azúcares intermediarios del camino del dolicol en lóbulos ópticos de embrión de pollo de 18 días con suero en el medio de incubación.	143
3.29.	Incorporación de Man- ²³ H a proteína en presencia de sueros de distintas especies.	145
3.30.	Tratamientos efectuados sobre el suero antes de su incubación.	145
	3.30.a. Calentamiento y variación del pH.	145
	3.30.b. Dializado.	147
	3.30.c. Ultrafiltrado.	149
3.31.	Caracterización del suero ultrafiltrado ("cut-off" PM=10 kD).	151
	3.31.a. Incorporación de Leu- ^{4,5} ³ H a proteínas.	151
	3.31.b. Variación del pH y calentamiento.	151
	3.31.c. Preincubación del suero con quimotripsina y tripsina.	153
3.32.	Intercambio iónico en columna de FPLC (mono Q) del suero ultrafiltrado.	153
3.33.	Esquema de purificación.	156
3.34.	Gel desnaturizante de la fracción inhibitoria de la columna de intercambio iónico.	159
3.35.	Efecto del suero ultrafiltrado ("cut-off" 10 kD) sobre la fosforilación de proteínas "in vivo".	159
3.36.	Efecto del suero sobre la liberación de glicoproteínas al medio.	162
	3.36.a. Marcación con Man- ²³ H.	162
	3.36.b. Marcación con Leu- ^{4,5} ³ H.	164
3.37.	Incorporación de radioactividad a proteínas totales (intra y extracelulares).	164
	3.37.a. A partir de Man- ²³ H.	166

3.37.b. A partir de Leu-4,5 ³ H.	166
4. DISCUSION	167
4.1. Síntesis y regulación de glicoproteínas en el lóbulo óptico de pollo durante el desarrollo.	167
4.2. Efecto del suero sobre la incorporación de manosa y leucina tritiadas a proteína en el lóbulo óptico de pollo.	169
4.3. Efecto del suero sobre otras vías metabólicas y su relación con la historia previa del animal.	171
4.4. Naturaleza del factor sérico y su posible sitio de acción en el metabolismo celular.	172
5. CONCLUSIONES	177
6. REFERENCIAS	179
7. ABREVIATURAS	194

OBJETIVOS

En esta Tesis, y dado que se estudia durante el desarrollo, el lóbulo óptico que pertenece a la vía visual, se va a medir la incorporación de manosa radioactiva a proteínas en función de la edad y de distintas condiciones externas: luz, enucleación, nutrición, etc. También se va a estudiar el efecto que produce sobre la síntesis y glicosilación de proteínas el agregado de factores exógenos al medio de incubación. Habiéndose encontrado un novedoso efecto del suero, en el proceso de incorporación de manosa tritiada a proteína, en las partículas de lóbulo óptico de embriones de pollo, toda la última parte de este trabajo se va a dedicar a profundizar este fenómeno. Se proyecta estudiar los siguientes puntos:

- . especificidad de los tejidos que responden a este factor;
- . especificidad de la especie animal;
- . actividad biológica de sueros provenientes de distintos animales;
- . determinar si las condiciones externas relacionadas con la vía visual (luz-oscuridad, enucleación, etc.) tienen alguna influencia en el efecto del suero;
- . tendría interés caracterizar él o los factores del suero estudiando algunas de sus propiedades e intentar su ulterior purificación;
- . finalmente se va a tratar de determinar cuál es la etapa de la vía metabólica, que va de manosa a glicoproteína, donde el suero ejerce su efecto.

1. INTRODUCCION

El momento preciso y los cambios que tienen lugar durante el desarrollo del cerebro varían apreciablemente en las diferentes especies (80). Se sabe que la proliferación celular, la formación y el crecimiento del cerebro de los animales y los seres humanos durante la vida pre y post-natal, son afectados por los balances nutricionales y endócrinos. Por ejemplo, la desnutrición (81,82), la hipofisectomía y la deficiencia tiroidea (83) y excesivas concentraciones de hormonas tiroideas (84) y de glucocorticoides (84,82) inhiben la síntesis de ácidos nucleicos, el número de células y la maduración funcional del cerebro. Una gran variedad de procesos del desarrollo del cerebro implican interacciones célula-célula que son llevadas a cabo por glicoproteínas de membrana. En el sistema nervioso en desarrollo, estas moléculas juegan importantes roles en eventos específicos, tales como adhesión célula a célula (38,39,85,86), sinaptogénesis (87) y mielinización (88).

El cerebro está muy enriquecido (80-95%) en glicoproteínas tipo N-glicosídicas (89). La importancia de estas moléculas se enfatiza por la gran cantidad de trabajos publicados acerca de la relevancia de la N-glicosilación para la diferenciación neuronal (90,91) y para el ensamblado y mantenimiento funcional de los canales de voltaje de Na^+ en células de neuroblastoma (37,92) y de los receptores de acetilcolina en músculo (36,93,94,95), entre otros.

Las glicoproteínas tipo N-Asp se sintetizan vía ciclo del dolicol (68,69,70) como se detallará más adelante.

Estudios de enzimas con preparaciones microsomales del cerebro en desarrollo han demostrado incrementos de la N-glicosilación de proteínas durante la mielinización (96,97) y sinaptogénesis (98). Ultimamente, se ha estudiado la biosíntesis de glicoproteínas en cultivos de células cerebrales embrionarias de rata durante el desarrollo (99). En nuestro laboratorio se ha desarrollado una técnica de microincubación de partículas de tejido nervioso

para realizar los estudios de la regulación de la glicosilación de proteínas (40,41,100). En este trabajo por primera vez se mide la velocidad relativa de glicosilación de proteínas a lo largo del desarrollo del lóbulo óptico. Se encontraron diferencias notables en cuanto a síntesis y glicosilación de proteínas en los distintos estadios celulares: proliferación, migración y diferenciación, abarcando también el momento en que ocurre la entrada de las fibras del nervio óptico y la formación de redes de eferencias del lóbulo óptico. Este "pattern" de velocidad relativa de incorporación de radioactividad a proteínas en función de la edad refleja la regulación endógena de la glicosilación de las poblaciones de glicoproteínas características de cada estadio del desarrollo del lóbulo óptico. Estas mediciones se realizaron utilizando el micrométodo de incubación de partículas de tejido nervioso en presencia de medio mínimo y concentraciones fisiológicas de glucosa. Fueron preservadas las relaciones anatómicas entre las neuronas, células gliales, endoteliales, etc., y se logró el estado estacionario de marcación a partir de Man- 2^3H con una alta eficiencia en la marcación de glicoproteínas en incubación de hasta 24 hs.

Debe hacerse notar aquí, que el método de incubación de tejido nervioso se desarrolló para corteza cerebral de rata y comprendía las condiciones de incubación hasta 3 hs. En esta tesis se presenta una extensión temporal del método en condiciones controladas durante 24 hs. Gracias a estas modificaciones ha sido posible marcar antígenos sintetizados durante el período de incubación de 15 hs, como es el caso de Thy 1.1, para luego ser reconocido por su anticuerpo monoclonal. Con incubaciones de 3 hs no se hubiesen alcanzado las actividades específicas suficientes para su cuantificación. Por otro lado, otra aplicación inmediata de las modificaciones al método de incubación de partículas de tejido nervioso y su extensión a 24 hs ha sido posibilitar

la realización de autorradiografías de geles de poliacrilamida y la amplísima gama de aplicaciones que esta técnica permite: glicoproteínas características de cada edad, glicoproteínas presentes bajo distintas condiciones, como mutaciones, presencia de antibióticos, suero u otros elementos agregados al medio de incubación, etc.

1.1. El lóbulo óptico de pollo: características

Aunque los primeros trabajos sobre el lóbulo óptico de pollo han sido publicados hace más de una centuria (1) y ha sido objeto de un gran número de estudios morfológicos (2,3,4,5,6,7,8,9,10,11) y embriológicos (12,13,14,15) desde ese momento, aún continúa atrayendo la atención por varias razones: primero, presenta una estructura laminar única (en la mayoría de las aves estudiadas no se reconocen menos de 15 capas celulares y plexiformes) que es de particular interés para estudios citoarquitectónicos y sobre factores relacionados en la regulación de la proliferación celular, migración y diferenciación en el sistema nervioso; segundo, una representación precisa de la retina sobre la superficie del lóbulo óptico (16,17) hace de esta estructura un sitio ideal para el estudio del establecimiento de conexiones durante el desarrollo embrionario; tercero, ya que el lóbulo óptico recibe la mayoría de las proyecciones aferentes del ojo contralateral, lo hace especialmente útil para el estudio de los efectos de la deaferentación temprana sobre la proliferación, diferenciación, migración y mantenimiento celular (8,18,19,20,).

1.2. Desarrollo embrionario del pollo

El desarrollo de un animal es un proceso continuo, sin embargo para su descripción, es conveniente fijar ciertas etapas y compararlas con las precedentes y las posteriores. Cada etapa se ubica en una cierta posición en el proceso continuo y un correcto ordenamiento de etapas es una condición "sine qua non" para su interpretación. Esta tarea parecería muy simple ya que en general el proceso del desarrollo va de lo simple a lo más complejo y esto sería así, a no ser por el hecho de que en los distintos estadios embrionarios, como en los individuos adultos de una especie, existen diferen-

cias, de manera tal que no hay un embrión exactamente igual a otro.

Estas variaciones embrionarias se relacionan: primero, con la velocidad de desarrollo de todo el embrión, por lo tanto luego de un determinado tiempo del proceso no hay dos embriones que estén exactamente en la misma etapa; segundo, con las velocidades relativas del desarrollo de los distintos órganos y tercero, con el tamaño del embrión, ya que embriones de una misma etapa del desarrollo pueden variar de tamaño.

Aunque el período total de incubación es bastante constante en el huevo de gallina, de alrededor de veintiún días, existe una gran variación en el grado de desarrollo de embriones de una misma edad, especialmente durante la primera semana. Esto se debe a tres factores principales: 1. Variación en el período de latencia, es decir el tiempo que es necesario para que comience el desarrollo del blastodermo enfriado, después que el huevo es colocado en incubadora. Es equivalente en la naturaleza, al momento en el que la gallina empieza a empollar los huevos que fue poniendo en distintos días; 2. Variación de los factores físicos durante la incubación; 3. Lo inherente a variaciones propias de los huevos, tales como el tiempo que tardó el huevo en atravesar el oviducto, la edad de la gallina al poner el huevo (ya que a mayor edad, se observa un menor desarrollo de sus huevos). En este estadio, en todos los huevos ha comenzado la formación de las capas germinativas y el estado de desarrollo es bastante definido, aunque no absolutamente constante. Cuando los huevos son enfriados, luego de la formación de las capas germinativas, el desarrollo cesa, pero es reiniciado cuando la temperatura sube hasta el grado requerido para la incubación.

El período de latencia varía con la frescura de los huevos; es relativamente corto en huevos que han sido recientemente puestos y largo, en huevos que han permanecido quiescentes algún tiempo luego de la formación de las

capas embrionarias. Es obvio que el período de latencia formará parte de una porción considerable del tiempo de incubación de las primeras etapas del desarrollo más que de las últimas, por lo tanto dificulta la clasificación de los embriones, especialmente en los primeros 4 ó 5 días de incubación. La temperatura a la cual se almacenaron los huevos antes de la incubación influye sobre la viabilidad del embrión y el período de latencia. La temperatura ideal de almacenaje está entre 8 y 10°C, aunque no hay apreciable desarrollo del embrión por debajo de los 27°C. En climas muy cálidos, por lo tanto, la temperatura atmosférica puede ser suficiente para iniciar el desarrollo del embrión. La temperatura límite superior a la cual los huevos pueden desarrollarse, es de 41°C. La temperatura óptima es de 38°C, mantenida uniformemente durante la incubación. Temperaturas que estén por debajo y por encima del valor óptimo pueden retardar o acelerar la velocidad del desarrollo durante los primeros 12 días de incubación. Del día 13 en adelante, la velocidad de crecimiento del embrión no es afectada por variaciones en más o menos 3°C del valor óptimo. Esto se interpreta como que el pollo es el primer animal poikilotermo (de sangre fría) que gradualmente desarrolla mecanismos de regulación del calor desde el día 6 embrionario en adelante, lo cual lo hace independiente, dentro de ciertos límites, de la temperatura ambiente.

Cuando se trabaja con incubadoras, otra causa de mortalidad frecuente en los embriones ocurre alrededor del día 19, y está relacionado con la humedad relativa, que tiene su valor óptimo entre el 60 o 65%.

De esto surge que aún bajo las mejores condiciones de incubación existen suficientes causas de variabilidad en los embriones independientes del tiempo de incubación. Por eso, se utilizan para la clasificación de las etapas del desarrollo del embrión, características morfológicas externas independientes

de la edad cronológica y del tamaño del embrión (12).

Nos centraremos en la descripción de 3 etapas que resultarán importantes en esta Tesis, en la cual se utilizaron embriones desde 6 días de incubados en adelante. Resumiendo, describiremos las consideraciones efectuadas por Hamburger y Hamilton (12) de las etapas 29, 36 y 43.

Etapa 29

Se corresponde con el E6-6 1/2 (Fig. 1, A). Miembros: las alas se inclinan y forman un codo. El segundo "dígito" comienza a distinguirse más largo que los otros. Se observan sombras de estrías entre el primero, segundo y tercer "dígito". Comienzan a distinguirse los dedos de las patas por acanalamientos entre ellos y se observan rudimentos del 5° dedo.

Etapa 36

Se corresponde con el embrión de 10 días. Miembros: los segmentos distales tanto del ala como de la pata son más largos. La longitud del tercer dedo de la pata desde su final al medio de la juntura metatarsal es de $5,4 \pm 0,3$ mm. El primordio de uña aparece en patas y "dígito" 1 de alas. Falta la protuberancia del "dígito" 2 del ala. El primordio de la cresta aparece como un puente prominente levemente aserrado a lo largo de la zona dorso-medial del pico. Un acanalamiento horizontal es claramente visible sobre la parte superior de la quijada que es pobremente indicativa de la punta de la mandíbula. Las ventanillas de la nariz se presentan como hendiduras. La longitud del pico desde el ángulo anterior de las ventanillas de la nariz hasta la punta del pico es $\approx 2,5$ mm. Penachos de plumas germinales: son conspicuos y cubren la parte visible palmípeda de las alas, porción tibiofibular de patas. Párpados: una membrana cubre la zona escleral anterior y se

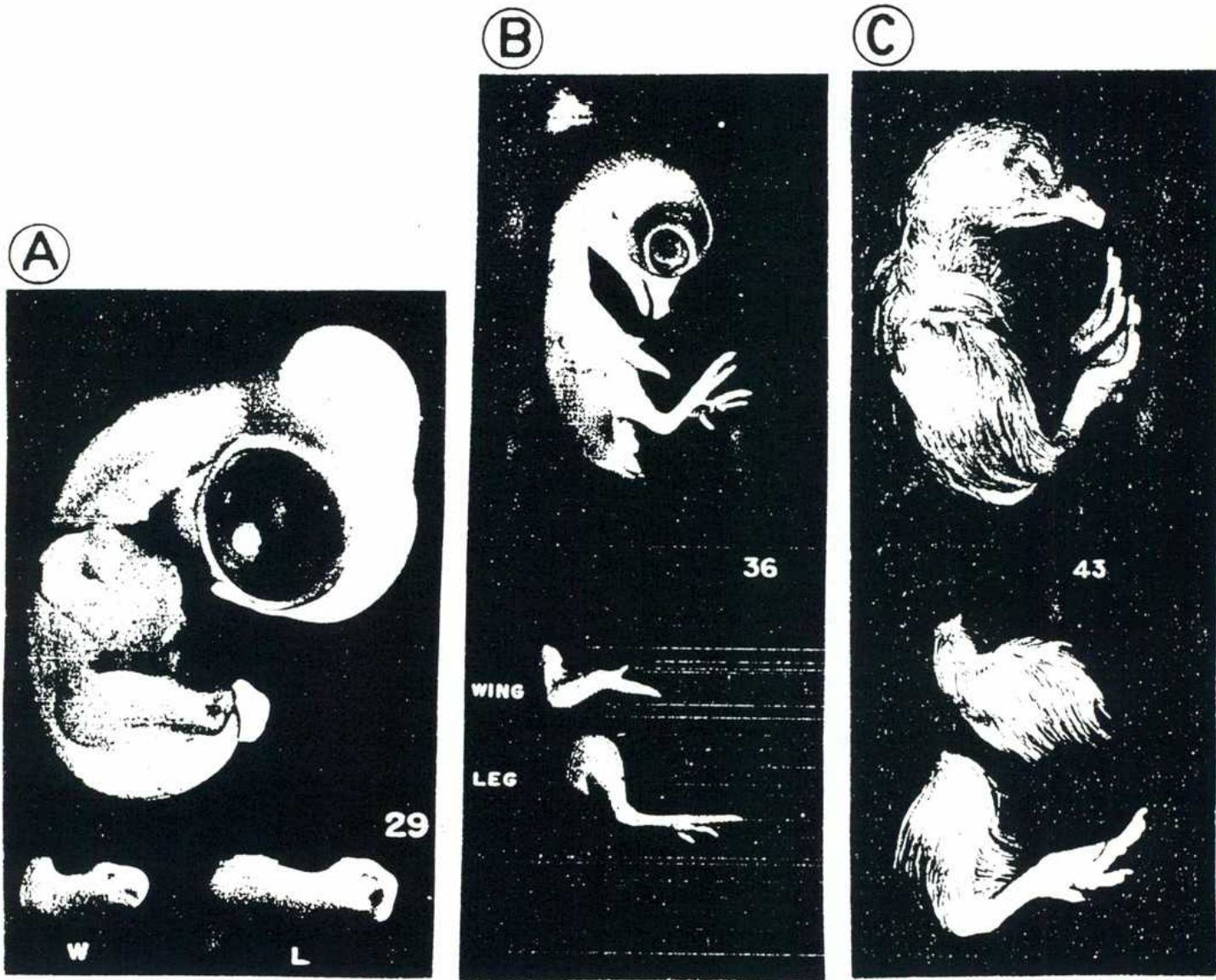


Figura 1. Algunos estadios del desarrollo del embrión de pollo según la serie de etapas normales de Hamilton y Hamburger (12).

A. Etapa 29 (E6-E6 1/2) x 5. B. Etapa 36 (E10) x 1,5 y C. Etapa 43 (E17) x 9/10. Las descripciones más detalladas se encuentran en el texto.

acerca a la córnea (Fig. 1, B).

Etapa 43

Corresponde al E17. Ver Fig. 1, C. Pico: la longitud desde el ángulo anterior de las ventanillas de la nariz, hasta la punta de la parte superior del pico=5mm. Tercer dedo de la pata: longitud=18,6+0,8 mm.

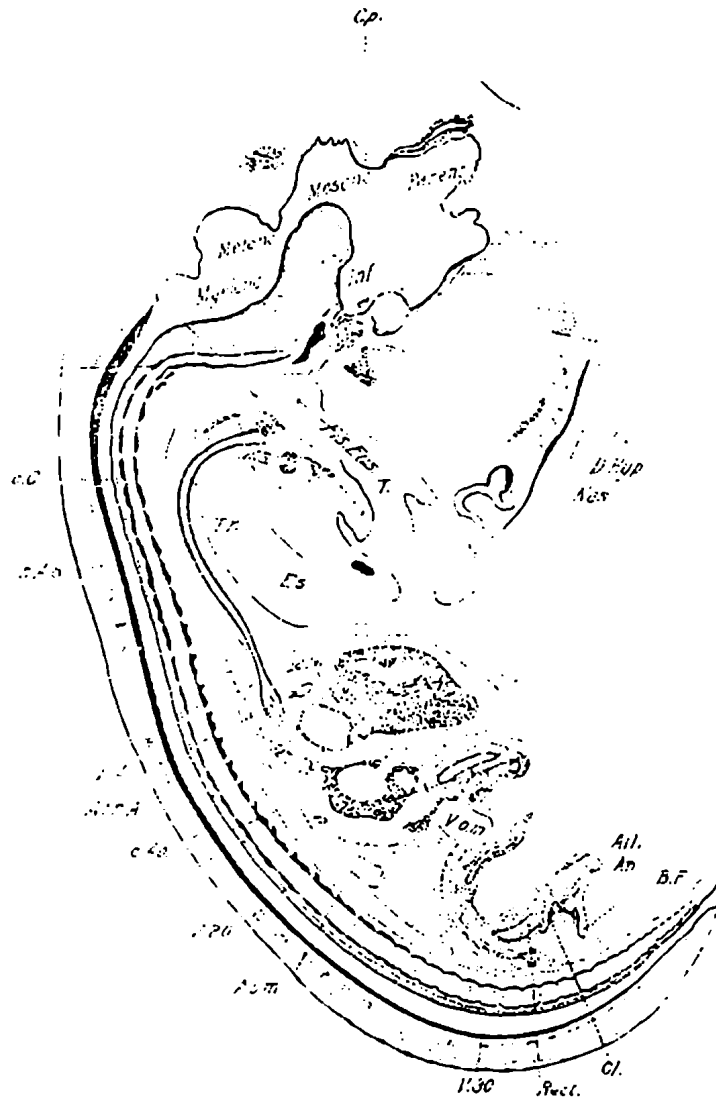
1.3. Desarrollo del cerebro: lóbulo óptico

Las consideraciones sobre el desarrollo del cerebro de embrión de pollo que se harán a continuación, están basadas en la disección y cortes de cerebros de embriones de 8 días. En esta etapa, es posible reconocer los comienzos de la arquitectura del cerebro adulto, sin perder de vista la condición embrionaria.

La Fig. 2 muestra una sección ságitomedial de un embrión de 8 días. Esta figura ha sido tomada del capítulo 8, The Nervous System, de (21), página 308. En la Fig. 3 se observa un corte ságitolateral del E8 días que fue tomada del mismo libro (21), página 313.

El lóbulo óptico forma parte del mesencéfalo y se corresponde con una prominencia en la parte superior de la cabeza del embrión, la cual es más marcada en estadios embrionarios más tempranos (Fig. 1, A).

El mesencéfalo sufre considerables cambios desde el tercer día embrionario. Las zonas dorso-laterales crecen en tamaño, al mismo tiempo se adelgazan y tiene dos evaginaciones que forma los dos grandes lóbulos ópticos. Las zonas dorso-lateral y el techo así formado, forma una división del mesencéfalo conocida como tectum lobi optici. La zona ventrolateral y el piso están muy adelgazados y forman la división basal del mesencéfalo. El ventrículo del mesencéfalo se convierte en un canal (acueducto de Sylvius),

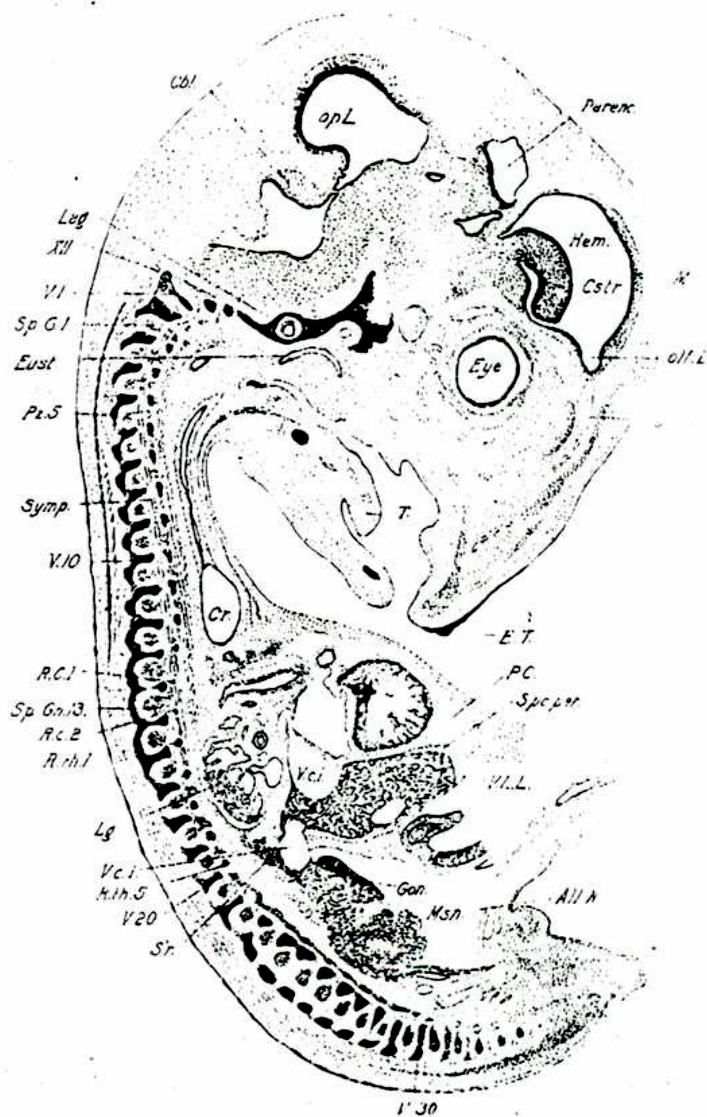


a. a., Aortic arch. All., Allantois. An., Anus. A. o. m., Omphalomesenteric artery. Atr. A., Right atrium. B. F., Bursa Fabricii. b. P., Basilar plate. C. a., Anterior commissure. c. C., Central canal. Ch. op., Optic chiasma. C. p., Posterior commissure. Cl., Cloaca. Cr., Crap. d. Ao., Dorsal aorta. D. Hyp., Duct of Rathke's pouch. Ep. p., Epiphysis. Es., Esophagus. Fis. Eus., Fissura Eustachii. Hem., Surface of hemisphere, barely touched by section. Hyp., Anterior lobe of hypophysis. L. t., Lamina terminalis. n. A. 8, Neural arch of the eighth vertebra. Nas., Nasal cavity. op. l., Optic lobe. p. A., Pulmonary arch. Par., Paraphysis. P. C., Pericardial cavity. Rec. op., Optic recess. Rect., Rectum. S. Inf., Infundibular sac. T., Tongue. Tel. med., Telencephalon medium. Tr., Trachea. V. 1, 10, 20, 30, First, tenth, twentieth, and thirtieth vertebral centra. Vel. tr., Velum transversum. V. o. m., Omphalomesenteric vein. V. umb., Umbilical vein. Other abbreviations as before.

Figura 2. Sección sãgito-medial de un embriõn de 8 dñas.

Se observa que el lõbulo õptico estã ubicado en el mesencãfalo.

Tomado del cap. 8, pãg. 308 de (21).



All. N., Neck of the allantois. Cbl., Cerebellum. Cr., Crop. C. str., Corpus striatum. E. T., Egg-tooth. Eust., Eustachian tube. Gon., Gonad. Hem., Hemisphere. Lag., Logena. Lg., Lung. M., Mantle of hemisphere. Msn., Mesonephros. olf. L., Olfactory lobe. olf. N., Olfactory nerve. P. C., Pericardial cavity. Pz. 5, Fifth postzygapophysis. R. C. 1, 2, Last two cervical ribs. R. th. 1, 5, First and fifth thoracic ribs. S. pc-per., Septum pericardiac-peritoneale. Sp. G. 1, 13, First and thirteenth spinal ganglia. S'r., Adrenal gland. Symp., Main trunk of the sympathetic. V. 1, 10, 20, 30, First, tenth, twentieth, and thirtieth vertebral arches. V. c. i., Vena cava inferior. V. L. L., Ventral ligament of the liver. Others as before.

Figura 3. Corte sãgito-lateral de un embriõn de 8 dñas.

Tomado del cap. 8, pãg. 313 (21).

hacia el cual se abren las cavidades de los lóbulos ópticos.

1.4. Descripción del lóbulo óptico maduro

La presente descripción de la morfología del lóbulo óptico se basa en trabajos de Cajal (22,23), Van Gehuchten (24), Huber y Crosby (25), Jungherr (4) y Cowan y col. (2,6). Indudablemente la característica más importante del lóbulo óptico es su laminación. Presenta 6 estratos principales los cuales han sido nombrados, desde la superficie pial hacia adentro: 1. stratum opticum (SO), que contiene las fibras del tracto óptico; 2. el stratum griseum et fibrosum superficiale (SGFS), que es la principal zona de fibras y células del lóbulo óptico y que se puede subdividir en 10 láminas; 3. el stratum griseum centrale (SGC), donde se localizan las neuronas que se corresponden con las salidas principales de eferencias del lóbulo; 4. el stratum album centrale (SAC), formado principalmente por las fibras eferentes mielinizadas del lóbulo; 5. stratum griseum periventriculare (SGP) y 6. stratum fibrosum periventriculare (SFP). Además de estos estratos, hacia el ventrículo tectal está presente la capa ependimal (Fig. 4).

Desafortunadamente, no está del todo claro cuál es la significación de este "pattern" laminar de células y fibras. Este problema se complica por el hecho de que con la única excepción de la lámina "e" del SGFS, cada una de las capas contiene al menos dos, y en algunos casos 3 o más, tipos neuronales.

Además, muy poco o casi nada se conoce al presente, acerca de la organización sináptica dentro de una capa. Es difícil decir algo acerca de las posibles interacciones de las diferentes fibras entrantes (extrínsecas, asociación, etc.).

Se distinguen 3 tipos neuronales mayoritarios en el lóbulo óptico. La

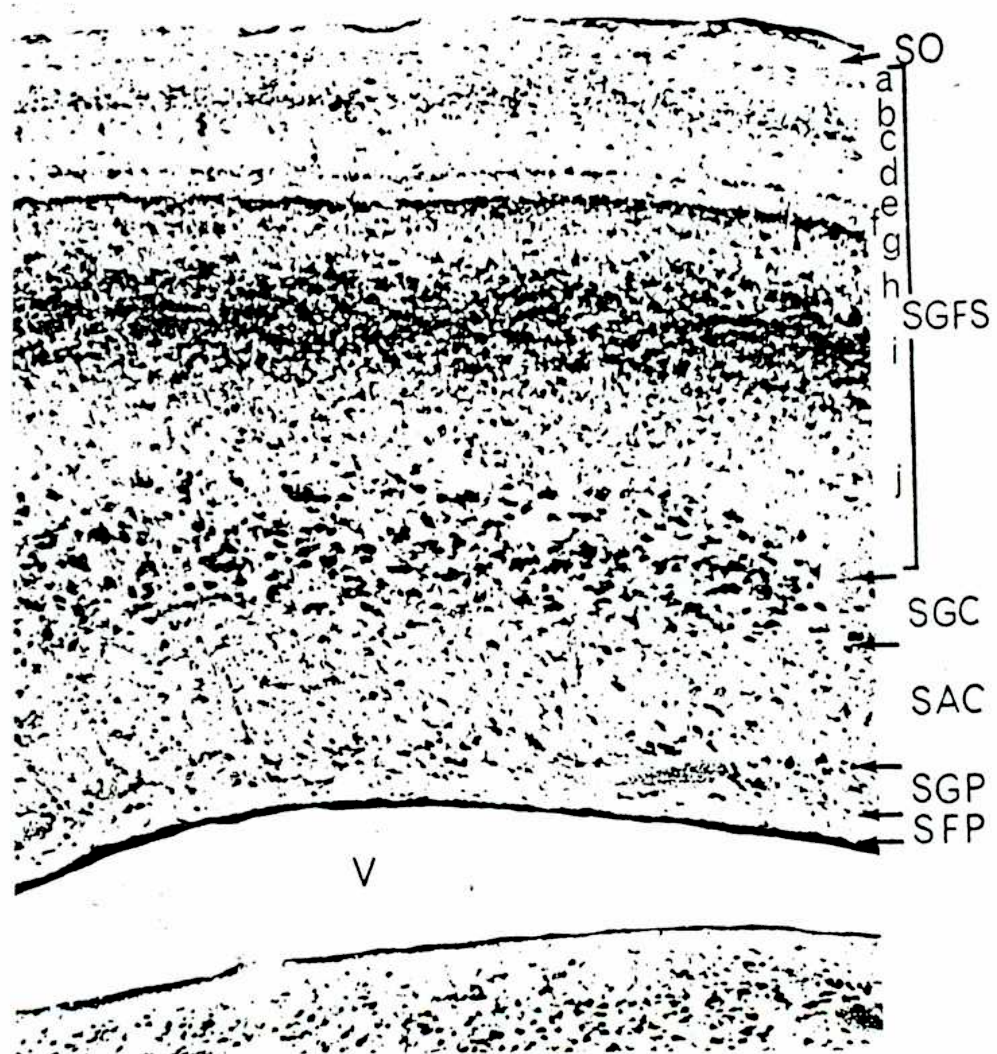


Figura 4. Fotomicrografía de bajo poder a través de la porción central del lóbulo óptico de un pollo de 6 días para ilustrar su organización citoarquitectónica.

SO: stratum opticum; SGFS: stratum griseum et fibrosum superficiale; SGC: stratum griseum centrale; SAC: stratum album centrale; SGP: stratum griseum periventriculare; SFP: stratum fibrosum periventriculare y el epéndimo están marcados. Las 10 capas de fibras y láminas del SGFS están designadas (láminas a-j). X58. Tomado de La Vail y Cowan (6).

primera es la población de células grandes, multipolares, características del SGC (Fig. 5). Las dendritas de estas células se ramifican a considerable distancia y sus ramificaciones terminales pueden alcanzar la lámina "C" del SGFS. Se conoce que a esa lámina llegan axones de la retina, con los cuales se contactarían directamente. Además, dada su amplia distribución dentro del lóbulo óptico, las dendritas de estas células podrían potencialmente estar en contacto con axones de células de capas cercanas. Los axones de estas células multipolares pasan el SAC y claramente representan las principales eferencias tectales: aunque se está estudiando su distribución, es posible que se proyecten dentro del tronco cerebral y diencéfalo (26,27).

El segundo, y más numeroso tipo neuronal, son células piriformes, radialmente orientadas, que se encuentran principalmente dentro de las capas profundas del SGFS (láminas "e-j" (Fig. 6). Este tipo celular se distingue por su campo dendrítico elongado radialmente, el cual tiene una expansión horizontal limitada aunque se extiende superficialmente casi hasta el SO. La mayoría de estas células reciben las entradas directas de la retina y su forma general sugiere que están especialmente adaptadas para recibir información de una pequeña región de la retina y mantiene una precisa organización retino-tópica. Al mismo tiempo, sus terminaciones dendríticas a distintos niveles dentro del lóbulo, las hace apropiadas para integrar la información retinal recibida por las neuronas tectales orientadas horizontalmente.

El tercer tipo celular (Fig. 7) se encuentra predominantemente en el tercio superficial del lóbulo (láminas "a-f" del SGFS).

Las dendritas de estas células usualmente se extienden circunferencialmente dentro de una o dos láminas y ya que sus axones parecen tener una distribución horizontal similar, parecen estar relacionadas con la modulación de la actividad excitatoria o inhibitoria del primer y segundo tipos celu-

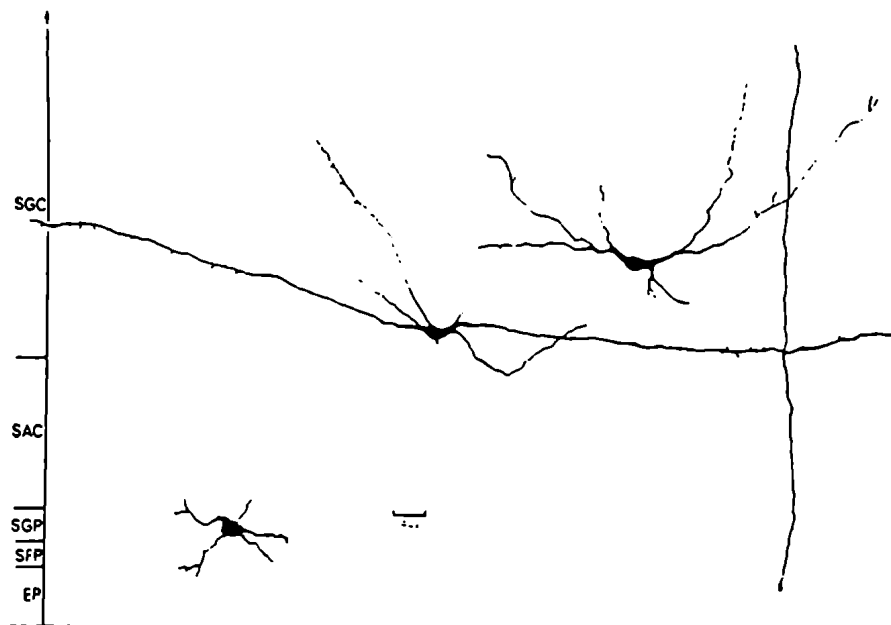


Figura 5. Dos ejemplos de células multipolares grandes (neuronas del primer tipo) que caracterizan el stratum griseum centrale (SGC). Dendritas dispuestas horizontalmente, extendiéndose al SGFS. Los axones de estas células entran en el stratum album centrale (SAC). Una gran célula estrellada característica del stratum griseum periventriculare (SGP) se muestra junto con una célula endodimensional (EP) cuyos procesos pueden llegar a la superficie pial. Tomado de La Vail y Cowan (6).

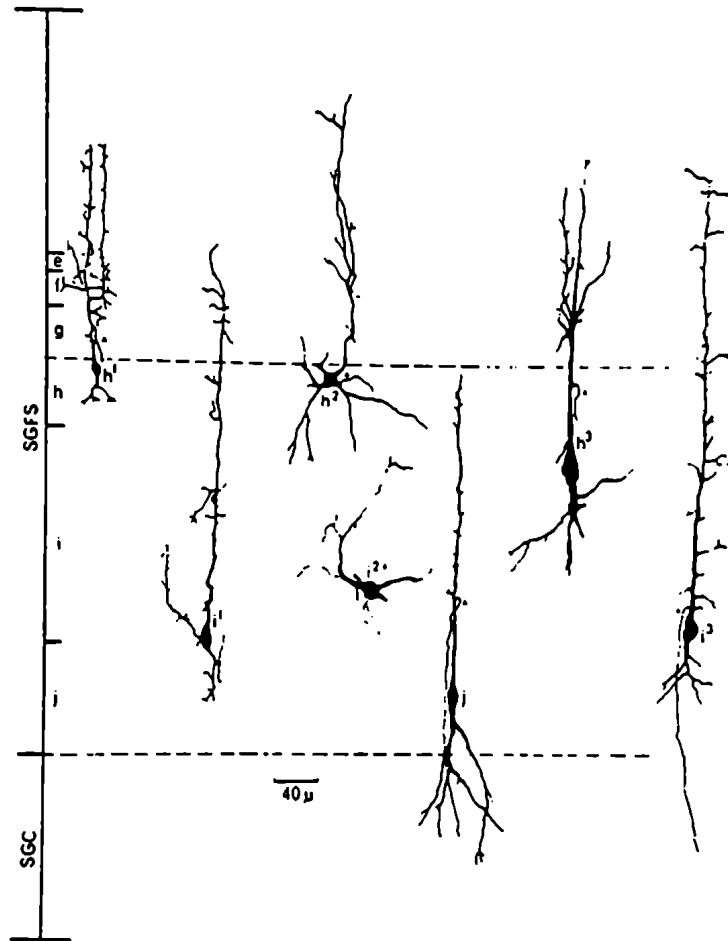


Figura 6. Células de las láminas profundas del SGFS.

La mayoría son neuronas piriformes (células del segundo tipo) con sus campos dendríticos orientados radialmente. Tomado de La Vail y Cowan (6).

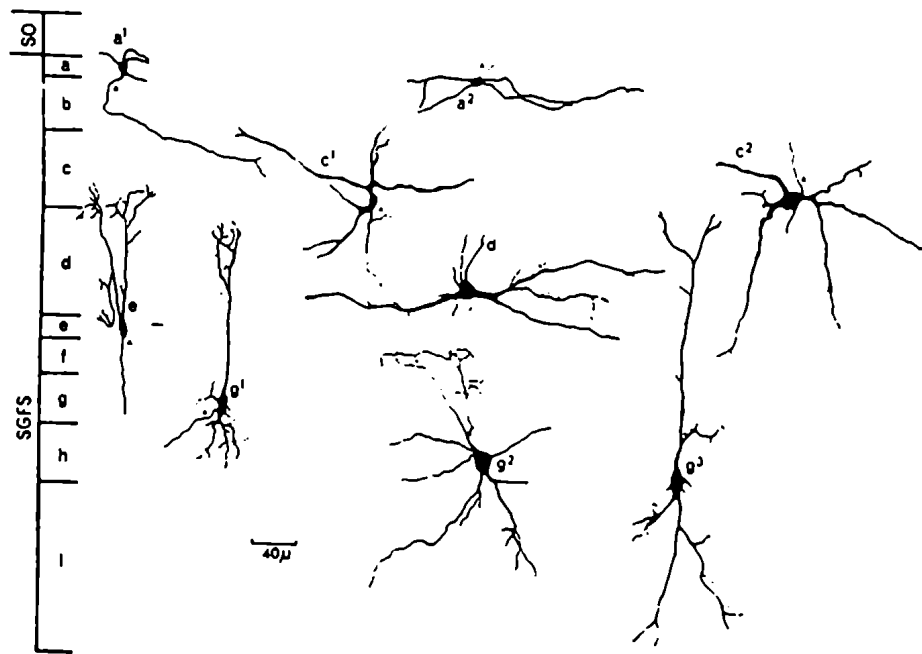


Figura 7. Algunos tipos celulares encontrados en las láminas externas del SGFS.

Al lado del cuerpo neuronal se encuentra una letra indicadora de la lamina donde se ubica. La mayoría de las células de las láminas externas (a-d) tienen disposición horizontal (tercer tipo celular). Algunas de las células de las láminas profundas son típicas neuronas piriformes (células del segundo tipo) con prominentes dendritas ascendentes. Tomado de La Vail y Cowan (6).

lares.

Con la excepción de las entradas de la retina (Fig. 8), muy poco se sabe de las conexiones aferentes del lóbulo. El cuadrante anterior y posterior de la retina están representados en las zonas caudales y rostrales del lóbulo, respectivamente. El cuadrante superior proyecta sobre la parte ventral y el cuadrante inferior sobre la porción dorsal (16,2,28,29,30,31). Este arreglo ordenado está determinado por la forma en la cual las fibras de la retina llegan al SO y entran en un nivel apropiado del SGFS de una manera radial. Existen observaciones (26) de aferencias al lóbulo óptico provenientes del lóbulo opuesto.

Por estimulación eléctrica del nervio óptico se estudia la proyección retino-tópica (16,28,29,30,32) y también por la actividad eléctrica espontánea en el lóbulo hacia el final del período de incubación (33,34).

De acuerdo con Peters y col. (33), el lóbulo óptico de pollo no puede ser activado por estimulación fotónica hasta cercano al final del período de incubación. Las respuestas más tempranas se obtienen en E17.

1.5. Desarrollo del lóbulo óptico

El desarrollo del lóbulo óptico de pollo entre los días 4 y 18 de incubación puede ser dividido en 3 fases que presentan cierta superposición. La primera fase comienza en E3 y se extiende hasta E6, es el período de máxima proliferación celular (Fig. 9, A). En este período el lóbulo consiste en poco más que el epitelio neural original y las células tempranamente diferenciadas ocupan inmediatamente una posición externa a esta capa. La máxima actividad mitótica ocurre en la etapa 29 (20) que corresponde al E6-6 1/2. Como resultado de esta muy rápida proliferación celular, el tamaño del lóbulo aumenta considerablemente.

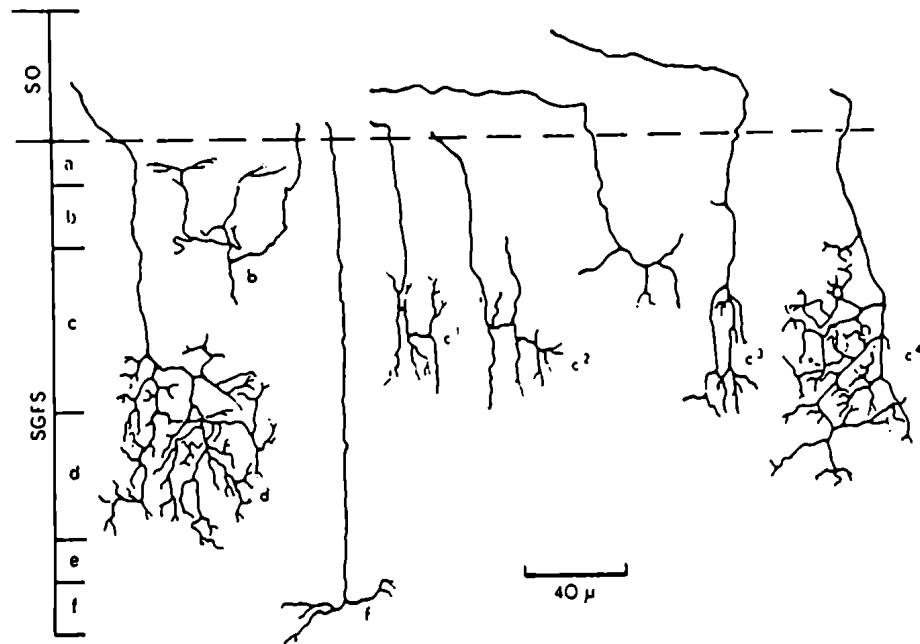


Figura 8. Fibras de la retina que abandonan el stratum opticum (SO) y terminan en el stratum griseum et fibrosum superficiale (SGFS). La indicación al lado de cada trazado indica la lámina en la cual la mayoría de las ramificaciones terminales de cada fibra son distribuidas. Tomado de La Vail y Cowan (6).

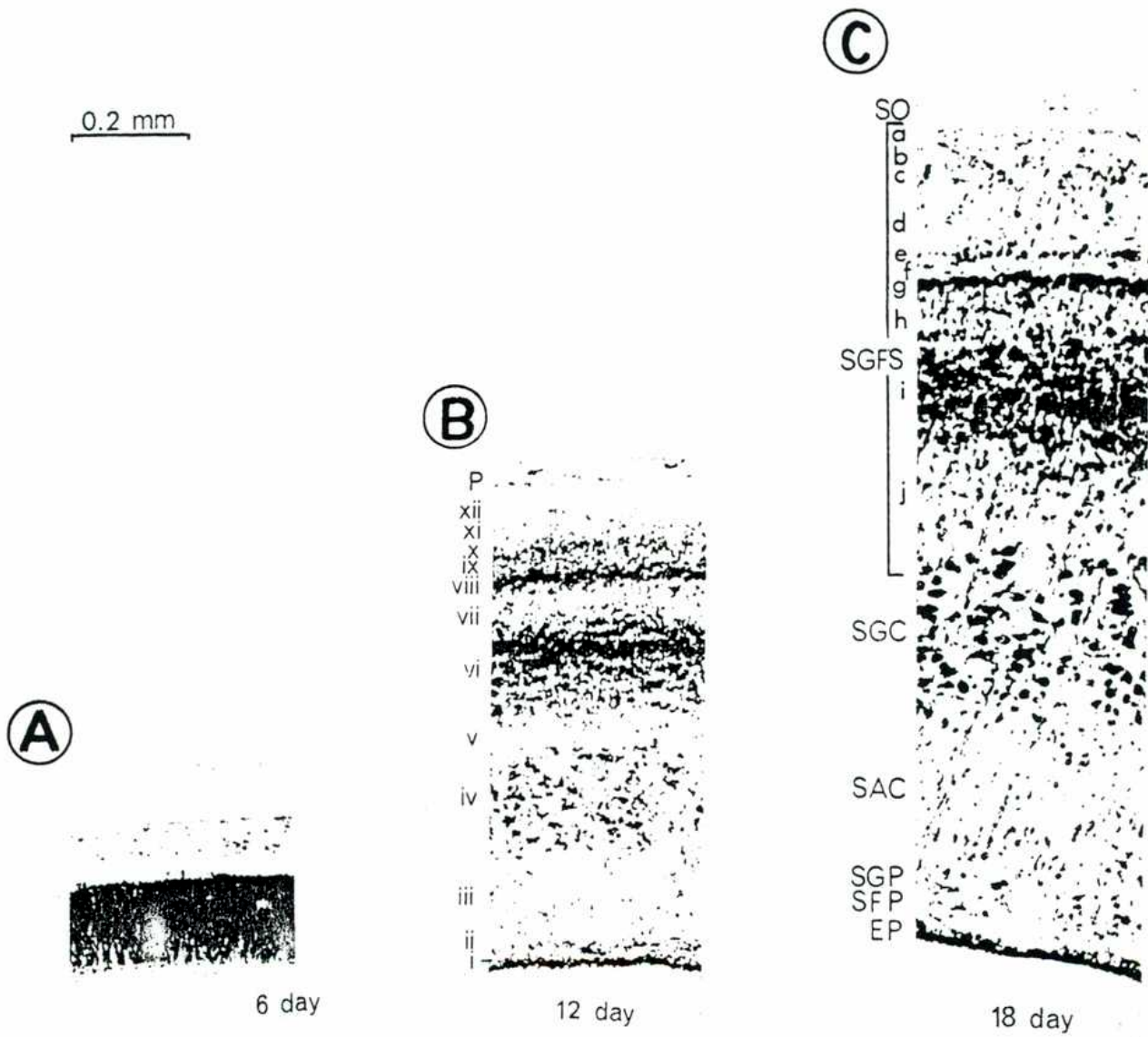


Figura 9. Fotomicrografías tomadas de La Vail y Cowan (6) de lóbulos ópticos de distintas edades.

A. E6 x 200; B. E12 x 100 y C. E18 x 100.

La segunda fase del desarrollo del l6bulo 6ptico se extiende desde E6 a E12 y se caracteriza principalmente por la migraci6n desde el epitelio neural de un gran n6mero de c6lulas diferenciadas y hacia el final del E12 se pueden identificar los principales estratos y muchas de las subdivisiones de estas capas pueden ser claramente reconocibles (Fig. 9, B). Entre el E6 y el E12 el espesor del l6bulo aumenta 4 veces, lo cual puede atribuirse a varios factores:

1. migraci6n de las c6lulas desde el epitelio neural;
2. desarrollo y crecimiento de los procesos de las neuronas "j6venes" y c6lulas gliales;
3. entrada de las fibras del nervio 6ptico desde el S0;
4. la formaci6n del SAC que posee el mayor n6mero de redes de eferencias del l6bulo 6ptico.

Veamos un breve an6lisis de cada uno de estos factores.

1. Ya que la proliferaci6n celular del epitelio neural cesa en el E12, no se agregan nuevas neuronas luego de esta fase, las c6lulas gliales que han migrado desde el epitelio neural, pueden dividirse "in situ" y, por supuesto, las c6lulas endoteliales contin6an proliferando hasta que el l6bulo se encuentra muy vascularizado.
2. Con respecto al desarrollo y crecimiento de los procesos dendr6ticos, se conoce que 6stos contribuyen significativamente a la formaci6n de las capas plexiformes.
3. Las fibras retinales alcanzan el l6bulo entre E5-E6, hacia el E8 lo rodean y cubren, formando el S0 y en el E10 lo invaden en la zona dorsomedial. El polo caudal del l6bulo es la 6ltima zona en ser inervada, lo que ocurre alrededor de E12.
4. El SAC contribuye a aumentar el espesor del l6bulo 6ptico ya que es uno de

los sistemas de fibras que se desarrollan más temprano en el lóbulo: E6.

La tercer fase en el desarrollo del lóbulo se extiende desde E12 a E18 y está marcado por un crecimiento de las células y sus sistemas de fibras, que se extienden en varias capas, y se completa así la citoarquitectura del lóbulo (Fig. 9, C). Las láminas externas del SGFS no se forman hasta unos días después de la entrada de las fibras de la retina. En caso de que no lleguen los axones de la retina, esas capas no se formarán. Esto último ha sido muy estudiado por remoción del ojo en los estadios tempranos del desarrollo del pollo (8).

Se hace finalizar esta 3° fase del desarrollo en el E18, ya que en este estadio el lóbulo óptico ha alcanzado la citoarquitectura del estadio maduro (ver Figs. 9 C y 4). Esto es un poco arbitrario ya que se conoce que el desarrollo continúa en forma ininterrumpida luego de la eclosión (35).

1.6. Glicoproteínas en el sistema nervioso central

Se ha observado que las sinapsis del SNC se tiñen intensamente con técnicas para carbohidratos (42) y se han identificado numerosas glicoproteínas como componentes de la membrana sináptica (43,44,45). Por consiguiente, resulta de interés estudiar el posible papel que estas moléculas pueden jugar en la diferenciación y regulación de la actividad sináptica (46,47).

Varios autores han trabajado en la identificación y caracterización de las glicoproteínas de sinapsis tanto en sistema nervioso en desarrollo como maduro (48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60). Sin embargo, todavía existe escasa información relacionada con el posible papel funcional de estas moléculas en las sinapsis.

En la actualidad están siendo ampliamente estudiadas las moléculas relacionadas con el reconocimiento y la adhesión celular en el SNC. Al presente,

la mejor caracterizada, es la molécula de adhesión celular neuronal (NCAM). Se ha demostrado que es una glicoproteína biosintetizada en el cerebro y que tiene funciones de adhesión entre neurona-neurona, neurona-astrocito y astrocito-astrocito (61,62,63,64,102,103). Existen otras glicoproteínas de adhesión celular como la L1 (101) y NILE (neuronal inducible large external) la cual es inducible por el factor de crecimiento neuronal (65) y que está siendo muy estudiada en diversos laboratorios.

También son glicoproteínas las moléculas relacionadas con la excitabilidad neuronal (37), y otras mayoritarias en cerebro como Thy-1 cuya función permanece desconocida, aunque se las ha relacionado con el desarrollo del SNC (38).

También son numerosas las glicoproteínas asociadas a mielina (105).

1.7. Biosíntesis de las glicoproteínas

En el SNC existen glicoproteínas O-glicosídicas y en mayor número, N-glicosídicas (89). Estos grupos difieren en el tipo de unión azúcar aminoácido, siendo α -N-acetilgalactosaminil-serina/treonina y β -N-acetilglucosaminil-asparagina, respectivamente. Difieren también en las vías biosintéticas, siendo a través de un mecanismo aparentemente más sencillo en las O-glicosídicas. Se realiza por adición directa y secuencial de monosacáridos catalizada por glicosil-transferasas a partir de los nucleótidos azúcares respectivos a los polipéptidos nacientes (66,67). La biosíntesis de las glicoproteínas tipo N-Asp es algo más compleja (68,69,70). Si una proteína contiene el triplete Asn-X-Ser(Thr), donde X es un aminoácido indefinido, este resto es potencialmente aceptor de un oligosacárido que se unirá N-glicosídicamente a un grupo amino (71,72). El oligosacárido es ensamblado sobre el lípido dolicol (68), como se verá más

adelante. La mayoría de las estructuras de oligosacáridos que se encuentran unidos de esta forma están relacionados con uno u otro de los dos tipos mostrados en la Fig. 10. La estructura A en esta figura es conocida como tipo simple, "high mannose" u oligomanosil y la estructura B se conoce como tipo compleja, "complex" o lactosaminil (este disacárido lactosamina tiene la siguiente estructura: Gal-4GlcNAc).

Se puede observar que tanto las estructuras A como B contienen una zona proximal pentasacárido idéntica formada por tres residuos de manosa y dos de N-acetilglucosaminas. Esto se explica porque ambas estructuras comparten las etapas iniciales de su síntesis y sus diferencias, se producen posteriormente, durante su procesamiento, como se verá más adelante.

Todo el oligosacárido oligomanosil y el "core" proximal del oligosacárido lactosaminil son ensamblados sobre el difosfodolicol. Los detalles de este ensamblado se resumen en la Fig. 11. El ciclo del dolicol se pudo establecer gracias a los trabajos realizados por Leloir y col. (68). Las células productoras de glicoproteínas de exportación o de membranas sintetizan sus proteínas en ribosomas del retículo endoplásmico rugoso. La N-glicosilación procede de la siguiente manera: la adición del oligosacárido (etapa 6 de la Fig. 11) ocurre durante o inmediatamente después de la síntesis de la cadena proteica. La glicoproteína con la cadena proteica completa, ya sea que se encuentre en solución en el espacio luminal del retículo o unido a la membrana, con sus oligosacáridos expuestos hacia el espacio luminal, quedan expuestas a distintas hidrolasas (Fig. 11). Estas glucosidasas, manosidasas y N-acetilglucosaminil transferasas de las etapas 10 y 11 mostrados en dicha figura actúan en el retículo endoplásmico rugoso y en el aparato de Golgi. En esta organela se agregan los residuos galactosil y por la acción de las sialil-transferasas se completan los oligosacáridos tipo "complex" (68).

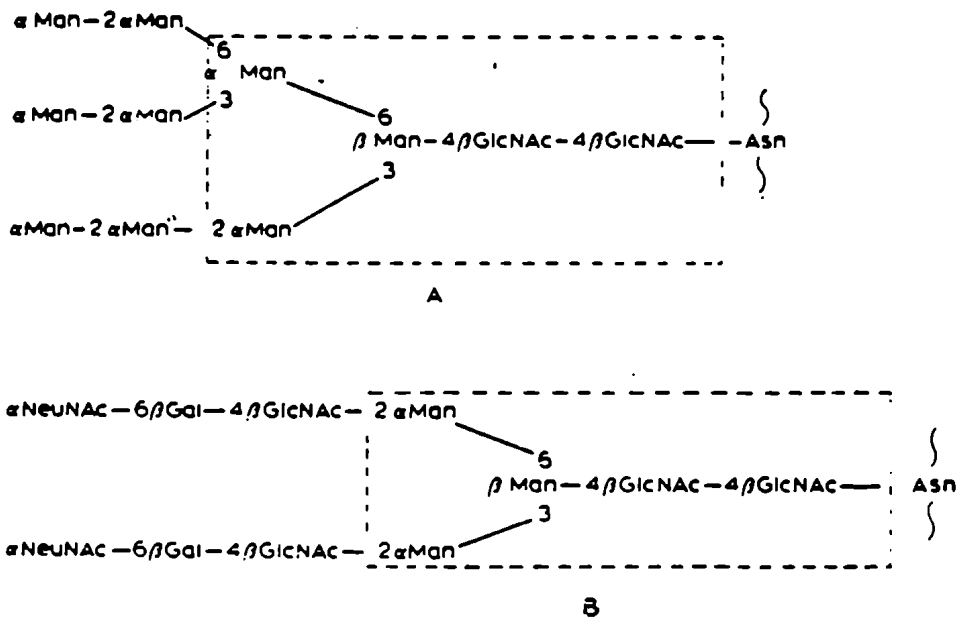


Figura 10. Estructura básica de oligosacáridos unidos N-glicosídicamente al residuo asparagina de proteínas.

A. Tipo simple u oligomanosil; B. Tipo complejo o lactosaminil. La línea de rayas rectangular encierra el "core" común a ambos tipos de estructuras. NeuNAc, ácido N-acetilneuroamínico.

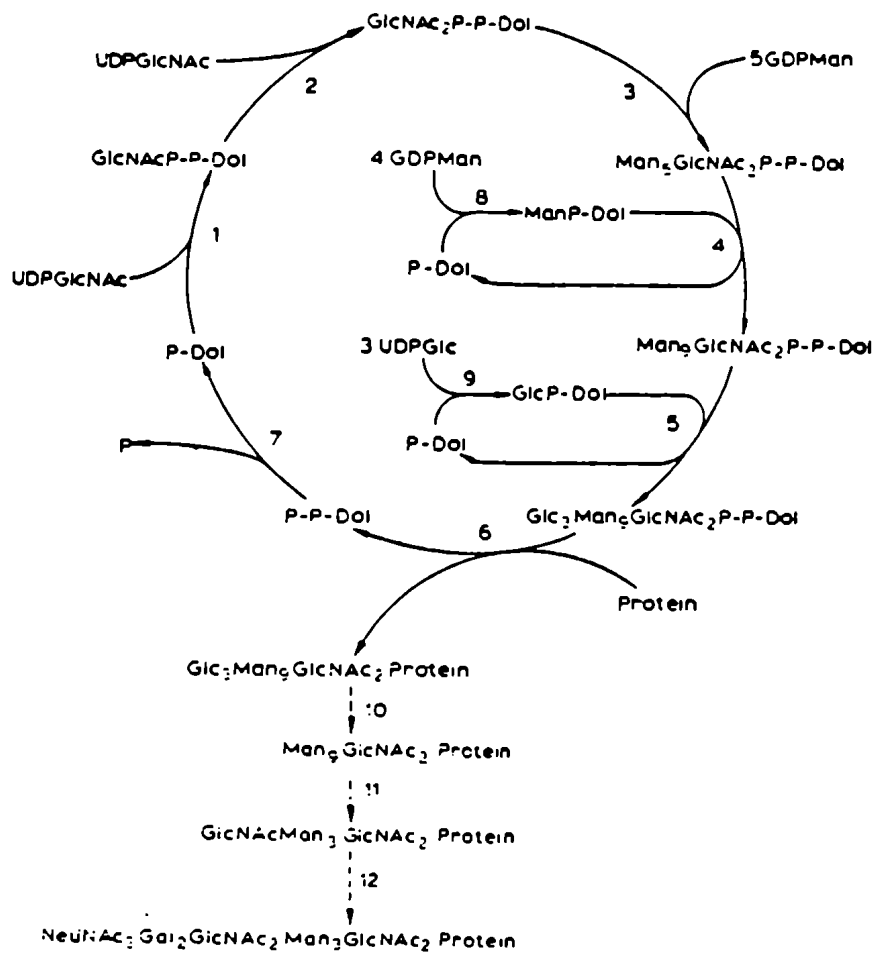


Figura 11. El ciclo del dolicol resume el ensamblado del oligosacárido sobre el difosfodolicol y su transferencia en bloque al residuo asparagina de la proteína.

También se indican las subsecuentes modificaciones de la cadena de oligosacárido.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Animales

Se utilizaron embriones de pollos Leghorn desde 6 días hasta animales de 20 días post-natal de ambos sexos. Los huevos embrionados fueron obtenidos de un expendedor local. Se mantuvieron en el laboratorio en una incubadora a 38°C en ambiente húmedo.

Producida la eclosión, luego de secar los pollitos en la incubadora durante por lo menos 8 horas, se criaron con dietas comerciales (alimento balanceado, Cargill S.A.) y agua "ad libitum". La temperatura adecuada y luz continua se lograron con la aplicación de luz blanca incandescente durante las 24 horas.

En el caso de embriones, la edad fue estimada de acuerdo a los criterios morfológicos previamente descriptos (12).

2.2. Incubaciones

2.2.a. Medios

En las incubaciones se empleó medio mínimo esencial de Eagle (Cat. #410-1100-Gibco Co.) suplementado con 2,2 g/l de NaHCO_3 (para lograr un pH de 7,4 en atmósfera de aire con 5% CO_2 a 37°C) y glutamina para una concentración final de 2 mM. Cuando corresponda, se indicará si se agregan o quitan precursores o compuestos al medio de incubación.

2.2.b. Incubador de CO_2

Se empleó un incubador Forma Sci., a 37°C de CO_2 en aire humidificado para evitar la evaporación del medio de incubación.

2.2.c. Precursores radioactivos

Se emplearon Man-2³H (15 Ci/mM); Leu-4,5³H (60 Ci/mM) y deoxiglucosa-¹⁴C (300 mCi/mM) de ARC Inc.

2.2.d. Preparación de medios de incubación radioactivos

La cantidad necesaria de precursores radioactivos fueron evaporados con aire a 37°C, en el caso en que estuvieran disueltos en etanol. Luego se les agrega el medio de incubación adecuado para cada experimento.

2.3. Técnica de microcultivos

2.3.a. Disección de los lóbulos ópticos

Se decapitó a los animales con tijera y se disecaron los lóbulos ópticos luego de una rápida separación de meninges. Se depositaron sobre papel de filtro embebidos en medio.

2.3.b. Obtención de partículas

Se cortaron los lóbulos ópticos en pequeños trozos con una hoja de afeitar y se transfirieron a un tubo cónico de 10 ml (Falcon Plastics Inc.) con aproximadamente 7 ml de medio, que se colocó en baño de agua a 37°C. Con pipeta Pasteur de 1 mm de diámetro, se aspiró y expelió el material unas 10 veces. En caso de lóbulos ópticos embrionarios de hasta 8 días, directamente al disecarlos se pasaron al tubo cónico, siendo aspirados y expelidos entre 4 y 6 veces con pipeta Pasteur. El material se deja sedimentar durante unos 30 segundos y luego se descarta el sobrenadante.

2.3.c. Siembra e incubación de las partículas de lóbulo óptico

El material sedimentado se sembró con pipeta Pasteur en microcavidades (NUNC, Dinamarca, 7 mm diámetro x 12 mm de altura). Se sembraron unos 5 μ l (150 μ g de proteína/cavidad). Luego se agregaron 50 μ l de medio de incubación (con los precursores correspondientes), y se resuspendieron las partículas con una suave vibración de la placa. Se utilizaron dos cavidades para cada valor experimental.

El tiempo transcurrido desde la decapitación hasta el inicio de la incubación fue de tres minutos aproximadamente. La placa se colocó en el incubador de CO₂ y a partir de ese momento se cronometró el tiempo de incubación.

2.3.d. Detención de la incubación y procesamiento para la medición de radioactividad en proteínas

La detención de la incubación se hizo con el agregado de 2 ml de solución salina de fosfatos (PBS) a 0°C y pH 7,4. El material se resuspendió, y se transfirió a tubos para su centrifugación a 3.500 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante se descartó y el pellet se sonicó (Branson Sonic) en 500 μ l de agua. Se separó una alícuota de 50 μ l para la determinación de proteínas. Al resto del sonicado se le agregó ácido tricloroacético (TCA) para lograr una concentración final del 10%. Se añadieron 50 μ l de portador inactivado (10 mg proteína/ml) y se sonicó nuevamente.

Los tubos se calentaron a 90°C durante 20 minutos en baño de agua para lograr la hidrólisis de lípidos intermedarios y acrecentar la coagulación. A continuación se procedió al lavado del material como se indica en el esquema I. La proteína incubada lavada se disolvió con NCS (Amersham Co.) 0,2 ml a

Esquema I. Lavado de la proteína incubada.

Material TCA (10%) caliente (90°C-20 min)
insoluble

Centrif. 3500 rpm
20 min ↓ → desc. S.N.

pellet
sonicado con 1 ml agua
y luego con 1 ml TCA 10%

Centrif. 3500 rpm
20 min ↓ → desc. S.N.

pellet
sonicado con 2 ml de metanol

Centrif. 3500 rpm
20 min ↓ → desc. S.N.

pellet
secado con aire
↓
(proteína incubada lavada)

56°C y agitación intermitente durante media hora.

El digerido se transfirió cuantitativamente con líquido centelleador en base a tolueno-PP0 (2,5 difeniloxazol) a un vial de centelleo líquido y se neutralizó el álcali del solubilizador de tejidos (NCS) con 15 μ l de ácido acético glacial (Merck). El conteo de radioactividad por centelleo líquido se efectuó en un espectrómetro Beckman modelo 8.100. Las conversiones cpm a dpm se efectuaron con estándares apropiados (New England Nuclear).

2.4. Determinación de proteínas

Las determinaciones de proteínas se realizaron por el método de Lowry y col. (73). Se empleó como estándar una solución de 1 mg/ml de albúmina bovina cristalizada y liofilizada (fracción V de Sigma Chem. Co.).

2.5. Medición de Man-2³H en el medio de incubación

Se determinó por la desaparición de manosa tritiada en el medio. A los tiempos que corresponde se obtuvo una alícuota de 5 μ l del medio de incubación, previo a frenar las mismas con PBS. Normalmente, se utilizan 2 microcavidades por cada valor experimental, significa que se tenían 10 μ l para cada tiempo de incubación. Se agregó 1 ml de agua y se pasaron 100 μ l a un vial para centelleo líquido donde se agregaron 0,1 ml de HCl 2 N y se secó bajo corriente de aire caliente. Este procedimiento se efectuó para eliminar $^3\text{H}_2\text{O}$ y $^3\text{HCO}_3^-$ generados por la metabolización de la Man-2³H. Luego se les agregó líquido centellador de Bray (74).

2.6. Determinación de glucosa en el medio de incubación

Se midió enzimáticamente, con el "kit" comercial glucosa-oxidasa (Boehringer Mannheim, GmbH). En los tiempos correspondientes se obtuvieron alícuotas de 10 μ l del medio de incubación, previo a frenarlos con PBS. Cada 2 microcavidades se consideró un valor experimental, es decir que se tuvieron 20 μ l de cada tiempo. Se les agregó 2 ml de glucosa-oxidasa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para leer espectrométricamente a 510 nm, usando como blanco medio de incubación libre de glucosa y de suero fetal bovino (SFB). Los medios de incubación no generaron turbidez ni precipitados con el reactivo empleado. Manosa en una concentración de 1 g/l no da coloración.

Los resultados obtenidos se expresan como desaparición de glucosa (μ g azúcar/mg proteína/hora).

2.7. Captación de azúcares radioactivos

2.7.a. Captación de Man-2³H

Se midieron cada 15 segundos durante 10 minutos como máximo. Se incubó el tejido (300 \pm 30 μ g prot/tubo) en presencia de 5 μ l de Man-2³H/tubo en tubos Eppendorf con 50 μ l de medio/tubo, en baño de agua a 37°C, con agitación intermitente. A los tiempos correspondientes se frenó la incubación agregando 1 ml de PBS adicionado con 1 g/l de manosa fría. Se consideró un tubo para cada valor experimental. Luego de una centrifugación en la microfuge (Eppendorf) durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante. Se hicieron 2 lavados con PBS con manosa fría, antes de redissolver y sonicar el material en 200 μ l de agua, de donde se tomó una alícuota para la determinación de proteínas. Se centrifugó en la microfuge durante 10 minutos y todo el sobrena-

dante se pasó a un vial para centelleo líquido donde se agregó mezcla centelladora de Bray.

2.7.b. Captación de glucosa-¹⁴C

Se procedió como para medir captación de Man-²³H. Se agregó 2,5 μ Ci glu-¹⁴C/tubo en 50 μ l de medio sin glucosa. Los lavados se hicieron en PBS adicionado con glucosa fría.

2.7.c. Captación de deoxiglucosa-¹⁴C

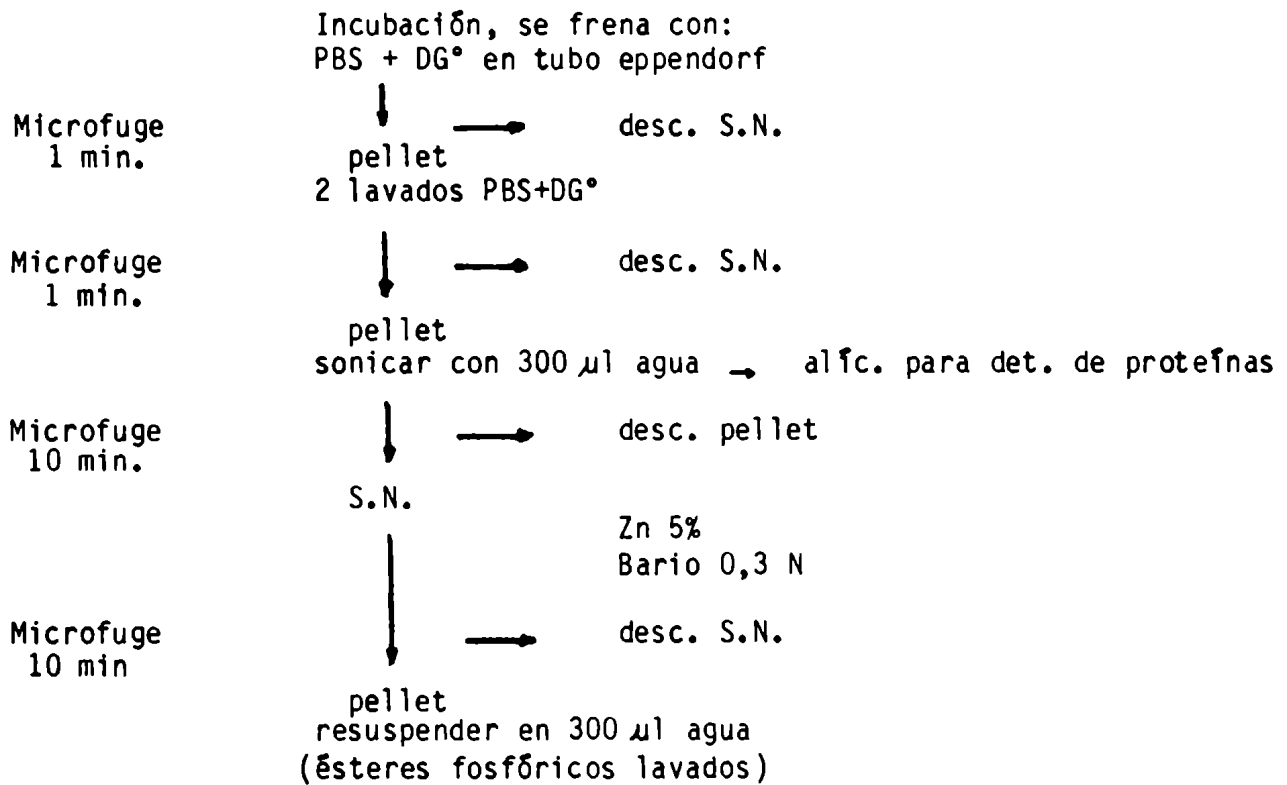
Se determinó su captación como se hizo para Man-²³H. Se utilizó 416 μ Ci DG-¹⁴C/tubo en 50 μ l de medio/tubo. Los lavados se hicieron con PBS más deoxiglucosa fría.

2.8. Acumulación de deoxiglucosa-6-fosfato-(¹⁴C). Modificación del método de Sokoloff

La determinación de velocidad de consumo de glucosa en tejido nervioso se basó en el uso de 2-deoxiglucosa-¹⁴C (DG-¹⁴C) como un trazador de la fosforilación de glucosa por la hexoquinasa. Una vez fosforilada, la DG es atrapada en el tejido (75,76). Se incubaron partículas de lóbulos ópticos (150 \pm 15 μ g/cavidad) en cajas NUNC en 50 μ l de medio/cav. que contenía 100 μ Ci DG-¹⁴C/cavidad. Se consideraron 2 microcavidades para cada valor experimental. En los tiempos correspondientes se frenaron las incubaciones con PBS+DG sin marca, enfriado a 0°C. El material se resuspendió, se transfirió a tubitos Eppendorf y se centrifugó durante 1 minuto en microfuge (Eppendorf). El sobrenadante que contenía la mayor parte del medio de incubación se descartó y el pellet se lavó 2 veces con PBS+DG° como se indica en el esquema II.

El pellet lavado se resuspendió en 300 μ l de agua y se sonicó. Una

Esquema II. Acumulación ^{14}C -DG-6P-



alícuota fue entonces obtenida para la determinación de proteínas. Al resto del sonificado se lo centrifugó en microfuge durante 10 minutos, se descartó el pellet. Al sobrenadante se le agregó sulfato de zinc para una concentración final del 5% y 0,3 N de concentración final de hidróxido de bario para precipitar los ésteres fosfóricos marcados, que se obtienen luego de una centrifugación en microfuge de 10 minutos en el pellet. Con su resuspensión en 300 μ l de agua se obtuvieron los ésteres fosfóricos lavados. Se pasan a vial para centelleo líquido en solución de Bray con el agregado de 40 μ l de ácido acético glacial para compensar el pH.

2.9. Extensión temporal del micrométodo de incubación de partículas de tejido nervioso

Con el objeto de obtener una cinética lineal de incorporación de tritio a proteínas a partir de Man- 2^3 H durante 24 horas de incubación se procedió de la siguiente manera.

Partículas de lóbulo óptico de embriones de pollo de 18 días se incubaron a distintos tiempos durante 24 horas. La obtención de los explantos se hizo bajo campana de flujo de aire controlado y con material de disección estéril. Una vez obtenido el particulado se sembró (150 μ g/cav) en cavidades para incubación (LINBRO Scientific Inc., U.S.A., 17 mm de diámetro), juntamente con 1 ml de medio de incubación conteniendo 1 g/l de glucosa y 5-10 μ Ci de Man- 2^3 H. A los tiempos deseados se obtuvieron alícuotas del medio para medir glucosa remanente. Se utilizó una cavidad para cada valor experimental y se procesó el material como se indica en Materiales y Métodos para medición de radioactividad en proteína y la cantidad de proteína incubada.

2.10. Ensayo de incorporación de ^{32}P . Gel de poliacrilamida. Autorradiografía.

Partículas del tejido se incubaron en cajas de LINBRO Scientific Inc., U.S.A., de 17 mm, durante 1:30 horas. Se colocaron 100 μCi ^{32}P /cav. en presencia de 500 \pm 50 μg prot/cav, juntamente con 250 μl de medio (sin fosfatos)/cav. Las incubaciones se frenaron con PBS enfriado a 0°C. El material se resuspendió y transfirió a tubos apropiados. Se centrifugó a 3.500 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Luego de este lavado, el particulado se solubilizó con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2% en fosfato monosódico 5 mM (150 μl por tubo). Se sonicó y una alícuota de 20 μl se separó para determinar proteínas. Otra alícuota de 50 μl , se pasó a un vial para centelleo líquido y se le agregó mezcla centelladora de Bray, para expresar la entrada de fosfatos al tejido.

Otra parte, 30 μl , se precipitó con TCA al 10% y se calentó a 90°C durante 20 minutos, luego se procesó para medir radioactividad en proteínas como se indica en Materiales y Métodos.

A los 50 μl restantes se les agregó cracking buffer para hacer un gel (ver Materiales y Métodos).

2.11. Incorporación de uridina- ^3H al tejido nervioso

Se incubaron 150 \pm 15 μg prot/cav. con 10 μl uridina- ^3H /cav. y 50 μl medio/cav. durante distintos tiempos hasta 70 minutos para medir la cinética de incorporación de radioactividad a RNAs.

Cada 2 microcavidades se consideró un valor experimental. Se frenaron los cultivos con PBS enfriado en hielo. Se transfirió el material a tubos apropiados para su centrifugación a 3.500 rpm durante 2 minutos. Se descartó

el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 600 μ l de agua y se tomó una alícuota de 40 μ l para medir proteínas. Al resto del sonicado se le agregaron 600 μ l de TCA al 10% y carrier de proteínas. Se sonicó y centrifugó el material durante 15 minutos a 3.500 rpm. Se descartó el sobrenadante. Este lavado con agua y TCA 10% se repitió otras 2 veces. Luego se agregó PBS, se sonicó y centrifugó. El pellet se resuspendió en 100 μ l de hidróxido de Na 0,2 N y se lo incubó a 37°C durante 4 horas. Luego se pasó una alícuota a un vial para contar centelleo líquido y se le agregó mezcla centelladora de Bray.

2.12. Medición de la síntesis de gangliósidos a partir de glucosamina-³H

La medición se hizo de acuerdo a (77).

Se hicieron incubaciones de 3 horas colocando 10 μ l glucosamina-³H/cav, 150+15 μ g prot/cav. y 50 μ l medio/cav. Se consideraron 2 microcavidades para cada valor experimental. Se frenaron las incubaciones con PBS, luego se centrifugaron a 3.500 rpm durante 2 minutos y se descartó el sobrenadante.

El pellet se resuspendió en 600 μ l de agua y se sonicó. Una alícuota de 50 μ l se obtuvo para determinar proteínas. Al resto del sonicado se le agregó 600 μ l TCA 10%-ácido fosfotúngstico (PTA) al 1%. Se centrifugó, descartando el sobrenadante. Al pellet se lo lavó 3 veces con 1 ml de agua más 1 ml de TCA-PTA. Posteriormente se lavó con 1 ml de agua, al pellet se le agregaron 2 ml de cloroformo:metanol, 2:1, se centrifugó y se descartó el pellet. Al sobrenadante se lo pasó a viales para contar centelleo líquido y se lo secó. Se retomó en 0,4 ml de agua y luego se agregó 10 ml de cóctel de centelleo de dioxano-naftaleno-PP0.

2.13. Caracterización de productos

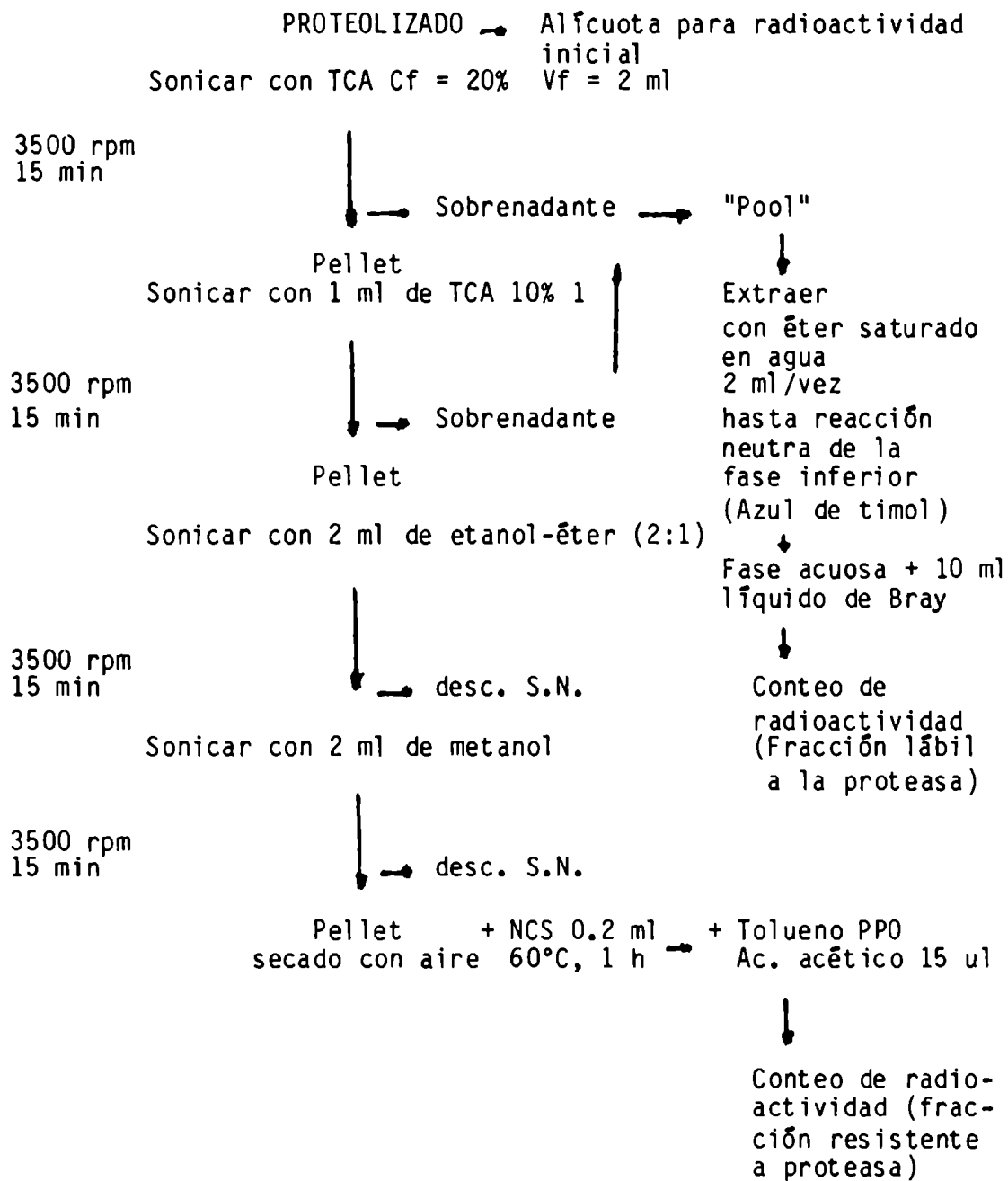
2.13.1. Proteólisis

El material lavado y seco proveniente de incubaciones con Man- 2^3H , procesado como se explica en 2.3.d, se incubó con 500 μl de buffer Tris-HCl pH 7,8; 0,1 M, 5 μl CaCl_2 (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$) y 0,2 mg de proteasa tipo VIII de Sigma Chem. Co. La digestión se efectuó a 37°C en atmósfera de tolueno durante 3 días, con 1 agregado de 1 alícuota de enzima por día y el agregado a los 2 días de 500 μl de buffer.

Se agregó TCA hasta una concentración final de 20% en un volumen final de 2 ml. Se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos. Al pellet se le hicieron los lavados del esquema III, la radioactividad de este pellet corresponde a la fracción resistente a la proteasa. Al sobrenadante se le agrega azul de timol y se extrae con 2 ml por vez de éter saturado en agua hasta obtener reacción neutra en la fase inferior (acuosa). En la fase superior está el éter que extrae el TCA. Finalmente se pasa la fase acuosa (con oligosacáridos) a un vial para centelleo líquido y se agrega mezcla centelladora de Bray. Se obtiene así la fracción lábil a la proteasa.

Se considera la radioactividad de la proteína lavada inicial como 100%. Para calcular la recuperación debe restarse al 100% la suma de las radioactividades en la fracción lábil a la proteasa más, la de la fracción resistente.

Esquema III. Separación de productos de proteólisis.



2.13.2. Labilidad al ácido

El particulado proveniente de 1 microcavidad incubada con 150 μCi Man- 2^3H , 150+15 μg prot y 50 μl medio, durante 3:30 Horas se procesó como sigue. Se lavó la proteína como se indica en 2.3.d., agregándose un lavado con etanol:éter 2:1, previo al metanol y secado. Luego se redisolvió en 200 μl de agua. Se le agregó 100 μl de HCl 12 N, se sonicó y se pasó a una ampolla de vidrio lavando el tubo que contenía el material con 200 μl de agua, llegando a un volumen final de 500 μl . Se selló la ampolla y se puso a hervir durante 4 horas, con lo cual se consigue la hidrólisis de los oligosacáridos.

Se rompió la ampolla para secar el material con aire a 56°C con lo que se evapora el HCl. Luego se realiza una cromatografía en papel como se explica a continuación.

2.13.3. Cromatografía en papel

El material obtenido luego del tratamiento ácido se redisolvió en 200 μl de agua para sembrar en papel Whatman N°1. En otros carriles se agregaron fucosa y manosa juntas y por separado, 1 μmol para cada azúcar, como estándares. Se cromatografió durante 30 horas en *n*-butanol:piridina:agua, 6:4:3.

Luego del secado, el cromatograma se reveló por el método térmico-UV (78) y se marcaron las bandas de azúcares. Se cortó la tira proveniente de la muestra hidrolizada en secciones de 1 cm y se midieron para radioactividad empleando tolueno-PP0.

2.13.4. Tratamiento con álcali suave

La proteína lavada y seca como se explica en 2.3.d., se sometió a una β -eliminación como sigue. Se redisolvió la proteína (aprox. 200 μ g) en 1 ml de NaOH 0,05 N, se sonicó y mantuvo a 25°C durante 24 horas. Luego se agrega TCA hasta una concentración final del 10% en un volumen final de 2 ml. Se centrifugó a 3.500 rpm por 15 minutos. Los lavados siguientes repiten los del esquema IV. Obteniéndose en la radioactividad del pellet la fracción no lábil al álcali suave. A los sobrenadantes del TCA que siguen a la β -eliminación se les hizo una extracción del TCA con éter y la medición de radioactividad en la fase acuosa en Bray corresponde a la fracción lábil al álcali.

La recuperación se calcula como la radioactividad inicial (100%) menos la suma de las radioactividades de las fracciones lábil y no lábil al álcali.

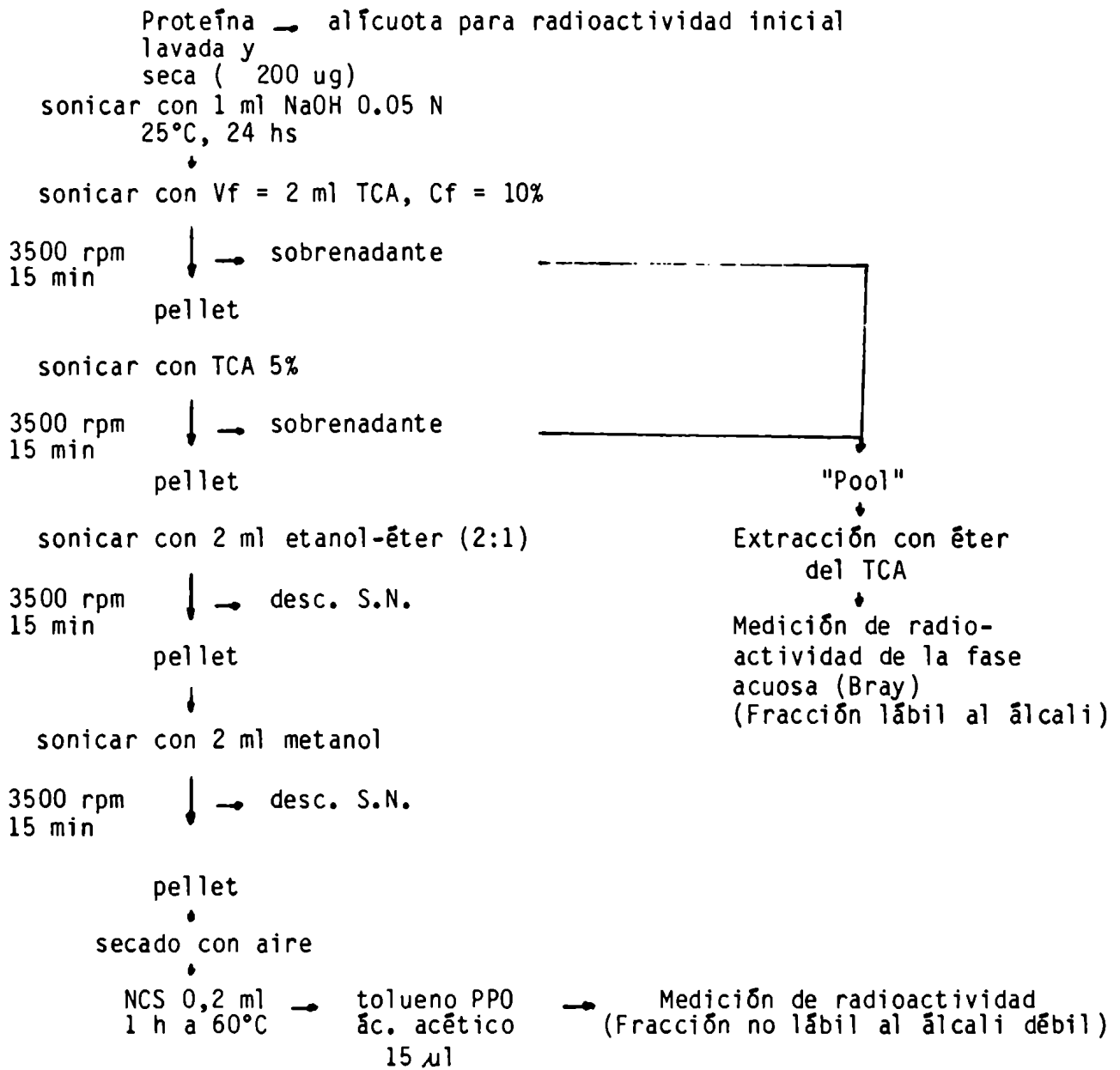
La fracción lábil al álcali contiene los oligosacáridos que tenían uniones O-glicosídicas a hidroxiaminoácidos como serina o treonina.

El mismo tratamiento se repitió, pero disolviendo la proteína en NaOH, 1 N durante 2 horas a 25°C con lo cual se puede estimar la cantidad de glicoproteínas marcadas con ^3H a partir de Man- 2^3H con uniones N-glicosídicas, ya que con la hidrólisis alcalina fuerte se hidrolizan dichas uniones.

2.13.5. Obtención de oligosacáridos a partir de lípido-oligosacáridos intermediarios

El particulado se incubó durante 2 horas (aprox. 600 μ g de proteína) con 300 μ Ci Man- 2^3H y 1,5 ml de medio en 3 cavidades cajas LINBRO (c/u equivalente a unas 15 microcavidades). Se frenó con PBS enfriado en hielo y

Esquema IV. Tratamiento con álcali suave de la proteína marcada con ^3H a partir de Man- 2^3H .



se pasó el material a 1 tubo apropiado para centrifugar a 3.500 rpm durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 0,25 ml de buffer (1 mM EDTA, 50 mM Tris-ClH, 160 mM ClNa) y 0,5 ml de metanol (79). Se sonicó y se obtuvo 10 μ l para determinar proteínas. Al sonicado se le agregó 0,75 ml de cloroformo, se agitó y centrifugó 5 minutos a 3.500 rpm hasta obtener una fracción acuosa superior clara, que se descarta. De esta partición de Folch (3:2:1, cloroformo:metanol:agua), obtendremos los lípido-oligosacáridos chicos de la fase inferior y los lípido-oligosacáridos grandes: Dol-PP (NAcGluNH)₂MangGlu₁₋₃ y Dol-PP-(NAcGluNH)₂Man₅₋₉ y proteínas-azúcares de la interfase.

Para obtener dichos oligosacáridos se sigue el esquema V.

2.13.6. Cromatografía de oligosacáridos

Se cromatografiaron en papel Whatman N°1 las muestras usando como estándar (NAcGluNH)₂MangGlu₃ marcado con ¹⁴C, durante 25 días en el sistema de solventes butanol:piridina:agua, 4:3:4.

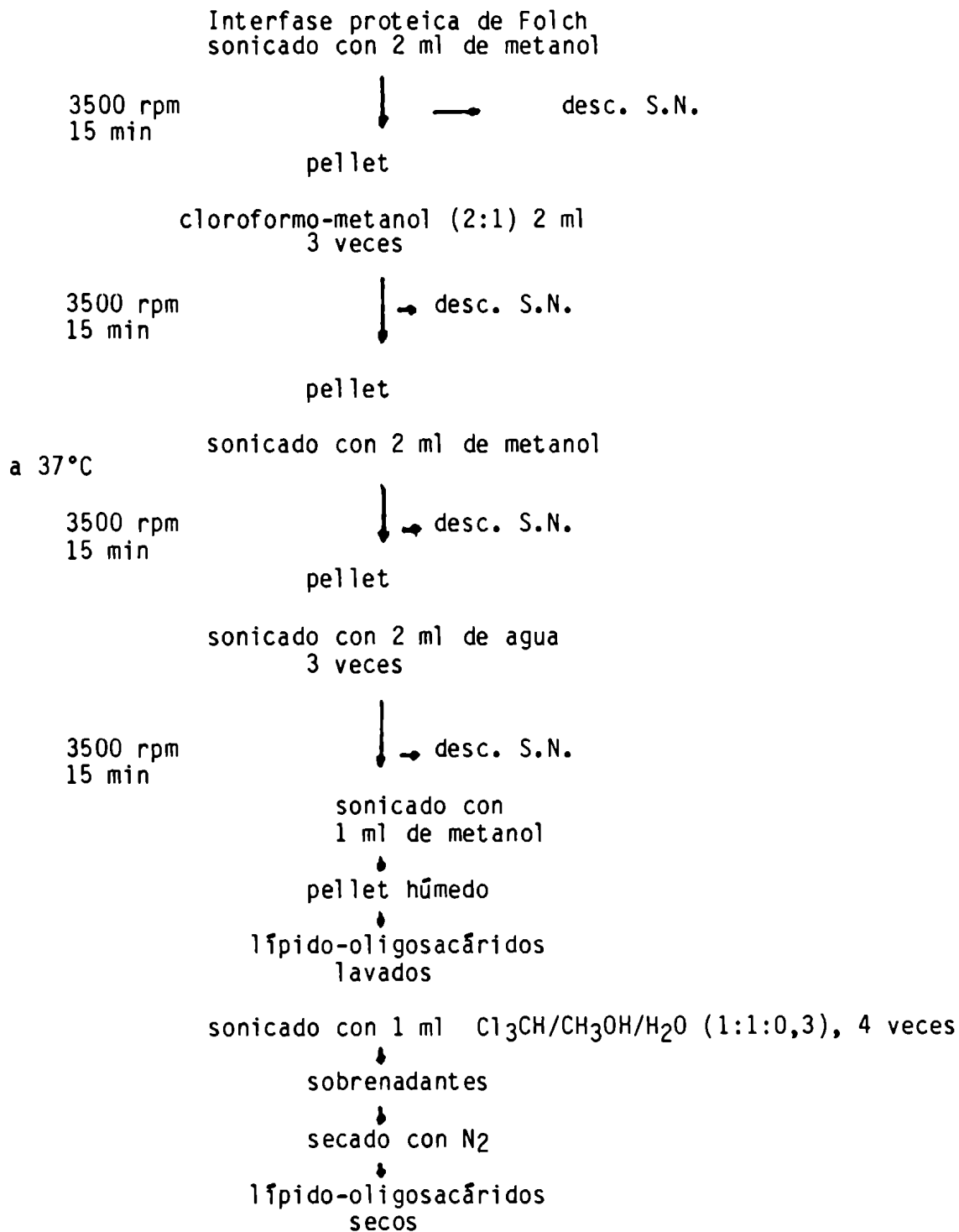
Al finalizar la corrida cromatográfica, la tira que contenía el estándar se cortó y se detectó la radioactividad por barrido. La tira que contenía los oligosacáridos provenientes de la incubación se cortó en secciones de 1 cm y se midió la radioactividad por centelleo líquido.

2.14. Determinación enzimática

2.14.1. Hexoquinasa

Como fuente de enzimas se utilizó homogenato de lóbulo óptico de pollitos de 2 días, y su sobrenadante y pellet, obtenidos luego de una centrifugación a 35.000 g durante 15 minutos. De esta manera se midió la actividad total en el homogenato, (la actividad debida a la hexoquinasa

Esquema V. Lavado de lípidos-oligosacáridos intermediarios.



citoplasmática), al dosar sobrenadante. Al medir el pellet, se considera la hexoquinasa asociada a mitocondrias (esquema VI).

Cada tubo de reacción contenía los siguientes compuestos: 10 μ l de buffer fosfato 0,1 M pH 7; 25 μ l de enzima; 5 μ l fluoruro de Na 0,4 M; 5 μ l de cloruro de magnesio x 120 μ mol/ml; 5 μ l ATP x 150 μ mol/ml; 5 μ l glucosa- 14 C (seca) y 15 μ l de suero o de agua, en el control.

Se incubó 1 hora a 30°C. Para frenar la reacción se pusieron a hervir durante 2 minutos. Para precipitar los ésteres fosfóricos se agregó 0,15 ml de sulfato de Zinc 5% y 0,15 ml de hidróxido de bario 0,3 N. Se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos y se tomó una alícuota del sobrenadante de 200 μ l para medir la glucosa- 14 C que resta en el medio. Al pellet se lo lavó con solución diluida de sulfato de zinc e hidróxido de bario. Se centrifugó a 3.500 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y al pellet se lo resuspendió en 300 μ l de agua, se les agregó 40 μ l de ácido acético glacial (Merck) y se pasó con mezcla centelladora de Bray a viales para contar centelleo líquido.

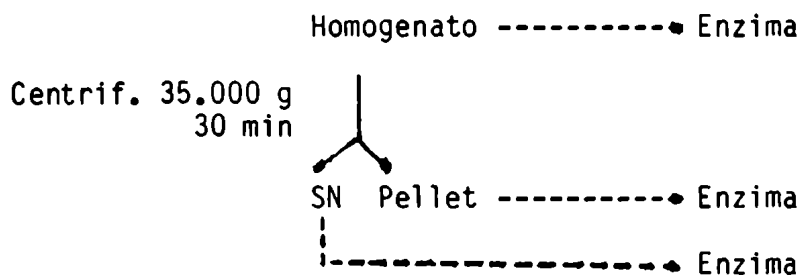
2.14.2. Tripsina y quimotripsina

Tanto la tripsina como quimotripsina se prepararon a una concentración de 1 mg/ml. Se guardan a pH 3, -15°C en solución acuosa y el ensayo se hace a pH 8, 37°C o temperatura ambiente.

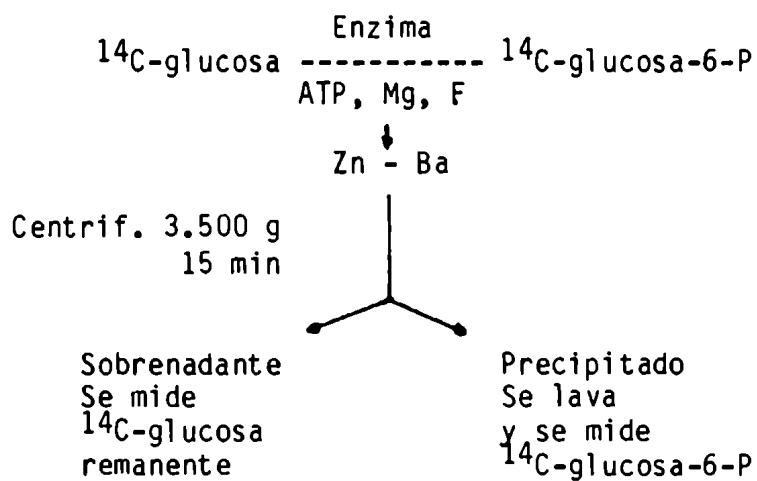
Para el ensayo se utilizó una relación de 40 μ l de suero ultrafiltrado (0,7 μ g/ml) a 15 μ l de tripsina o quimotripsina. Se incubó 30 minutos. Luego, las enzimas se inhibieron con sus inhibidores correspondientes agregando 15 μ l de inhibidor de tripsina (1 mg/ml) o bien 15 μ l de inhibidor chua para la quimotripsina. Dicho inhibidor contiene PMSF 0,5 mM, ácido benzamidina 2 mM y ácido ϵ -amino-n-caproico 1 mM. Se los incubó 15 minutos a

Esquema VI. Actividad de la hexoquinasa

A.



B.



A. Fuentes de enzima

B. Dos formas de medir la enzima, ^{14}C -glucosa remanente en el sobrenadante o ésteres fosfóricos precipitados en el precipitado.

temperatura ambiente. La relación de la enzima con su inhibidor debe ser de 1:1 en masa.

Este suero, así tratado, se agregó a las incubaciones estándar de partículas de lóbulo óptico para medir incorporación de Man- 2^3H a proteína.

2.15. Determinación de azúcares totales

La preparación de la muestra se hizo como sigue. Se tomó 1 lóbulo óptico, se lo cortó en pequeñas secciones y se lo pasó a un tubo con 500 μl de agua, se agregó 2 ml de TCA 10% y se sonicó. Luego de calentar a 90°C durante 20 minutos, se centrifugó a 3.500 rpm, descartando el sobrenadante. Se lavó el pellet con TCA 5% y etanol:éter (1:2). Luego de cada lavado se sonicó, se centrifugó a 3.500 rpm durante 20 minutos, descartando los sobrenadantes. El pellet lavado se redisolvió en 0,5 ml de agua. En cada tubo de ensayo se agregó 20 μl de fenol 80% y 1,25 ml SO_4H_2 concentrado. Se incubó a 100°C durante 15 minutos y se leyó en espectrofotómetro a 490 nm.

Se utilizó como estándar glucosa 5 mM, entre 5 y 70 μl .

2.16. Aislamiento y purificación del factor inhibidor sérico

2.16.1. Ultrafiltrado del suero

Se procedió a realizar el ultrafiltrado del suero, utilizando un filtro de Amicon con un "cut-off" de 10 kD.

2.16.2. Columna de intercambio iónico FPLC

Se hicieron 2 pasadas de 8 ml c/u de suero ultrafiltrado. Se tomaron los eluidos superpuestos, midiéndose A^{280} de cada fracción de 2 ml. Se eluyó con: A- Tris-HCl 50 mM pH 7,6.

B- Tris-HCl 50 mM pH 7,6 más 1 M ClNa gradiente de 0 a 100% en B.

2.16.3. Gel de poliacrilamida. Autorradiografía

Para la preparación de un gel desnaturante de poliacrilamida se procedió de la siguiente manera, de acuerdo a Laemmli (108) con algunas modificaciones. Se preparó persulfato en el momento: 4 puntas espátula en 1 ml H₂O (hielo) (140 mg/ml).

Solución acrilamida-bisacrilamida, en probeta 30 gr acrilamida:0,8 gr bisacrilamida en 100 ml H₂O bidestilada.

Colchón inferior: 6 ml de solución de acrilamida:bisacrilamida.

2 ml H₂O bidestilada.

2 ml Tris-HCl 1 M pH 8,7.

45 µl TEMED.

0,2 ml persulfato.

Se esperan 3 minutos.

Acril-bis 12,5%: 12,5 ml de solución de acril-bisacrilamida.

11,85 ml Tris-HCl pH 8,7 1 M.

5,8 ml H₂O bidestilada.

0,3 ml SDS.

25 µl TEMED.

100 µl persulfato.

Se volcó hasta 4 cm del borde.

Antes que polimerice agregar 1,5 ml butanol soluble en H₂O (50% butanol, 50% H₂O).

Se esperan 15 minutos. Se lava bajo chorro de H₂O destilada y se seca bien con papel de filtro. Se colocó el peine.

Stacking gel: 0,46 ml Tris-HCl 1 M pH 6,8.

0,9 ml de solución de acril:bisacrilamida.

75 µl SDS 10%.

7,5 µl TEMED.

Llevar a 7,5 ml con H₂O bidestilada.

25 μ l persulfato.

Se sacó el peine y se pasó a la cuba. Agregar buffer de corrida arriba y abajo en la cuba.

Buffer de corrida: Tris-glicina: 57,6 gr glicina
12 gr tris 7-9
40 ml 10% SDS
H₂O hasta 4.000 ml

Se siembran las muestras.

Muestras: el tejido incubado del cual se obtuvo una alícuota para medir proteínas y otra para CPM, se trata con 20% TCA, a 95°C 20 minutos, se lo lava con etanol:éter, 2:1, metanol y se seca.

Se le agrega cracking buffer 50 μ l a cada muestra; llevar a color azul del indicador con NaOH; calentar 1 1/2 a 3 minutos, a 100°C.

Cracking buffer: 10 μ l β -mercapto.

5 μ l azul bromo-fenol.

50 μ l Tris-ClH pH 8,7 1 M.

0,4 ml urea 10 M.

Otra forma de preparar la muestra: tejido incubado, frenar con PBS, descartar sobrenadante, resuspender el precipitado con 50 μ l de H₂O, sonicar. Tomar una alícuota de 5 μ l para Lowry, otros 5 μ l para CPM. Al resto agregarle 50 μ l cracking buffer y calentar.

Condiciones de corrida: I=cte=30 mA.

V_150V.

W_3-4W .

6 hs.

Se saca el gel y se lo coloca en Coomassie blue más fijador:

3-5 gr Coomssie blue R250.

1 lt H₂O 45% metanol, 9% acético, en agitación durante 10 hs, aproximadamente.

Para desteñir se utiliza:

20% metanol,

7% acético, con esponjitas, 3 horas, en agitación.

Si se lo deja en agitación durante unas 10 hs, poner en 7% metanol.

5% acético.

Si no, continuar con varios lavados con H₂O durante 1 hora.

Si se desea: salicilato de Na, 1 M, 1 hora.

Se pone a secar, durante 4 horas.

Se hace la autorradiografía a -70°C con película Kodak X-Omat K, para Rayos X.

Posteriormente se hizo el revelado:

1°) Revelador, aproximadamente 2-3 minutos.

2°) H₂O, detenedor, 30 segundos.

3°) Fijador hasta que se vean las bandas.

4°) H₂O para lavar bien.

3. RESULTADOS

3.1. Cantidad de proteína por lóbulo óptico en función de la edad

Con el objeto de conocer la variación de los parámetros básicos del tejido durante el desarrollo, se midió por la técnica de Lowry (73) la cantidad de proteína presente por unidad de lóbulo óptico en cada edad.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 12. La cantidad de proteína aumenta en forma lineal entre los 5 y 8 días embrionarios. No se observa prácticamente aumento en el día 8 hasta el 11 y posteriormente, de nuevo comienza a aumentar en forma apreciable hasta la eclosión.

Si se grafican las pendientes de la curva se tiene una medida de la velocidad de crecimiento de un lóbulo óptico en función de la edad. Estos resultados se observan en el inserto de la Fig. 12, donde se grafican cuatro edades representativas. En el lóbulo óptico de embrión de 6 días, la acumulación de proteínas es de 1 mg por día. En el de 10 días, la acumulación es prácticamente nula (0,1 mg/día). Alrededor del de 16 días embrionarios, se vuelve a los valores de 1 mg por día, para nuevamente decrecer luego de la eclosión.

3.2. Medición de azúcares totales por unidad de lóbulo óptico en función de la edad

Para conocer cómo es la variación de la cantidad de azúcares totales por lóbulo óptico en función de la edad, se aplicó la técnica colorimétrica del fenol-sulfúrico a preparaciones de lóbulo óptico de embriones y pollitos hasta los 21 días, como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados se observan en la Fig. 13. Inicialmente, desde los 6 a 8 días embrionarios la cantidad de azúcares aumenta linealmente. Luego se mantiene prácticamente sin cambios hasta el embrión de 13 días. A partir de esa

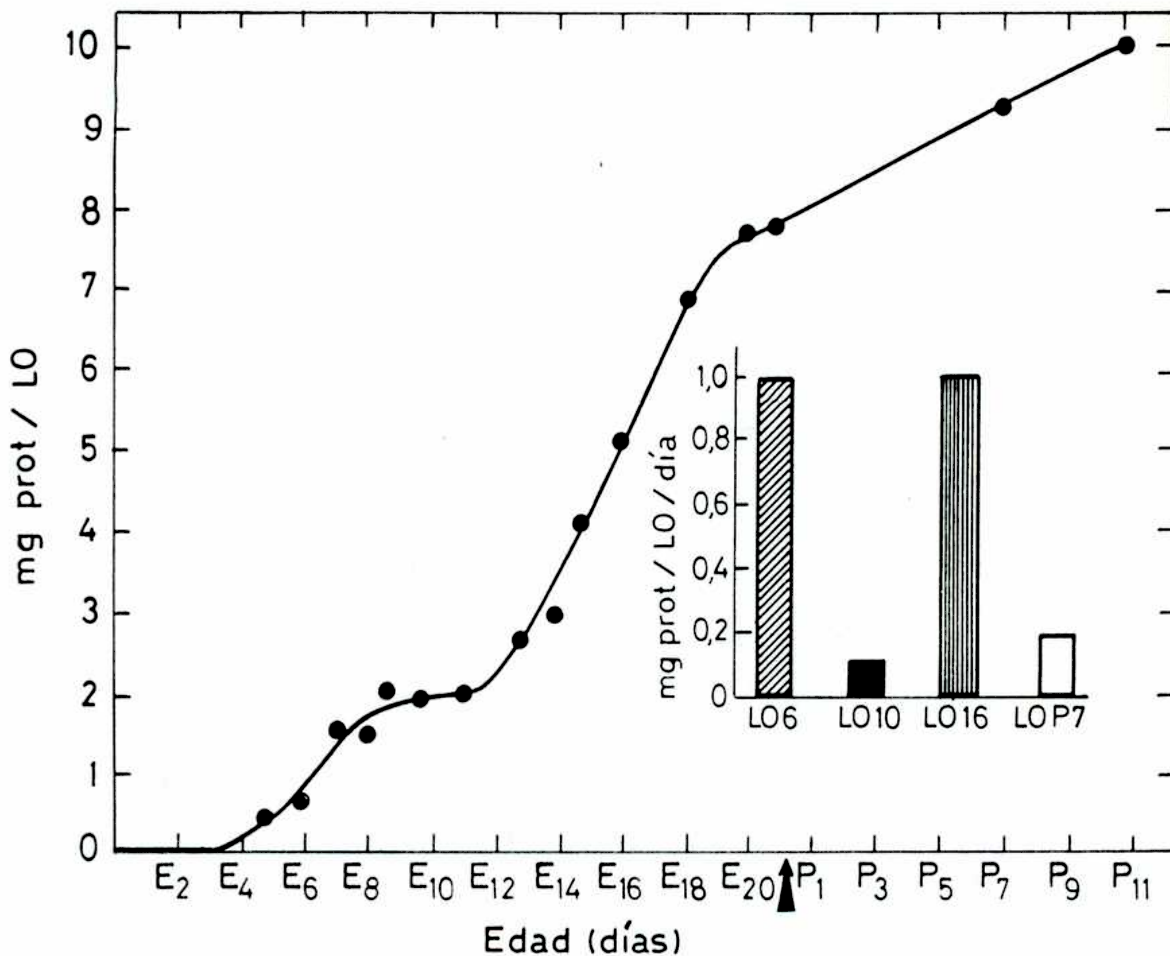


Figura 12. Cantidad de proteína por lóbulo óptico en función de la edad.

Las determinaciones se efectuaron aplicando la técnica de Lowry por unidad de lóbulo óptico.

En el inserto se indica la velocidad de crecimiento del lóbulo óptico en cuatro edades representativas de su desarrollo.

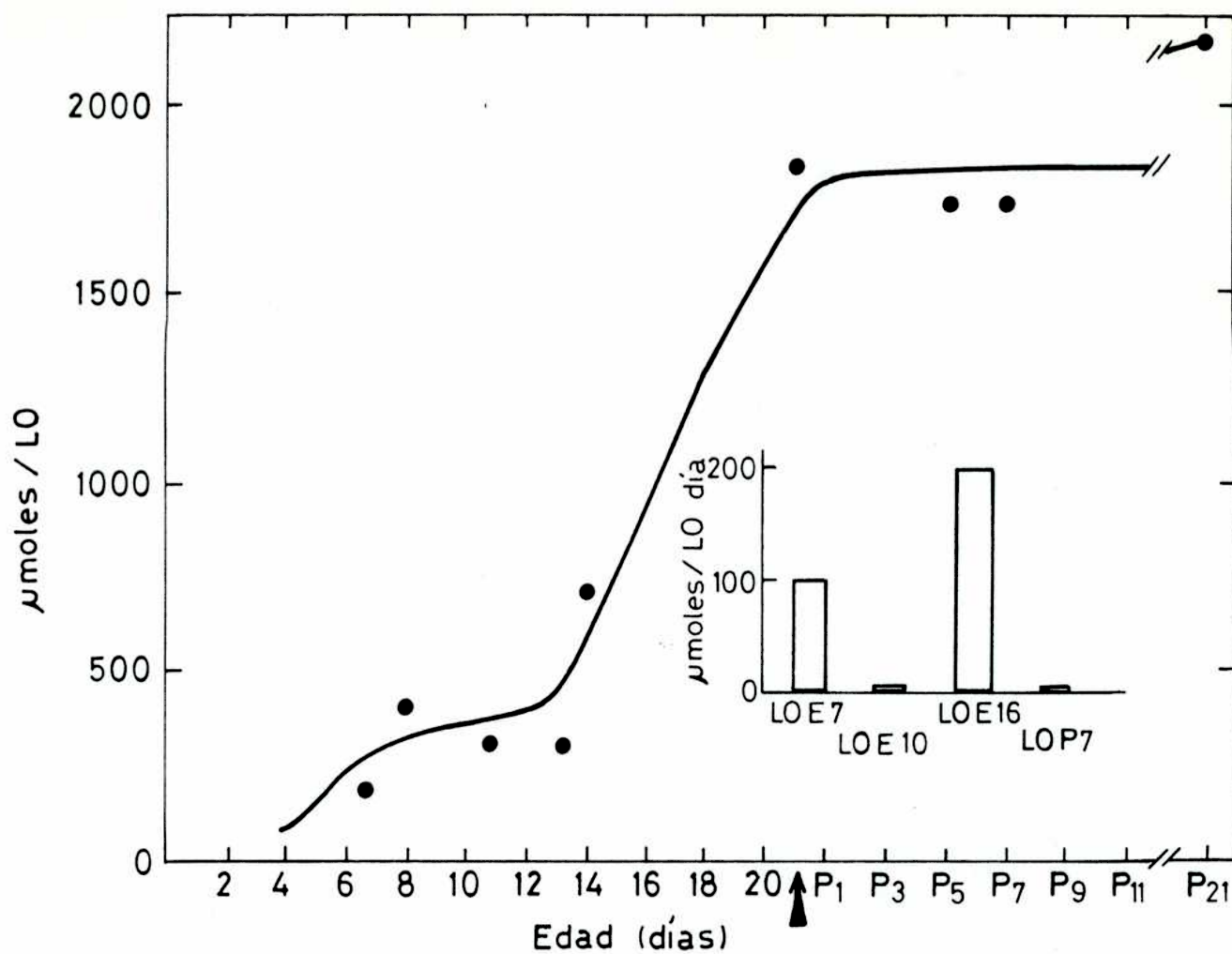


Figura 13. Cantidad de azúcares totales por lóbulo óptico en función de la edad durante el desarrollo.

Las determinaciones se realizaron aplicando la técnica colorimétrica del fenol-sulfúrico a cada lóbulo óptico.

En el inserto de la figura se mide la variación de la cantidad de azúcares totales por lóbulo óptico y por día en 4 edades representativas.

edad, la cantidad de azúcares nuevamente aumenta en forma lineal hasta el embrión de 20 días. Después de la eclosión la cantidad de azúcares por lóbulo óptico varía muy poco.

Como una medida de la variación de la cantidad de azúcares totales por día, se calculan las pendientes del gráfico anterior para algunas edades representativas. Los resultados pueden observarse en el inserto de la Fig. 13. En el lóbulo óptico de un embrión de 7 días se acumulan aproximadamente 100 μ moles de azúcares totales por día. En el embrión de 10 días prácticamente no hay variación. Por otro lado en el lóbulo óptico del embrión de 16 días se acumulan aproximadamente 200 μ moles de azúcares totales por día. En la región del plateau de la curva, luego del nacimiento, la variación de la acumulación de azúcares es casi nula, lo que se ejemplifica con el día P7 del inserto.

3.3. Cinética de la incorporación de leucina tritiada a proteínas durante el desarrollo del lóbulo óptico de pollo

Con el fin de conocer las características de la incorporación de leucina a proteínas se realizaron los siguientes experimentos: partículas de lóbulo óptico de embriones desde 8 días hasta la eclosión y pollitos de hasta 15 días ($150 \pm 15 \mu$ g de proteína por cavidad), se incubaron en distintos tiempos hasta 3 horas con Leu-4,5³H. La proteína se procesó para medir radioactividad como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados pueden observarse en la Fig. 14. Existe una incorporación lineal de leucina a proteína en cada una de las edades medidas, lo cual indica que por lo menos durante las 3 hs de incubación el tejido permanece metabólicamente activo. La velocidad de incorporación del aminoácido no se modifica durante la incubación y es característica para cada edad.

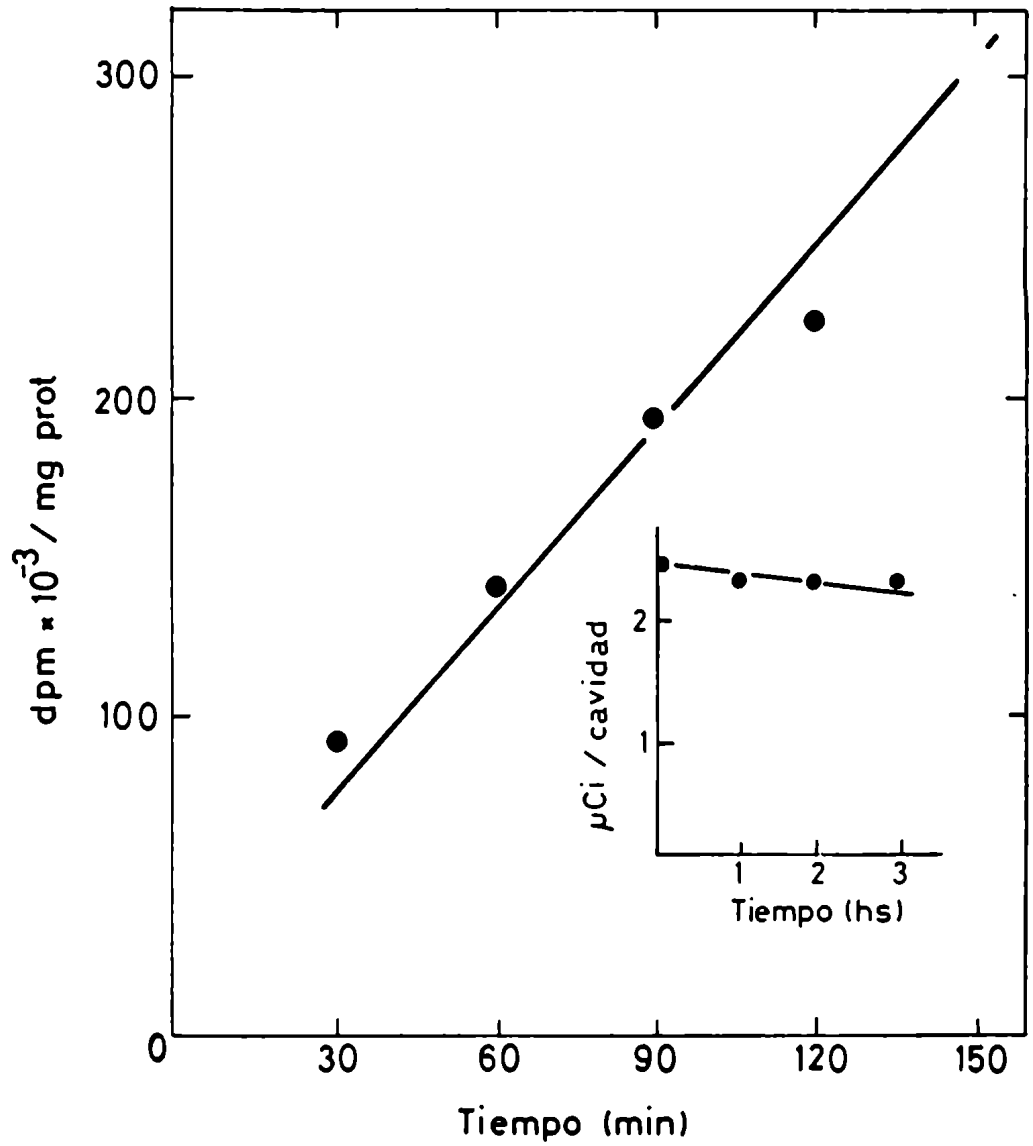


Figura 14. Incorporación de leucina- $4,5^3\text{H}$ a proteína en función del tiempo de incubación.

Se incubaron partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días.

Inserto de la figura: desaparición del precursor radioactivo del medio en función del tiempo de incubación.

Como un control de que la oferta de leucina tritiada durante la incubación es casi constante, se tomaron alícuotas del medio de incubación de cada cavidad a los distintos tiempos de incubación, y se graficó la radioactividad remanente en el medio en función del tiempo de incubación. Puede observarse en el inserto de la Fig. 14 que la desaparición de leucina tritiada del medio de incubación es baja luego de 3 horas de incubación.

En la Fig. 15 se grafican las velocidades relativas de incorporación de leucina tritiada a proteínas, características de cada edad, que se calculan de las curvas de la Fig. 14.

Como puede observarse en la Fig. 15 las mayores velocidades relativas de incorporación de leucina a proteínas se obtienen con los embriones de 8 días, disminuyendo con la edad un poco antes del nacimiento (E16) y una nueva onda de alta velocidad ocurre alrededor del momento de la eclosión, para luego disminuir gradualmente.

3.4. Incorporación de tritio a proteínas a partir de manosa- 2^3H en función de la cantidad de proteína incubada

Con el objeto de lograr condiciones lineales de incorporación de tritio a partir de manosa- 2^3H , se incubaron cantidades crecientes de partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 16 días, entre los 20-300 μg de proteína.

A las 2 horas de incubación, el particulado fue procesado para la medición de radioactividad en proteínas como se indicó en Materiales y Métodos.

El resultado se observa en la Fig. 16. Como la incorporación de tritio a proteína es lineal hasta 200 μg de proteína por cavidad se ha utilizado en todo este trabajo valores de proteína algo menores a 200 μg por cavidad.

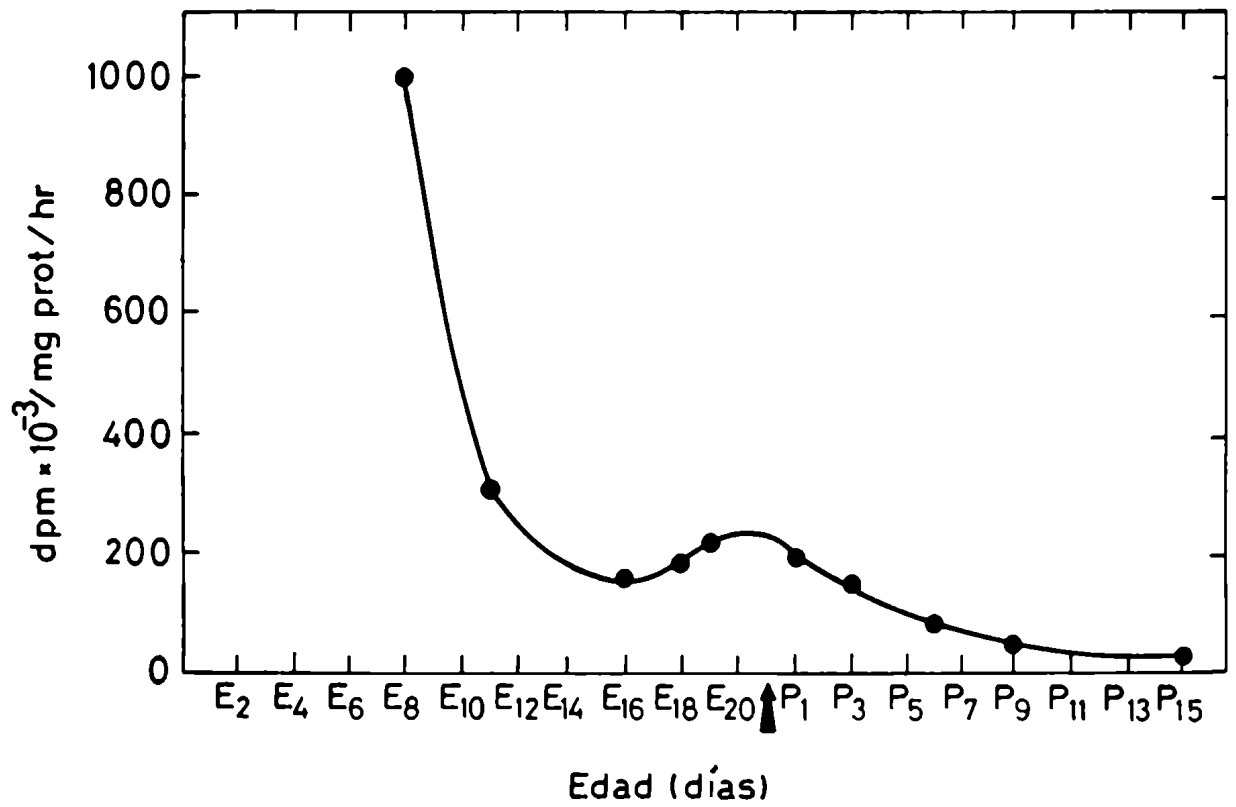


Figura 15. Velocidad relativa de incorporación de leucina-4,5³H a proteínas durante el desarrollo del lóbulo óptico de pollo.

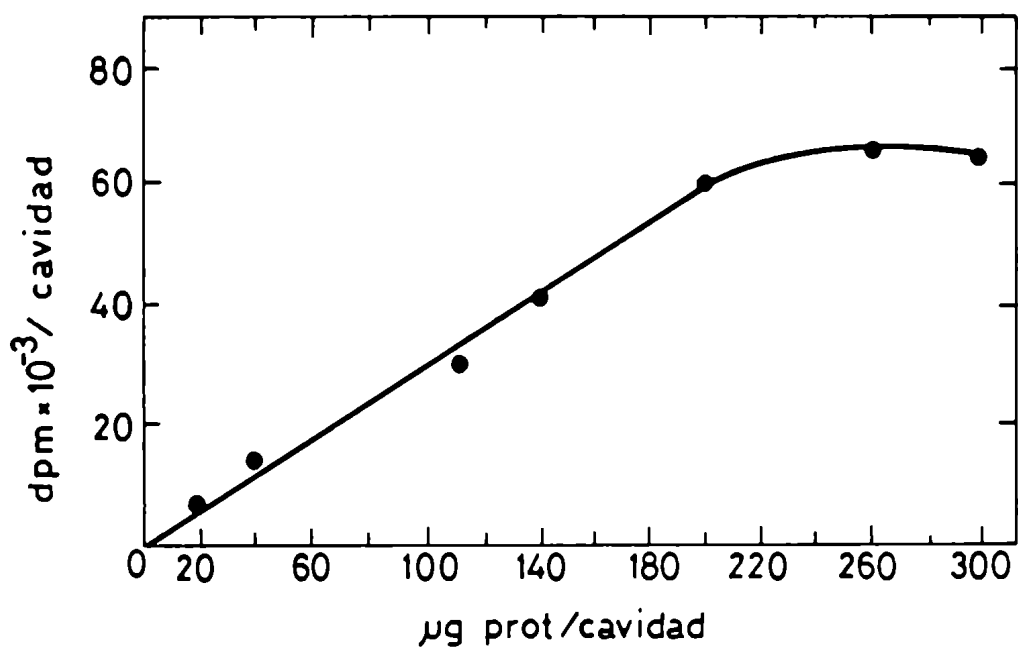


Figura 16. Radioactividad incorporada a proteína a partir de $\text{Man-2}^3\text{H}$ en función de la cantidad de proteína incubada por cavidad.

Se incubaron partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 16 días durante 2 horas en presencia de $10 \mu\text{Ci Man-2}^3\text{H/cavidad}$.

3.5. Incorporación de tritio a proteínas a partir de manosa-2³H en función de la oferta de glucosa en el medio de incubación

Con el objeto de medir incorporación de Man-2³H a proteína durante tiempos más prolongados (hasta 24 horas) se hicieron algunos estudios previos sobre la influencia de la cantidad de glucosa presente en el medio de incubación.

Para obtener condiciones lineales de incorporación de tritio a proteínas, se incubaron partículas de lóbulo óptico de embriones de pollo de 16 días con 25 µl de medio (glucosa 1 g/l) por cavidad.

A los tiempos indicados se obtuvo una alícuota del medio de incubación para la medición de glucosa remanente. El resto del procedimiento para la medición de la radioactividad en la proteína, se siguió como se indica en Materiales y Métodos.

Como se puede observar en la Fig. 17, la incorporación de tritio a proteínas es lineal hasta los 90 minutos de incubación; a partir de este tiempo prácticamente cesa la incorporación.

En la Tabla I se observan los valores de µg glucosa que quedan en el medio. De estos resultados se puede estimar el valor aproximado de glucosa en el medio necesario para la funcionalidad del tejido: valor umbral de 0.4 g/l. Aunque este valor es bastante aproximado, se lo tendrá en cuenta más adelante (ver 3-8).

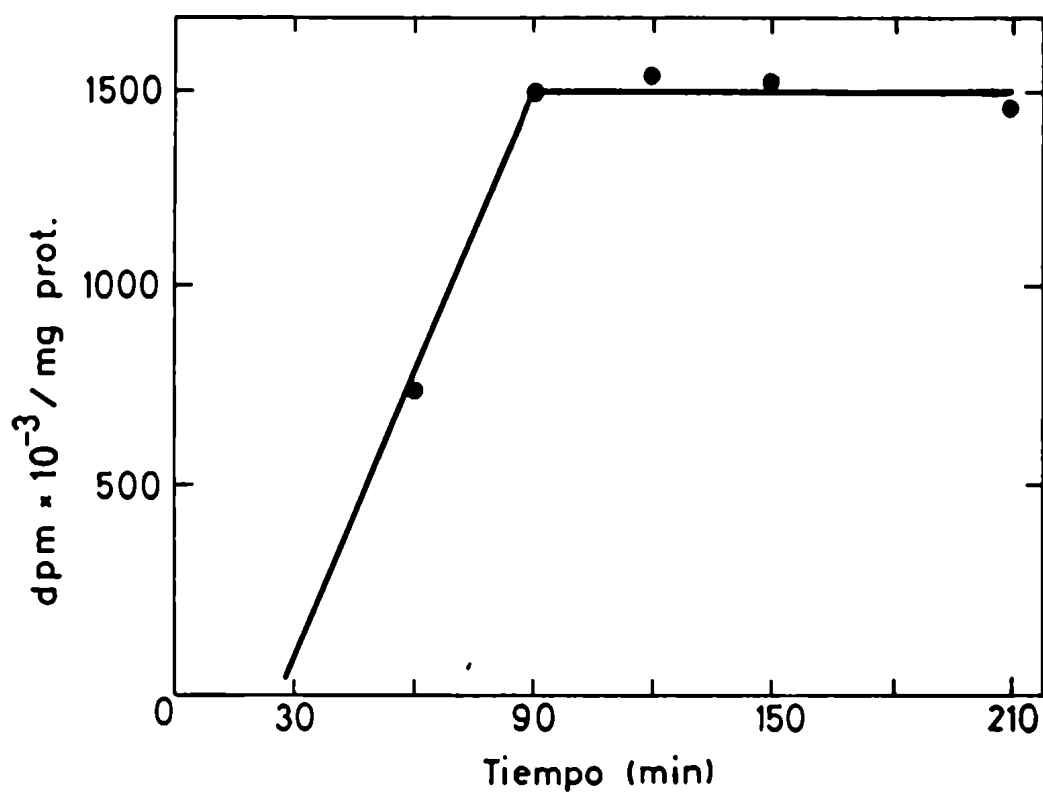


Figura 17. Radioactividad incorporada a proteína a partir de Man- 2^3H en función de la oferta de glucosa en el medio de incubación.

Se incubaron partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 16 días ($150 \pm 15 \mu\text{g}$ prot./cav.) en presencia de $10 \mu\text{Ci}$ Man- 2^3H /cav. y $25 \mu\text{l}$ de medio (glucosa 1 g/l)/cav.

Tiempo de incubación	Glucosa remanente en el medio	Concentración de glucosa en el medio
min	μg	g/l
0	25	1
60	16	0,64
90	16-4,5=11,5 (teórico)	0,46

Proteína sembrada por cavidad \approx 150 μg

Consumo de glucosa \approx 60 $\mu\text{g}/\text{mg prot}/\text{h}$

\approx 9 $\mu\text{g}/150 \mu\text{g prot}/\text{h}$

Tabla I. Glucosa remanente en el medio.

Las condiciones experimentales son las de la Fig. 17.

3.6. Concentración de azúcares en el medio durante la incubación

Con el objeto de comprobar que tanto la Man- 2^3H como la glucosa desaparecen del medio con la misma cinética cuando se incuban partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días en las condiciones explicadas en Materiales y Métodos, se diseñó el siguiente experimento: a cada tiempo fue medida la desaparición de glucosa y manosa del medio de incubación como se indica en Materiales y Métodos.

En la Fig. 18A se observa la incorporación lineal de tritio a proteínas. En la Fig. 18B y C se grafican los porcentajes de azúcares remanentes en el medio. Puede observarse que éstos son iguales cuando se utiliza altas concentraciones de glucosa en el medio. Se verificó que la desaparición de ambos azúcares es lineal durante la incubación, lo cual da idea de la preservación de la actividad biosintética del tejido.

Por lo tanto queda establecido que durante el tiempo de incubación de las partículas de lóbulo óptico de pollo se necesitan niveles altos de glucosa (concentraciones superiores al umbral: 0,4 g/l).

De la curva de la Fig. 18C, se puede calcular que las partículas de lóbulo óptico de embrión (18 días) consumen 46 ug de glucosa por mg de proteína, por hora ya que 100% de azúcar en el medio equivale a 1 g/l de glucosa.

Se asume que en el SNC la manosa es utilizada por el tejido como la glucosa (106), entonces, la desaparición de glucosa calculada de la manera siguiente debe coincidir con el valor medido experimentalmente.

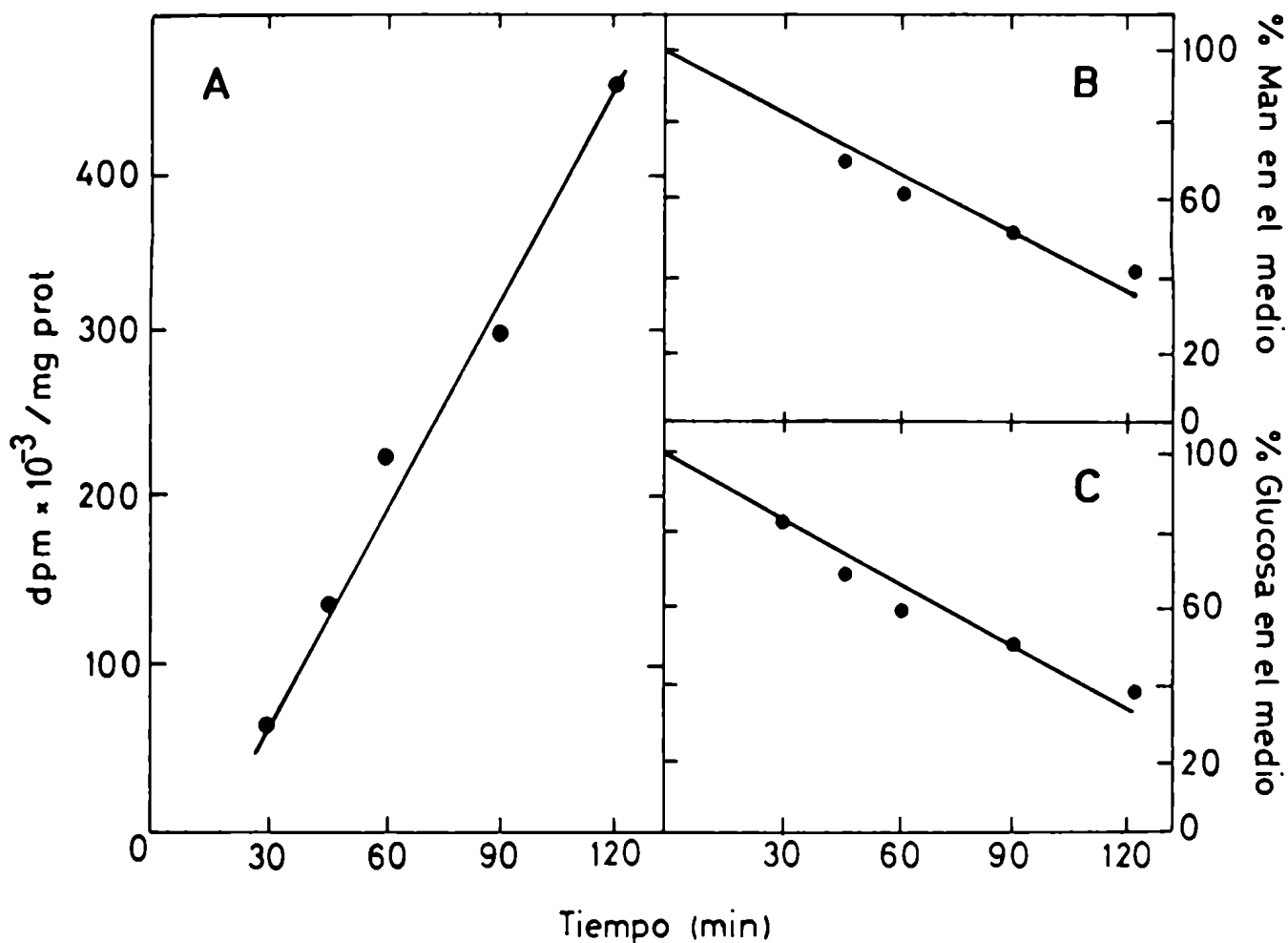


Figura 18. Incorporación de tritio a proteína a partir de Man- 2^3H en función del tiempo de incubación:

A. Partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días (350 ± 35 μg proteína/cav.) se incubaron en las condiciones estándares (Materiales y Métodos).

B. Desaparición de la radioactividad de Man- 2^3H del medio en función del tiempo de incubación.

C. Desaparición de glucosa del medio en función del tiempo de incubación.

Los datos obtenidos en A, B y C corresponden a los mismos experimentos.

$$\Delta \text{ glucosa} = \text{glucosa}_i \times \frac{\Delta \text{Man-2}^3\text{H}}{\text{Man-2}^3\text{H}_i}$$

Luego, la glucosa remanente al fin de la incubación será:

$$115 \mu\text{g glucosa} \times \frac{2 \mu\text{Ci Man-2}^3\text{H desaparecida}}{5 \mu\text{Ci Man-2}^3\text{H}}$$

En la Fig. 19 se muestran los resultados obtenidos, donde puede observarse que ambos valores aproximadamente son similares. De esta manera se comprueba que los dos azúcares desaparecen del medio indistintamente.

3.7. Incorporación de tritio a proteínas a partir de Man-2³H

3.7.a. Durante el desarrollo del lóbulo óptico de pollo

Partículas provenientes de lóbulos ópticos de varias edades (entre embriones de 6 días y pollitos de 21 días), se incubaron en las condiciones estándar antedichas, durante distintos tiempos hasta 3 horas. Para cada punto experimental se emplearon 2 cavidades, al fin de la incubación se midió la radioactividad específica de la proteína como se indica en Materiales y Métodos.

En la Fig. 20 se pueden observar las curvas obtenidas para las diferentes edades, cuyas pendientes representan la velocidad relativa de glicosilación para cada edad y se grafican en la Fig. 21. Se encontró un máximo en las edades más tempranas que se pudieron medir (embriones de 6 días), luego de un pronunciado descenso hacia el embrión de 10 días, se tiene el segundo valor máximo en los lóbulos ópticos de embriones de 18 días. La velocidad de incorporación de tritio a proteína disminuye marcadamente hacia la eclosión y hasta los pollitos de 21 días. No se han efectuado estas mediciones en animales adultos.

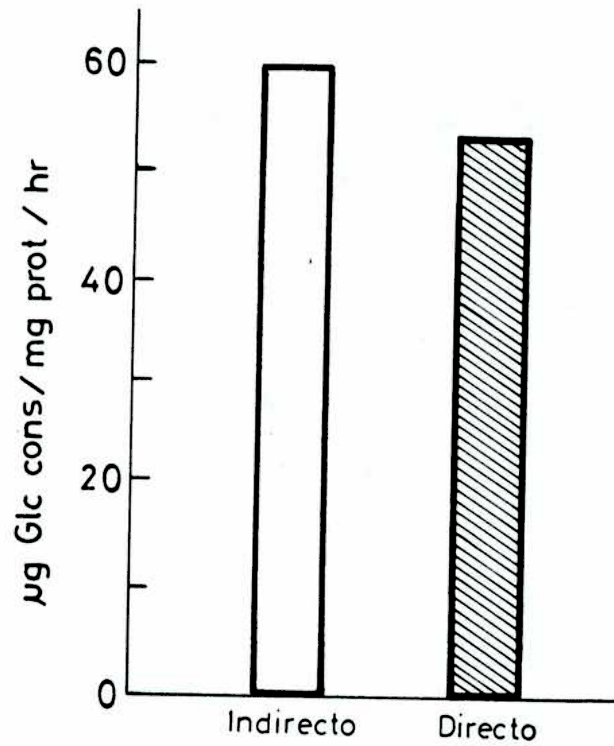


Figura 19. Consumo de glucosa por mg de proteína y por hora.

Las condiciones experimentales son explicadas en la Fig. 18. Con los datos del experimento control, sin suero, se grafica en barra rayada: consumo de glucosa medido directamente como desaparición de glucosa del medio. Este valor se compara con el calculado en base a la desaparición de Man- 2^3H del medio de incubación: barra blanca.

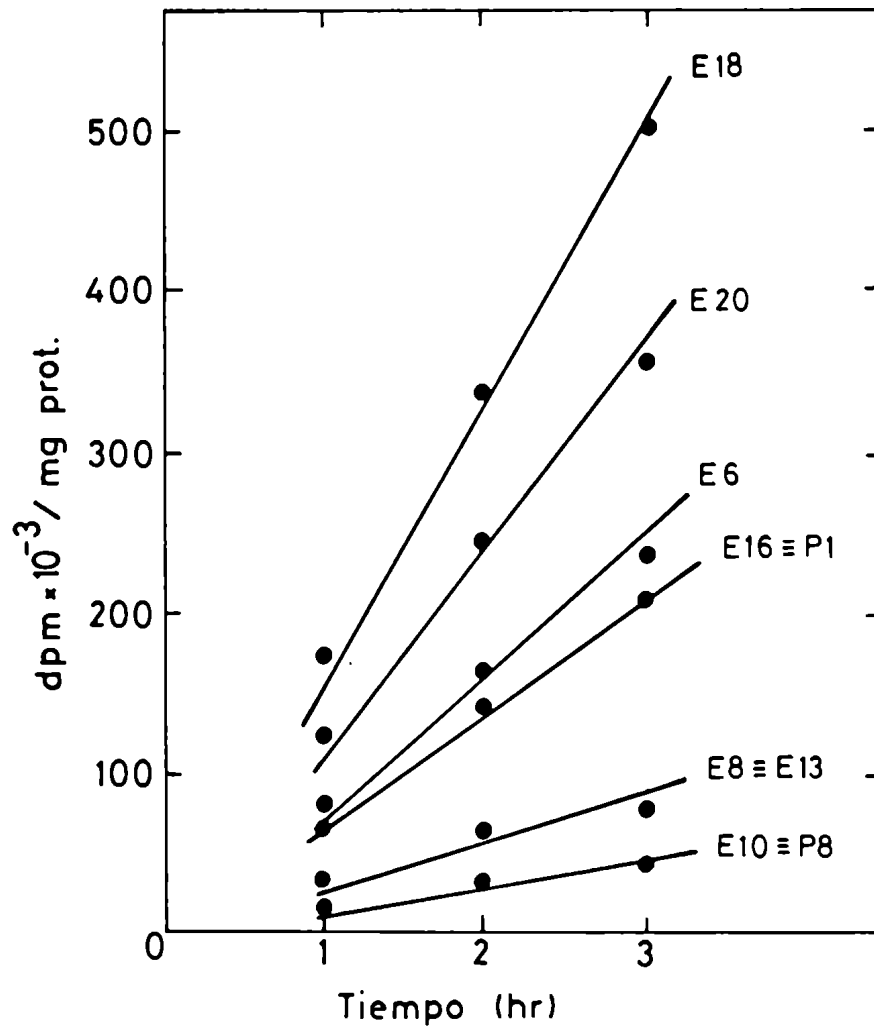


Figura 20. Cinética de incorporación de Man- 2^3H a proteínas en función del tiempo de incubación.

Se utilizaron partículas de lóbulos ópticos de pollo de distintas edades. Las incubaciones se realizaron como se explica en Materiales y Métodos.

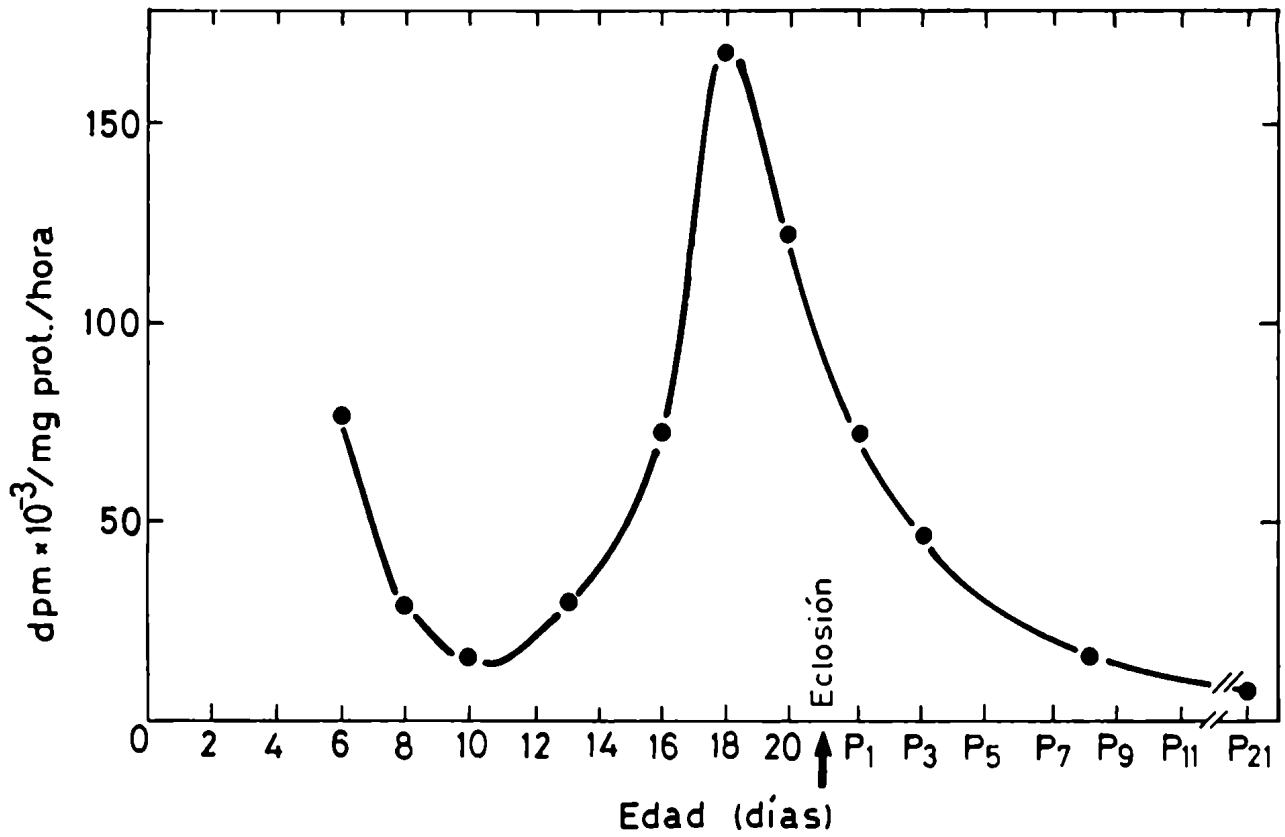


Figura 21. Velocidades relativas de incorporación de tritio a proteína a partir de Man-2³H en partículas de lóbulos ópticos de pollos de distintas edades.

Los valores se obtienen de las curvas de la Fig. 20.

3.7.b. Caracterización de los productos formados a partir de Man-2³H

Con la finalidad de caracterizar los productos formados a partir de Man-2³H en condiciones de incorporación lineal, se siguieron los siguientes procedimientos:

- a. Tratamiento con proteasa.
- b. Tratamiento alcalino.
- c. Cromatografía en papel de los carbohidratos radioactivos liberados luego de hidrólisis ácida de los lípidos intermediarios.

Se incubaron partículas de lóbulos ópticos de embrión de pollo de 18 días en las condiciones del ensayo estándar durante 3:30 horas, un total de 40 cavidades (20 se usaron para el tratamiento alcalino y las otras 20 para la proteólisis).

Para la cromatografía en papel de los carbohidratos radioactivos se aumentó la radioactividad de la manosa (150 μ Ci) en la incubación en una sola cavidad durante 3 horas.

El procesamiento del material para cada uno de los tratamientos se realizó como se indica en Materiales y Métodos.

Se encontró lo siguiente:

- a. Tratamiento con proteasa: se solubilizó un 97,5% de la marca luego de esta proteólisis, con una recuperación del 78%.
- b. Tratamiento alcalino suave (0,05 M NaOH, 24 horas a 25°C): fueron susceptibles un 5% de los productos marcados (O-glicosídicos), con una recuperación del 97%.
- c. Hidrólisis ácida fuerte y cromatografía en papel (HCl 2,5 M, 4 horas a 60°C): solamente se detectó manosa.

Estos resultados están en la Tabla II y en la Fig. 22.

Tratamiento	% sensibles	% resistentes	recuperación %
Proteolítico	97,5 (a)	2,5	78
Alcalino suave	5,2	94,8 (b)	97

(a) Man-2³H en proteínas.

(b) Glicoproteínas tipo N-glicosídicas.

Tabla II. Caracterización del producto insoluble en TCA caliente formado a partir de Man-2³H luego de 3:30 horas de incubación en condiciones de linealidad.

Detalles de los procedimientos se indican en Materiales y Métodos.

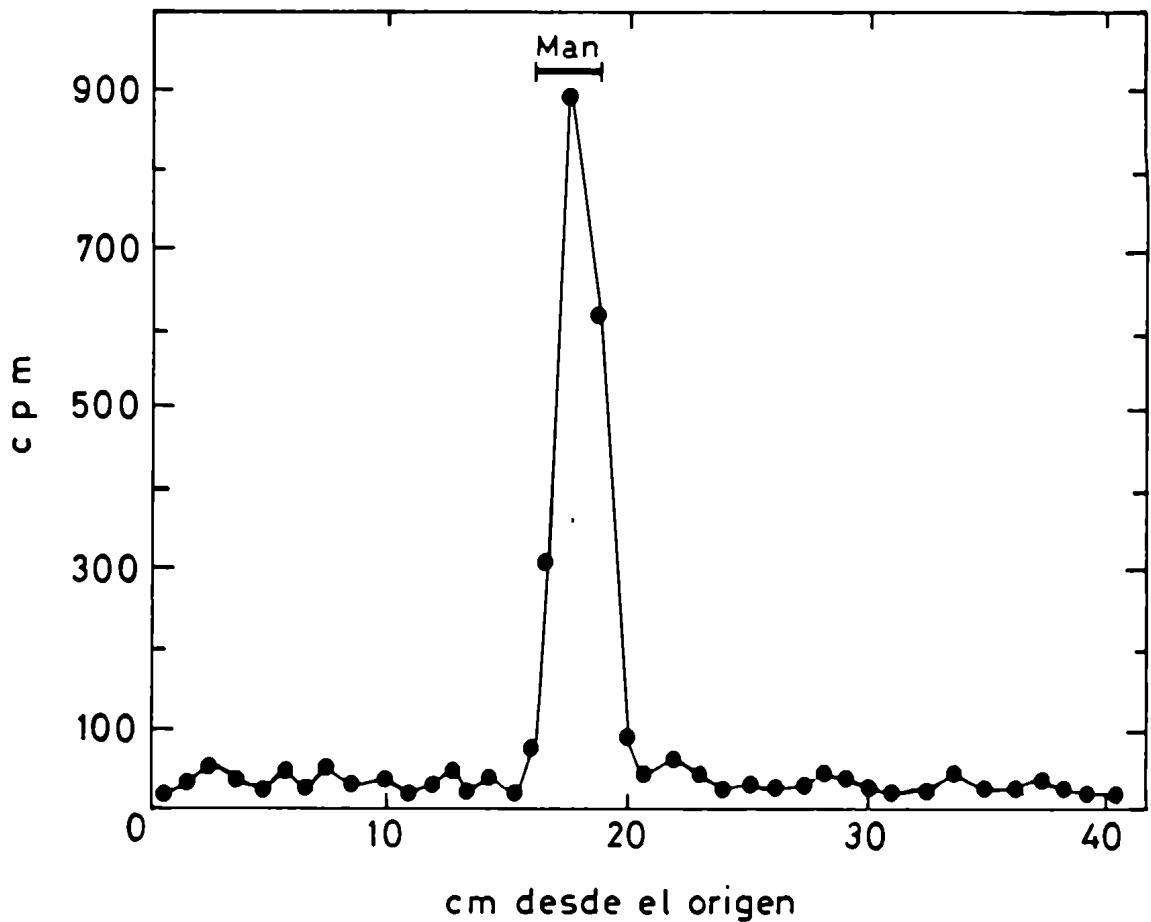


Figura 22. Radiocromatograma del hidrolizado ácido de la fracción insoluble en TCA caliente, que se obtiene de partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días ($150 \pm 15 \mu\text{g}$ prot.) incubadas en una cavidad en presencia de $150 \mu\text{Ci}$ de $\text{Man-}^3\text{H}$ y $50 \mu\text{l}$ de medio durante 3 horas.

La cromatografía se realizó durante 30 horas en n -butanol:piridina:agua, 6:4:3. Las barras indican la posición de los estándares externos.

3.8. Extensión temporal del micrométodo de incubación de partículas de tejido nervioso

Las condiciones experimentales del micrométodo de incubación de partículas de tejido nervioso para medir incorporación de Man- 2^3H a proteína desarrollado en nuestro laboratorio, permite, si la fuente de carbono no es limitante, un estado estacionario de marcación con niveles adecuados de oferta del precursor radioactivo, muy alta reproducibilidad de los resultados y se preserva la actividad metabólica del tejido.

Con el objeto de obtener una metodología donde los tiempos de incubación sean más largos (hasta 24 horas) y se cumplan estas condiciones, se estudió la modificación de algunos parámetros de este micrométodo. Uno de los inconvenientes que pueden surgir de extender el tiempo de incubación de las partículas, es el de la muerte celular en el centro del explanto. Sin embargo, no existen problemas de difusión de los nutrientes en partículas de SNC (109) si se controla rigurosamente el tamaño de las mismas (con una distancia al centro como máximo de $50\ \mu\text{m}$). Adicionalmente, la gran semejanza en tamaño de las partículas obtenidas, contribuyen a obtener datos representativos del tejido y reproducibilidad de los resultados en las incubaciones.

En este laboratorio se había encontrado que para la obtención de cinéticas de incorporación lineales de Man- 2^3H a proteínas con partículas de corteza cerebral es necesario mantener niveles de glucosa por encima del umbral de los $0,5\ \text{g/l}$ (107).

De acuerdo a lo calculado (sección 3.6.) el consumo de glucosa de las partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días no supera los $50\ \mu\text{g}$ por mg de proteína y por hora, si se incuban hasta $200\ \mu\text{g}$ de proteína por cavidad. Tomando para mayor seguridad el valor $60\ \mu\text{g}$, se puede calcular

el consumo de glucosa en 24 horas de incubación, que sería aproximadamente, 1,4 mg de glucosa por miligramo de proteína como máximo.

Como en estos experimentos se incuban 200 μg de proteína, consumirán aproximadamente 280 μg de glucosa durante 24 horas. El medio de cultivo utilizado contiene una concentración de glucosa de 1 g/l. Para asegurar una alta oferta de glucosa durante las 24 horas de incubación (por encima del umbral de 0,4 g/l), se utilizó la relación proteína incubada a volumen de medio igual a 200 μg de proteína por ml de medio. Se espera que la desaparición de glucosa del medio nunca supere el 30%.

Los resultados están graficados en la Fig. 23. En la Fig. 23A se muestra que la incorporación de tritio a proteína procede linealmente durante las 24 horas de incubación.

Asimismo en la Fig. 23B y C se observa que la oferta de glucosa y Man- 2^3H durante las 24 horas decrece muy poco. Por otro lado, se comprueba que los porcentajes de consumo de glucosa y manosa son iguales en estas condiciones de incubación, asegurando que la relación glucosa a manosa radioactiva se mantiene constante durante toda la incubación.

En los experimentos recién mostrados se comprueba que la incorporación de Man- 2^3H a proteína es lineal siempre que la oferta de glucosa sea adecuada. Esto se cumple en incubaciones de hasta 24 horas.

Como un control se estudió el efecto de una oferta insuficiente de glucosa presente en el medio de incubación (200 μg por cavidad) sobre la incorporación de tritio a proteína a partir de Man- 2^3H . Se incubaron partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días, 150 ± 15 μg proteína en 200 μl de medio por cavidad a distintos tiempos hasta 24 horas. Se utilizó 10 μCi del precursor radioactivo por cavidad, las otras condiciones experimentales están descritas en Materiales y Métodos (sección 2.2.a.). A los tiempos correspon-

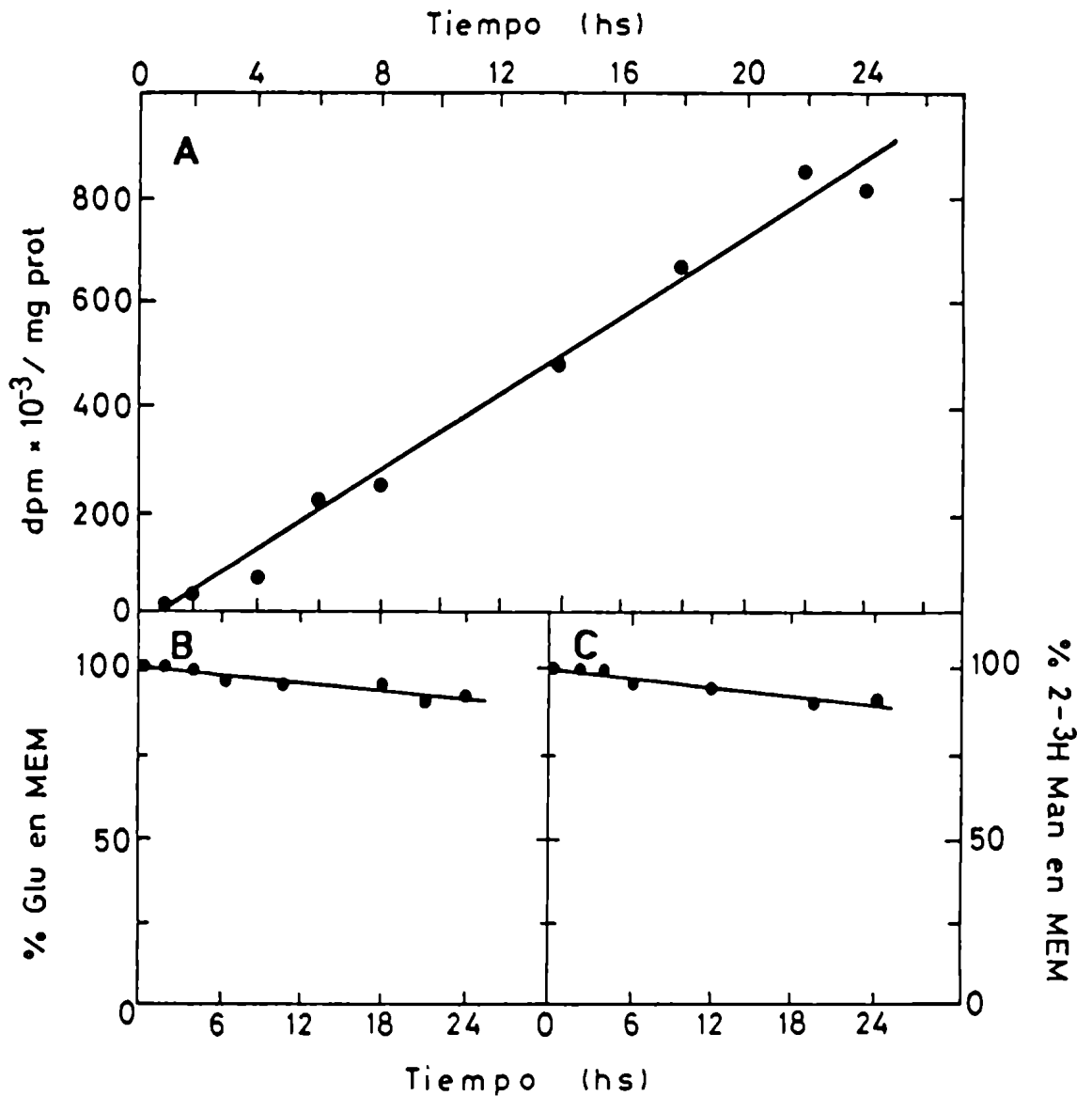


Figura 23 A. Incorporación de radioactividad a proteína a partir de Man- 2^3H en condiciones de estado estacionario de marcación en función del tiempo de incubación de hasta 24 horas. Se utilizaron partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días ($150 \pm 15 \mu\text{g}$ prot./cav.) en presencia de 10 uCi Man- 2^3H /cav. y 1 ml medio (glucosa 1 g/l)/cav.

B. Desaparición de glucosa del medio en función del tiempo de incubación.

C. Desaparición de Man- 2^3H del medio en función del tiempo de incubación.

dientes se tomaron alícuotas para medir glucosa en el medio, las incubaciones se detuvieron y el material se procesó como se indica en Materiales y Métodos. Se empleó una cavidad por punto experimental.

Los resultados pueden observarse en la Fig. 24. La incorporación de tritio a proteína a partir de Man- 2^3H es lineal hasta las 21 horas de incubación mientras que la oferta de glucosa supera el valor umbral. A partir de las 21 horas de incubación existe una aparente detención en la incorporación. Este resultado se corresponde con el marcado decaimiento de la oferta de glucosa en el medio de incubación, que es de 200 μg en el momento inicial.

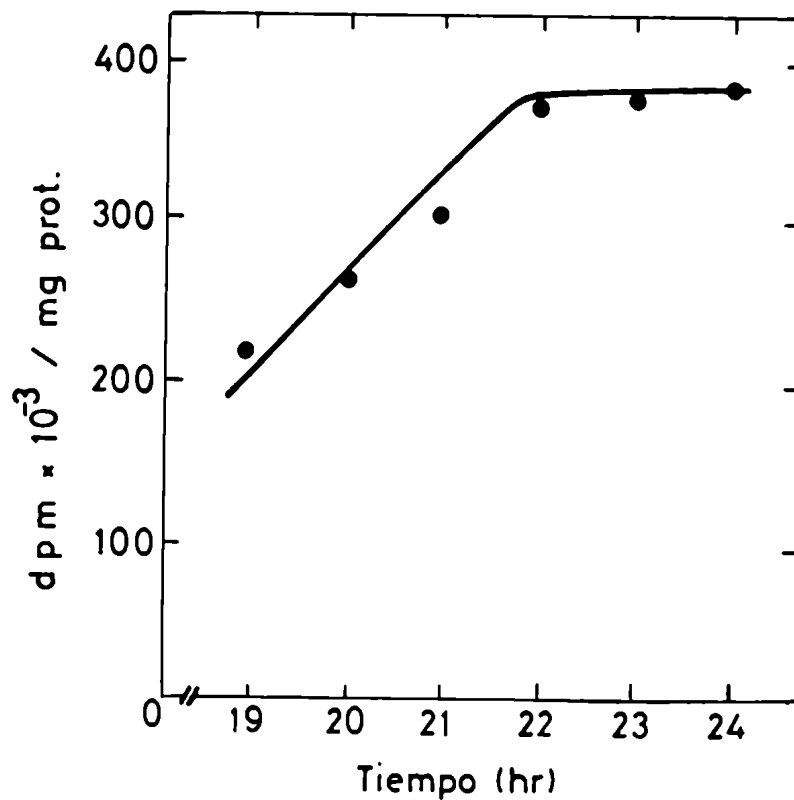


Figura 24. Incorporación de radioactividad a proteína a partir de Man-²³H en función del tiempo de incubación de hasta 24 horas, en condiciones de limitación de glucosa en el medio.

Se incubaron partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días en las condiciones estándares pero en un volumen de 200, μ l medio (glucosa 1 g/l)/cav.

Efecto del suero

3.9. Sobre la cinética de incorporación de Man-2³H a proteína en lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días durante incubaciones cortas (3 horas)

Un novel efecto del suero se encontró en experimentos preliminares de esta Tesis sobre la cinética de incorporación de manosa radioactiva a proteína. Se observó una reproducible y marcada disminución de esta incorporación en presencia de 10-20% de suero fetal bovino.

Con el fin de estudiar con más detalle este fenómeno se diseñó el siguiente experimento: partículas de lóbulo óptico de embriones de pollo de 18 días se incubaron bajo las condiciones estándar durante 3 horas. En el medio de incubación se agregó 10% (v/v) de suero. A los tiempos correspondientes se frenaron las incubaciones y el material se procesó como se explica en Materiales y Métodos.

Los resultados se muestran en la Fig. 25. Se observa que con un 10% de suero presente en el medio, existe una disminución del 40% en la incorporación de tritio a proteína durante las 3 horas de incubación con respecto al control, sin suero.

3.10. Efecto de distintas concentraciones de suero sobre la incorporación de Man-2³H a proteínas en lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días

Con el objeto de establecer el efecto de distintas concentraciones de suero sobre la incorporación de tritio a proteínas, se diseñaron los siguientes experimentos: se incubaron partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo de 18 días bajo las condiciones estándar de incubación.

Al medio de incubación se le agregaron distintas cantidades de suero fetal bovino: 1, 2,5, 5, 10 y 20% (v/v). Las incubaciones se frenaron después de 2 horas y el material se procesó siguiendo las indicaciones de Materiales

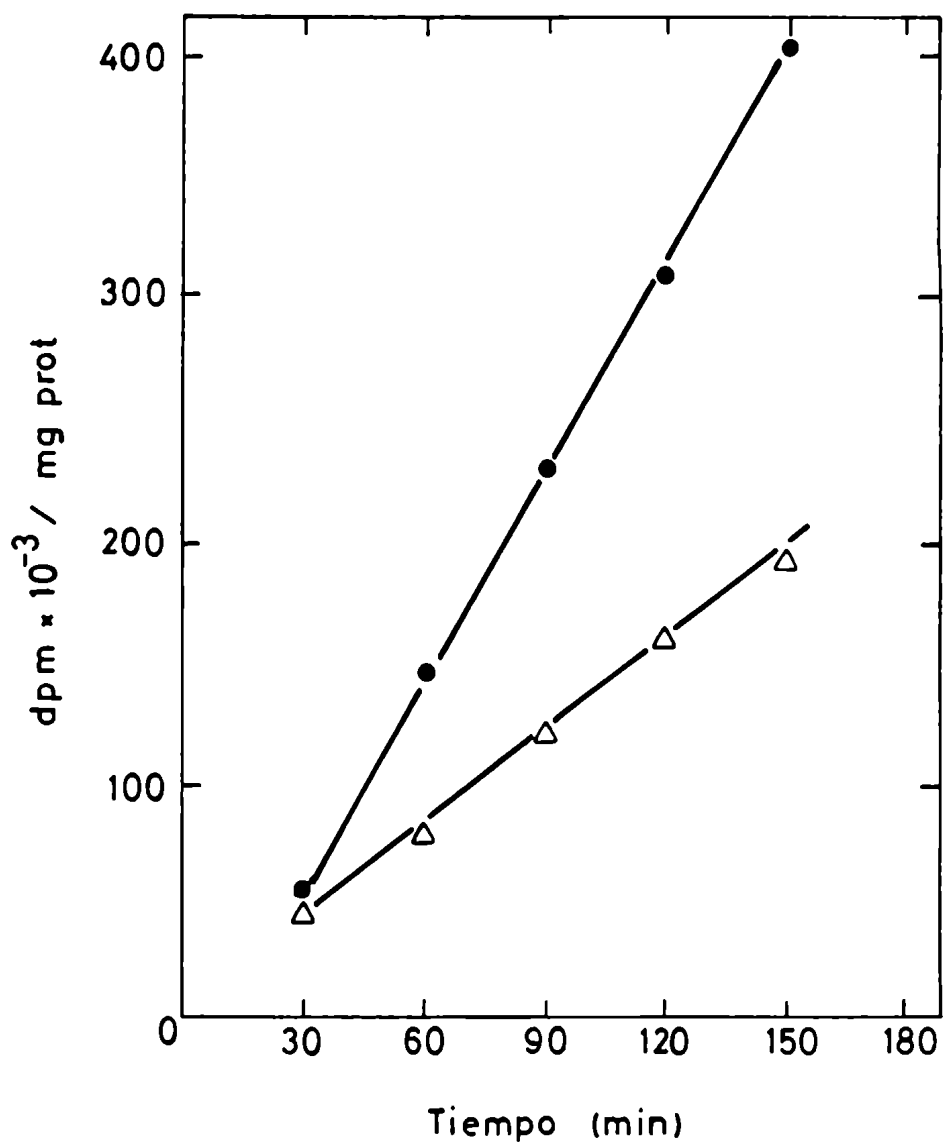


Figura 25. Efecto del suero sobre la incorporación de radioactividad a proteína a partir de Man- 2^3H en función del tiempo de incubación. Partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días (150 ± 15 μg prot./cav.) se incubaron con 10 μCi Man- 2^3H /cav. y 50 μl de medio (●) y con el agregado de 10% (v/v) de suero fetal bovino por cavidad (▲). Cada valor representa el valor medio \pm desviación estándar de 5 experimentos.

y Métodos.

Los resultados se muestran en la Fig. 26. Se observa el efecto inhibitor en función de las cantidades de suero utilizadas. Con 20% de suero (v/v) en el medio, la inhibición en la incorporación de Man- 2^3H a proteína supera el 60% con respecto a los controles medidos con igual cantidad de agua o de medio de incubación.

3.11. Efecto de distintas concentraciones de suero fetal bovino sobre la incorporación de tritio a proteína a partir de Man- 2^3H en el lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días, durante 18 horas de incubación

Con el objeto de establecer si el efecto del suero fetal bovino se mantiene en incubaciones de tiempos más largos de las partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo, se realizó el siguiente experimento: se utilizaron las modificaciones de las condiciones de microincubación para tiempos largos: 24 horas (partículas del tejido, $150 \pm 15 \mu\text{g}$ proteína, $5 \mu\text{Ci}$ Man- 2^3H en 1 ml de medio por cavidad). Las incubaciones se realizaron durante 18 horas, utilizando distintas cantidades de suero. El material se procesó como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados pueden observarse en la Fig. 27. Cuando se agregó suero en el medio se encontró una disminución en la incorporación de tritio a proteína con respecto al control (sin suero). La disminución es mayor cuando se aumenta la cantidad de suero agregado al medio de incubación. Puede observarse que en presencia de suero la cinética de incorporación de radioactividad a proteína es lineal lo que indicaría que durante las 18 hs de incubación el factor del suero ejerce sin alterarse su efecto inhibitorio.

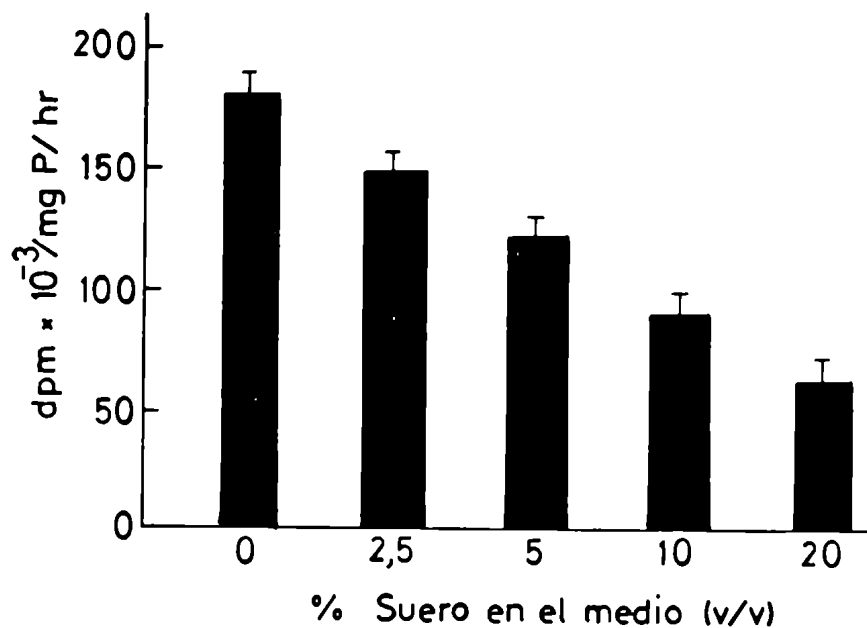


Figura 26. Efecto de distintas concentraciones de suero sobre la incorporación de Man- 2^3H a proteína durante 2 horas de incubación. Se incubaron partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días de acuerdo con Materiales y Métodos (sección 2.3.). Al medio de incubación se le agregaron distintas cantidades (en volumen) de suero fetal bovino: 1, 2,5, 5, 10 y 20%. Cada barra representa valor medio \pm desviación estándar de 3 experimentos, cada uno por duplicado.

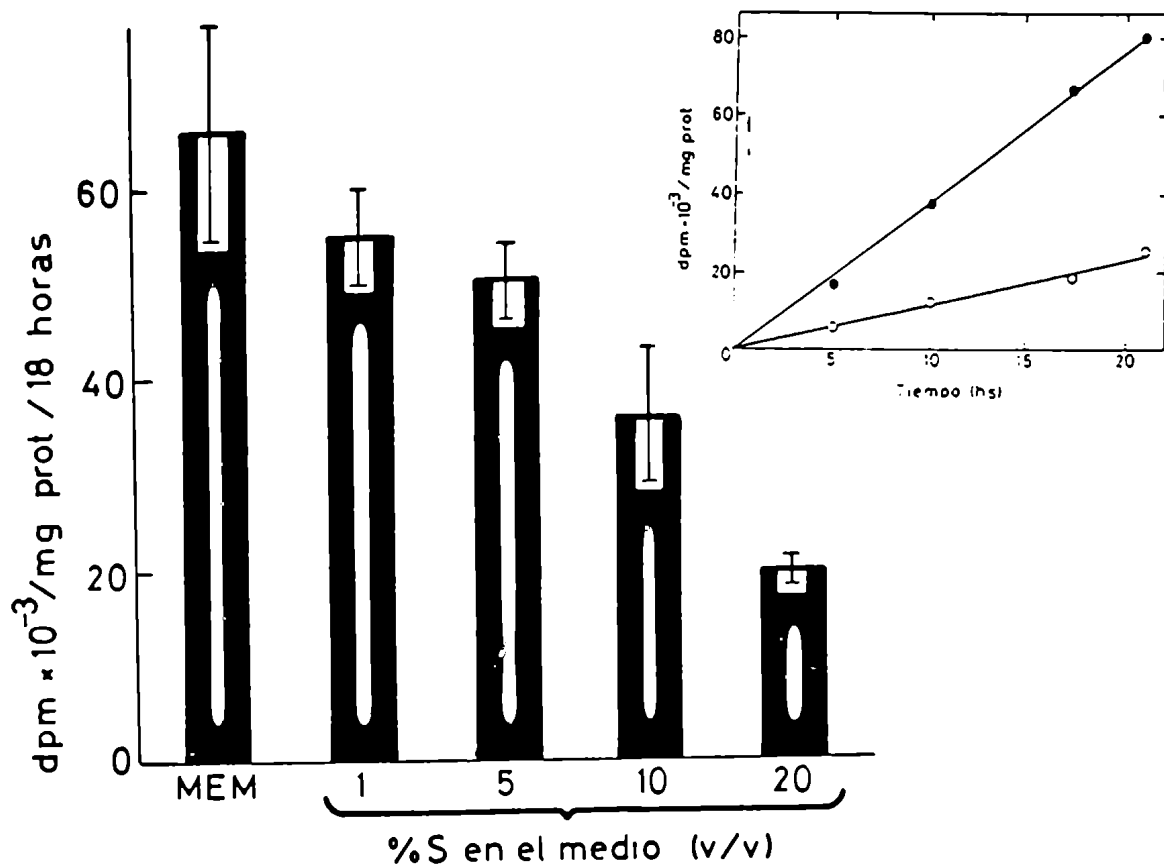


Figura 27. Efecto del suero (distintas concentraciones) sobre la incorporación de Man-2³H a proteína durante 18 hs de incubación.

Se utilizaron partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días (150 ± 15 µg prot.) con 5 µCi Man-2³H en 1 ml de medio por cavidad, con distintas cantidades de suero fetal bovino. Cada barra representa el valor medio ± DS de 3 experimentos.

Inserto: Cinética de incorporación de Man³-2H a proteína. (●): sin suero. (○): +20% suero.

3.12. Efecto del suero sobre la desaparición de glucosa o manosa del medio después de 18 horas de incubación

Con el objeto de evaluar si el agregado de distintas cantidades (v/v) de suero en los medios de incubación altera la utilización de glucosa por el tejido, se midió la desaparición del azúcar del medio luego de 18 horas de incubación. En las incubaciones que se realizaron en el ensayo del efecto de suero a 18 horas (sección 3.11.), se tomaron alícuotas del medio de cultivo, previo al frenado de las incubaciones con PBS. En dichas alícuotas se midió glucosa remanente. Se utilizó el método de glucosa oxidasa para el dosaje de glucosa en el medio y para el de la manosa radioactiva, se la midió directamente como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados en función del suero presente se observan en la Tabla III, donde se comprueba que la glucosa en el medio no varía significativamente con respecto al valor control, sin suero. También se puede apreciar que hay una leve disminución del consumo de manosa por el lóbulo óptico. Estudiando este problema, más tarde se pudo comprobar que hay una liberación de glicoproteínas al medio estimulada por el suero. Por lo tanto, como se esperaba, ya que el tejido nervioso utiliza indistintamente glucosa o manosa, esta disminución en el consumo de manosa es aparente, ya que cuando se mide radioactividad en el medio, se está midiendo manosa remanente más glicoproteínas liberadas. Ver Tabla VIII.

3.13. Incubaciones de partículas de lóbulo óptico de animales de distintas edades en presencia de suero

3.13.a. Efecto de distintas concentraciones de suero sobre la incorporación de Man-²³H a proteínas en lóbulo óptico de embrión de pollo de 10 días

Con la finalidad de conocer el efecto de distintas dosis de suero

t _i =18 h	a. Porcentaje de azúcar consumido		b. Consumo de azúcar	
	Glucosa	Manosa	Glucosa	Manosa
	%	%	μg/mg prot/h	μCi/mg prot/h
0	19,4	18,2	57,0	0,27
1	19,2	13,6	56,7	0,20
5	20,0	16,0	59,2	0,23
10	18,4	15,9	54,3	0,23
20	18,7	15,7	54,4	0,23

Tabla III. Porcentaje de azúcar consumido del medio luego de 18 hs de incubación, en función de la cantidad de suero presente.

b. Consumo de azúcares del medio de incubación en función de la cantidad de suero presente.

En el control (sin suero) desaparecen 1026 μg de glucosa por mg de proteína durante las 18 horas de incubación.

sobre la incorporación de tritio a proteínas en incubaciones de lóbulo óptico de embrión de pollo de 10 días se realizaron los siguientes experimentos. Partículas de lóbulo óptico de embriones de dicha edad se incubaron bajo condiciones estándar en presencia de distintas concentraciones de suero (0, 2,5, 5, 10 y 20%, v/v) durante 2 horas. Una vez frenadas las incubaciones se siguen las indicaciones de Materiales y Métodos para el procesamiento y medición de la proteína radioactiva.

Los resultados se observan en la Fig. 28. A diferencia de los lóbulos ópticos de los embriones de 18 días, en esta edad (10 días) no hay ningún efecto debido a la presencia del suero en el medio de incubación. Esto se observó en el rango de 2,5 a 20%.

3.13.b. Efecto de distintas concentraciones de suero sobre la incorporación de tritio a proteínas en lóbulo óptico de pollitos de 8 días

Hasta ahora se empleó tejido embrionario, para conocer la respuesta del tejido del animal después del nacimiento y con el objeto de conocer el efecto de distintas concentraciones de suero sobre la incorporación de tritio a proteínas a partir de $\text{Man-2}^3\text{H}$, se diseñaron los siguientes experimentos con pollitos de 8 días.

Partículas de lóbulo óptico de pollitos se incuban bajo condiciones estándar. El medio de incubación se adiciona con distintas cantidades de suero (2,5, 5, 10 y 20%, v/v). Se frenan las incubaciones a las 2 horas con PBS y se procesa el material como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados se observan en la Fig. 29. Vemos que el suero produce un efecto inhibitorio sobre la velocidad de incorporación de tritio a proteínas desde concentraciones de 2,5%. El efecto es más acentuado con concentraciones de suero en el medio más altas. Esta inhibición es parecida a la

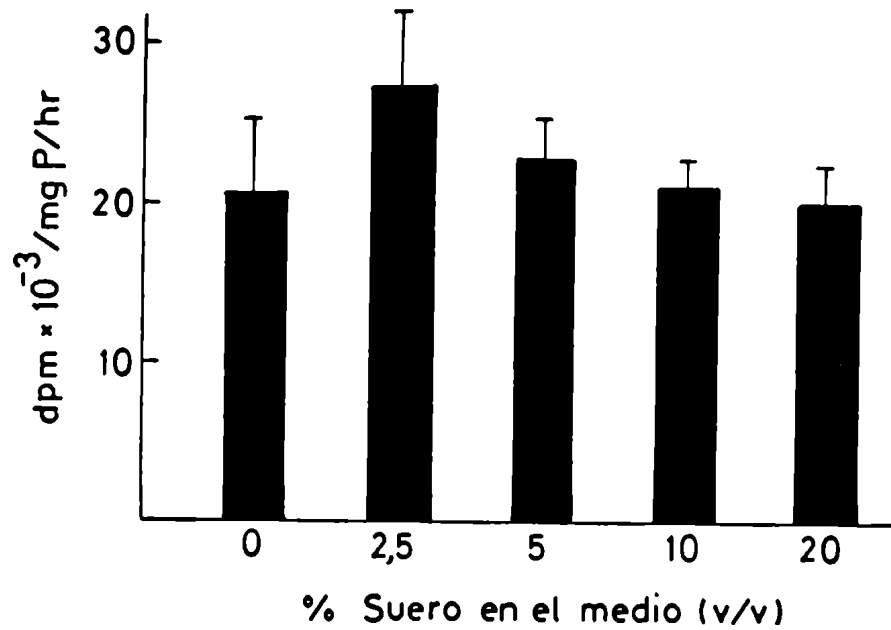


Figura 28. Incorporación de Man- ^{23}H a proteína en lóbulo óptico de embrión de pollo de 10 días en presencia de distintas concentraciones de suero.

El tiempo de incubación es de dos horas.

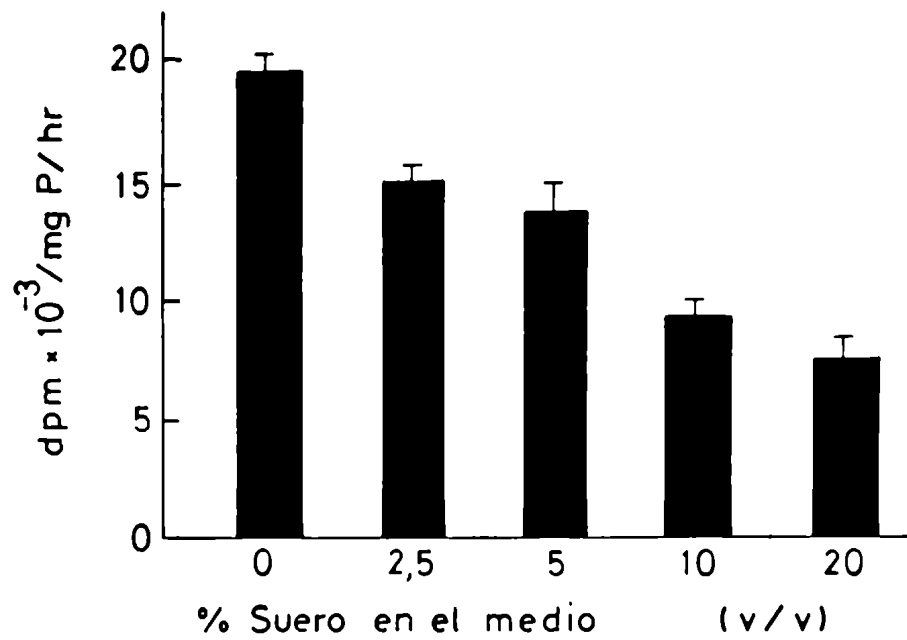


Figura 29. Incorporación de Man-2³H a proteína en función de distintas concentraciones de suero.

Se concentraron partículas de lóbulo óptico de pollo de 8 días durante 2 horas.

encontrada con los embriones de 18 días.

3.13.c. Efecto del suero fetal bovino sobre la incorporación de tritio a proteínas durante el desarrollo de lóbulos ópticos de pollo

Se había encontrado que el suero producía distintos efectos en lóbulos ópticos de embriones de 10 días, que en los de 18 días y en los pollitos de 8 días. Con el objeto de conocer el efecto del suero durante las edades que van desde los embriones de 6 días a los pollitos de 10 días, se diseñaron los siguientes experimentos. Para poder poner de manifiesto las diferencias de incorporación de tritio a proteína, en estos estudios se utilizó la dosis de 20% (v/v) que fue la que produjo mayor efecto inhibitorio (Fig. 26).

Partículas de lóbulos ópticos de dichas edades se incubaron bajo condiciones estándar durante 2 horas. Se midió la incorporación de radioactividad a proteínas y la cantidad de proteína incubada siguiendo las indicaciones expuestas en Materiales y Métodos.

Los resultados se grafican en la Fig. 30. Puede observarse que en los distintos estadios del desarrollo la incorporación de $\text{Man-2}^3\text{H}$ a proteína alcanza distintos valores en ausencia de suero, mientras que en presencia de 20% de suero hay inhibición después de la etapa de proliferación celular (aproximadamente día 9-11 embrionario). En el mismo gráfico se distingue una zona (rayada) entre ambas curvas que indica directamente la disminución de incorporación producida por el suero. Para visualizar mejor este fenómeno en la Fig. 31, se grafica el porcentaje de inhibición en función de la edad. Se pone de manifiesto que en los embriones de 6 a 10 días se observa una activación en la incorporación de tritio a proteínas. En las edades embrionarias de 10 a 16 comienza a verse la inhibición en la incorporación de radioactividad

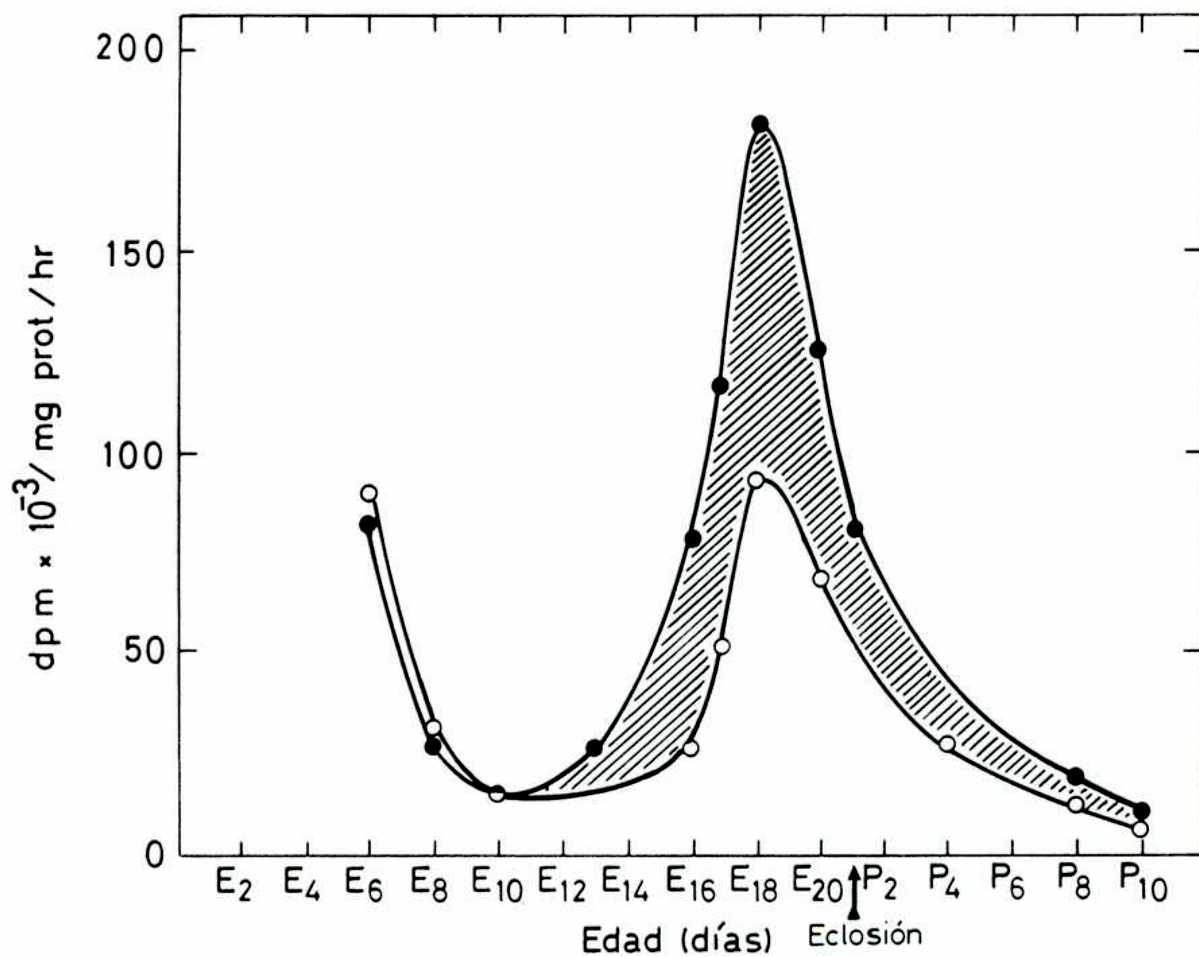


Figura 30. Velocidad relativa de la incorporación de Man-²³H a proteína en función de la edad (●).

Efecto del agregado de 20% de suero al medio (v/v) (○).

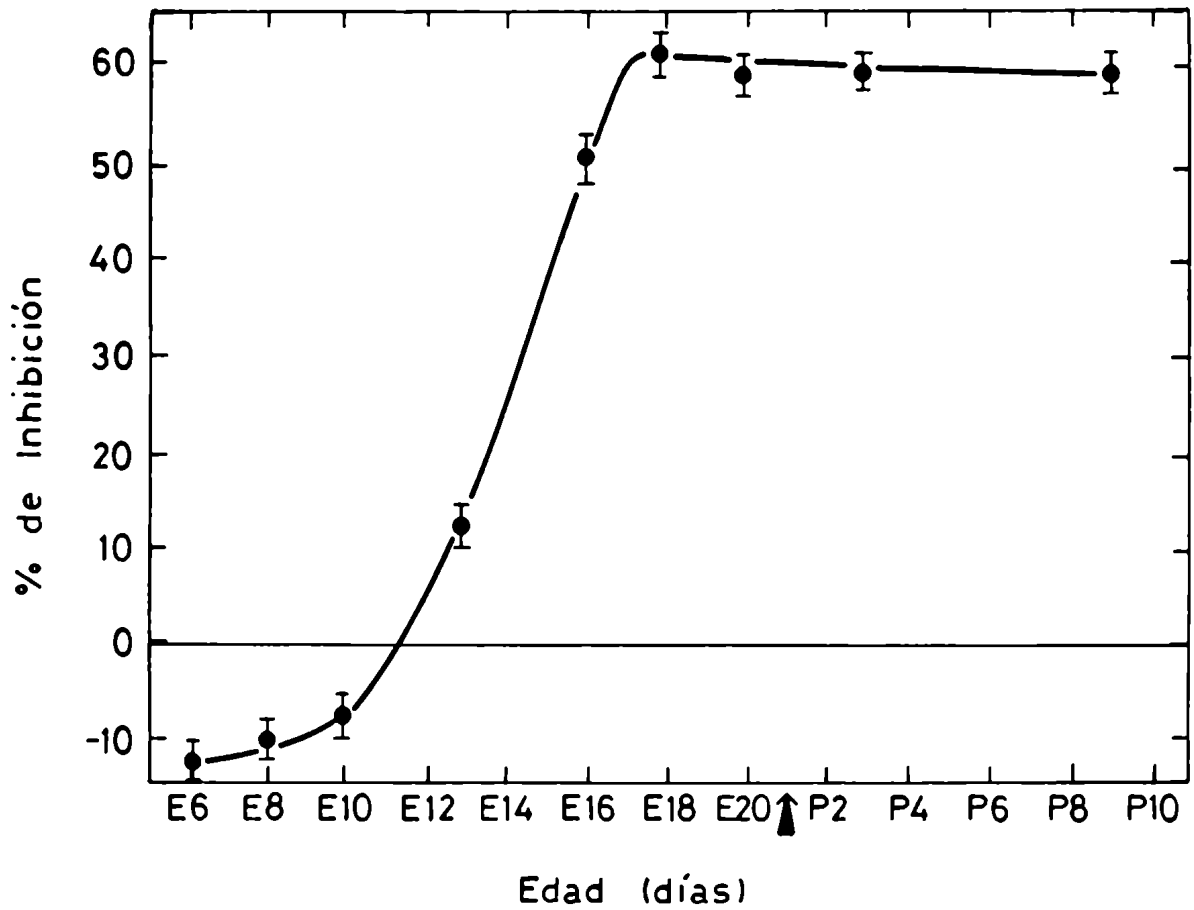


Figura 31. Porcentaje de inhibición de la incorporación de Man-2³H a proteína en función de la edad por efecto de 20% de suero (v/v) agregado al medio de incubación.

a proteínas que se mantiene elevada hasta pollos de 10 días.

3.14. Efecto del suero sobre la incorporación de Leu-4,5³H a proteína en lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días

Con la finalidad de evaluar el efecto del suero en la síntesis proteica se procedió a medir la cinética de incorporación de Leu-4,5³H a proteína en presencia de 20% de suero en el medio de incubación. Partículas de lóbulo óptico de embriones de pollo de 18 días se incubaron distintos tiempos (hasta 3 horas) en las condiciones estándar. Se siguió el procesamiento indicado en Materiales y Métodos. El resultado se muestra en la Fig. 32. Se puede observar un pequeño descenso en la incorporación de Leu-4,5³H a proteínas en presencia de suero.

3.15. Efecto del suero sobre la incorporación de uridina-³H a RNA en lóbulos ópticos de embriones de pollo de 19 días

En este trabajo se ha encontrado que (en presencia de suero) en el lóbulo óptico de embriones de pollo de 18 días hay una marcada inhibición en la incorporación de Man-2³H a proteína y en cambio una pequeña disminución en la síntesis proteica. Con el objeto de establecer el efecto del suero sobre la incorporación de tritio a RNA a partir de uridina-³H se diseñó el siguiente experimento: partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 19 días se incubaron como se indica en Materiales y Métodos con uridina-³H, en presencia o ausencia de 5% SFB (v/v) en el medio de incubación.

El resultado se observa en la Fig. 33. Se encontró un apreciable descenso en la incorporación de uridina radioactiva a RNA en presencia de suero.

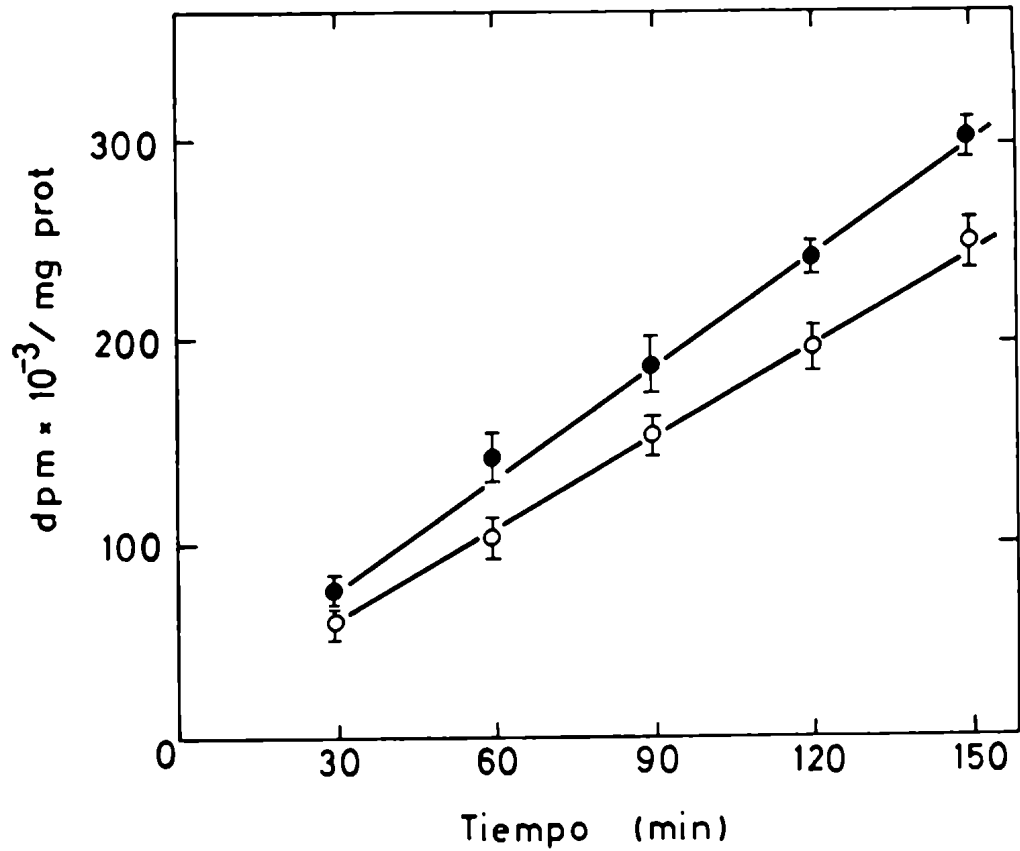


Figura 32. Incorporación de Leu-4,5³H a proteína en función del tiempo de incubación.

Se sembraron partículas de lóbulos ópticos de embrión de pollo de 18 días en ausencia de suero (●) y en presencia de 10% (v/v) de suero fetal bovino en el medio de incubación (○).

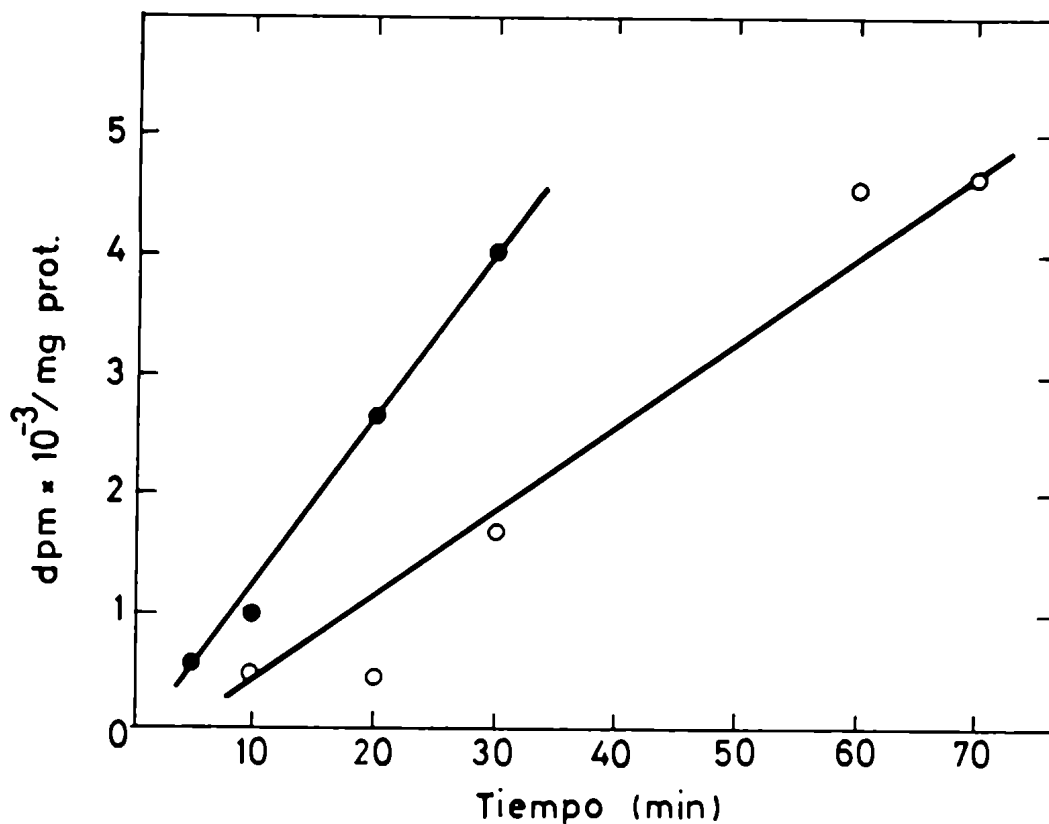


Figura 33. Incorporación de uridina-³H a RNA en función del tiempo de incubación.

En ausencia (●) o presencia de 5% de suero fetal bovino (○) en el medio de incubación de partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 19 días. Los detalles experimentales están en Materiales y Métodos.

3.16. Efecto del suero sobre la incorporación de tritio a gangliósidos a partir de glucosamina-³H en lóbulos ópticos de embriones de 17 días

Para evaluar el efecto del suero sobre la incorporación de glucosamina tritiada a gangliósidos en esta etapa del desarrollo del lóbulo óptico en la cual se ha encontrado máximo el efecto de inhibición de la incorporación de manosa tritiada a proteínas se diseñaron dos experimentos parecidos pero con suero de distintas fuentes. Partículas de lóbulos ópticos de embriones de 17 días se incubaron en presencia de glucosamina-³H y 20% de SFB (v/v) en el medio de incubación (ver Materiales y Métodos) durante 2 horas. Se junta el material de 2 microcavidades y se procesa como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV A . Puede observarse que la presencia de suero fetal bovino en el medio de incubación produce un descenso en la incorporación de radioactividad a gangliósidos a partir de glucosamina³-H en comparación con los valores control (sin suero).

Estos experimentos se repitieron agregándole suero de pollo de 3 días al medio de incubación (20%, v/v) en las condiciones anteriores. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV B. Como puede observarse tanto con SFB como con suero de pollo se obtiene un descenso en la incorporación de glucosamina tritiada a gangliósidos.

3.17. Efecto de la luz o de la oscuridad durante el desarrollo del lóbulo óptico sobre la cinética de incorporación de radioactividad de proteínas a partir de Man-2³H

Existen mediciones electrofisiológicas en lóbulo óptico de embriones de pollo en respuesta a la iluminación de retinas, desde embriones de 17 días

Condición experimental	A. Suero fetal bovino		B. Suero de pollo de 3 días	
	Incorporación glucosamina- ³ H a gangliósidos	% del control	Incorporación glucosamina- ³ H a gangliósidos	% del control
	dpmx10 ³ /mg prot.	%	dpmx10 ³ /mg prot	%
Sin suero	30	100	66	100
+20% suero	23	77	42	64

Tabla IV. Incorporación de glucosamina-³H a gangliósidos en partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 17 días.

A. En presencia de 20% (v/v) de suero fetal bovino y B. de igual cantidad de suero de pollo de 3 días. Son 2 experimentos independientes, cada uno hecho por triplicado, utilizándose en cada caso las incubaciones sin agregado de suero en el medio como control.

(33). Con el objeto de evaluar el efecto que produce la luz sobre la incorporación de manosa tritiada a proteínas en el lóbulo óptico de pollo durante el desarrollo, se diseñó el siguiente experimento: se separaron 2 poblaciones de huevos embrionados de 16 días de edad. Ambas se mantuvieron en estufa a 39°C en atmósfera humidificada, sin agua y sin alimento, hasta dos días después de la eclosión. Una población fue iluminada en forma continua con luz blanca incandescente, mientras que a la otra se la mantuvo en la mayor oscuridad. Luego se procedió a realizar las incubaciones de las partículas de los lóbulos ópticos bajo las condiciones estándar.

Los resultados se muestran en la Fig. 34 A. Puede observarse un leve descenso en la cinética de incorporación de manosa radioactiva a proteínas en los lóbulos ópticos de aquellos animales que estuvieron en presencia de luz continua todo el tiempo.

Efecto del suero sobre los experimentos de luz y oscuridad

Se repitieron los experimentos anteriores pero en la incubación de las partículas de lóbulo óptico al ensayo estándar se le agregó 20% de suero. Se procesaron las muestras como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados se grafican en la Fig. 34 B. Puede observarse que en estas condiciones experimentales la presencia o ausencia de luz no afecta la cinética de incorporación de radioactividad a proteína a partir de Man- 2^3H .

Para visualizar mejor estos resultados, en la Fig. 34 C se grafican en forma comparativa las curvas de los experimentos anteriores. Se observa que en ambos casos (luz y oscuridad) la inhibición por el suero es grande. Además, la pequeña diferencia en la cinética de los experimentos controles con luz o con oscuridad, prácticamente se anula por la presencia de suero.

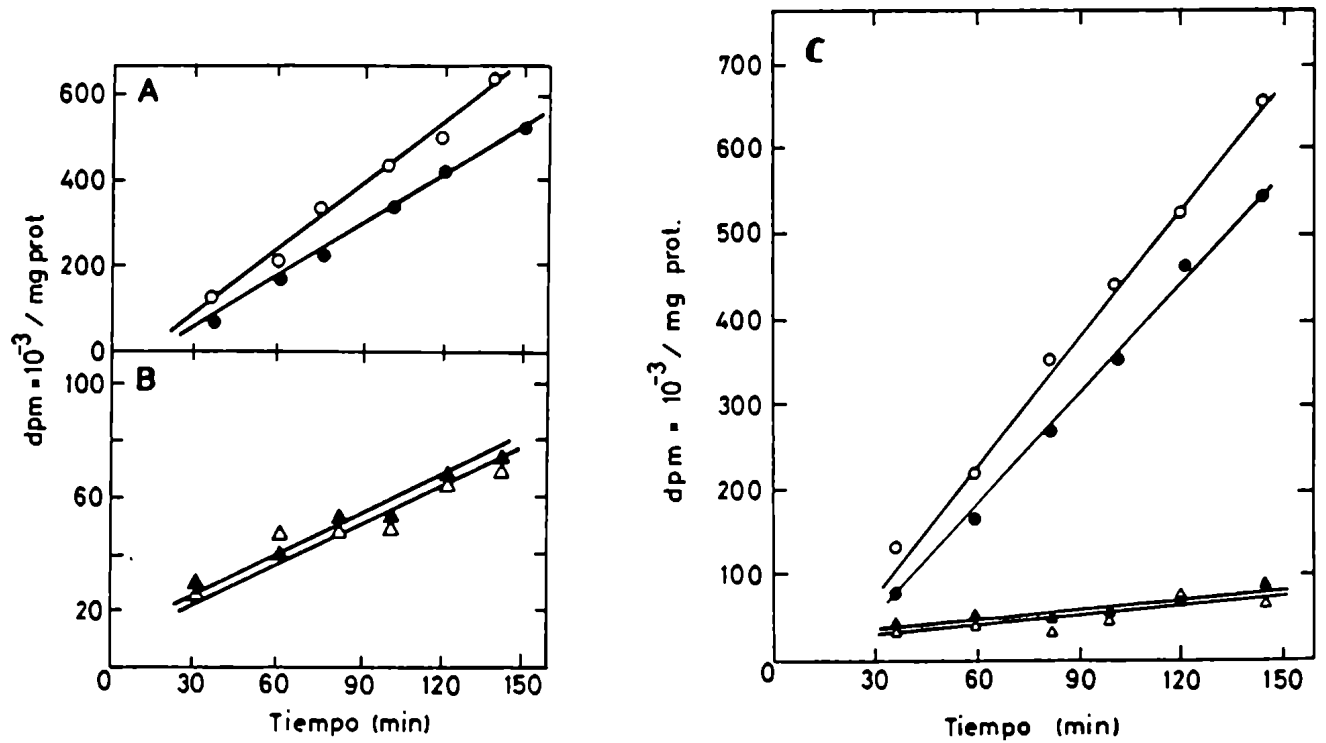


Figura 34. Efecto del tratamiento previo con luz u oscuridad sobre la cinética de incorporación de $\text{Man-}^3\text{H}$ a proteína a lóbulo óptico de pollo en función del tiempo de incubación.

A. Sin agregado del suero al medio y B. En presencia de 20% de suero fetal bovino. Se incubaron partículas de lóbulos ópticos de pollos de 2 días (o) mantenidos siempre en oscuridad y (●) iluminados en forma continua desde embriones de 16 días. C. Los experimentos con luz y oscuridad, en presencia y ausencia de suero (A y B) se grafican juntos. Ver texto.

3.18. Medición de la incorporación de radioactividad a proteína a partir de manosa tritiada con y sin suero, variando las condiciones de stress (ayuno de agua o de comida)

3.18.a. Privación estricta de agua

Con el objeto de conocer el efecto de factores externos de stress sobre la medición de incorporación de Man- 2^3H a proteínas en lóbulo óptico se diseñaron los siguientes experimentos: se dejó un grupo de animales, desde el nacimiento hasta los tres días, sin agua ni comida, con luz blanca y a temperatura adecuada. Otro grupo de pollitos fueron tratados en la misma forma pero se les permitió beber agua "ad libitum".

Se incubaron las partículas de lóbulos ópticos de ambos grupos en las condiciones estándar durante distintos tiempos hasta 3 horas aproximadamente. Cada grupo se subdividió para la incubación: en presencia o ausencia de suero (control). Se procesó el material como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados están graficados en la Fig. 35 A. Se observa una disminución en la incorporación de manosa tritiada a proteína en los animales mantenidos durante 72 hs. con ayuno estricto de agua.

Los lóbulos ópticos de los animales privados de agua o los que pudieron ingerirla "ad libitum" cuando se incubaron en presencia de suero mostraron una marcada inhibición en la cinética de incorporación de manosa radioactiva a proteína (Fig. 35 B).

Se observa además que en ambos casos se llega a los mismos valores. Parecería que la diferencia en la historia previa del animal a partir del nacimiento (con o sin agua en su dieta durante tres días) se refleja parcialmente en las incubaciones de los lóbulos ópticos en los controles, pero en presencia de suero esta diferencia se anula.

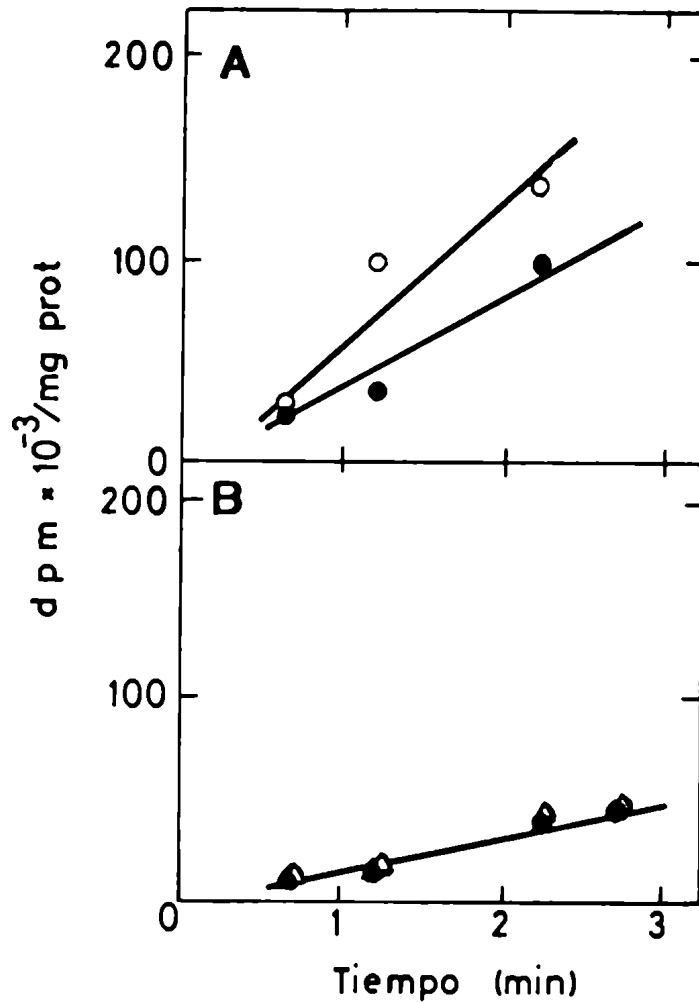


Figura 35. Incorporación de Man-²³H a proteína en función del tiempo de incubación, ante condiciones de stress. Se incubaron partículas de lóbulos ópticos de pollos de 3 días.

A. Sin agregado de suero y B. En presencia de 20% de suero fetal bovino en el medio de incubación. Los animales se mantuvieron desde el nacimiento bajo luz continua y sin alimento. Un grupo sin agua (●) y otro con agua "ad libitum" (o).

3.18.b. Ayuno de comida

En estos experimentos como en los recién descritos se midió la incorporación de manosa tritiada a proteína. Con el objeto de establecer si la historia previa del animal, ayunado o alimentado "ad libitum", influye en esa cinética de glicosilación de proteína, se diseñó el siguiente experimento: se separaron dos grupos de animales luego de la eclosión. A uno de ellos se les suministró alimento balanceado especial para pollitos recién nacidos (Cargill S.A.) y al otro se lo privó de toda alimentación. A ambos grupos se les suministró agua y se los mantuvo con luz blanca continua y temperatura controlada. Luego de tres días en estas condiciones se incubaron las partículas de lóbulo óptico de estos animales en las condiciones estándar en presencia o ausencia de suero. La incubación se efectuó durante distintos tiempos hasta 3 horas aproximadamente. El material se procesó para medición de radioactividad en proteínas como se explica en Materiales y Métodos.

Los resultados se muestran en la Fig. 36 A. Se observa un descenso en la incorporación de tritio a proteína en las incubaciones de partículas de lóbulos ópticos de pollo de 3 días que recibieron alimento balanceado y agua frente a los que sólo recibieron agua.

Cuando se efectúan estas incubaciones en presencia de 20% de suero, se puede observar una brusca disminución en la incorporación de manosa tritiada a proteína (Fig. 36 B). En forma semejante a lo que ocurría en los experimentos con ayuno de agua, la presencia de suero en el medio de incubación enmascara los resultados obtenidos por la privación de alimentos. Es decir, en los controles (sin suero) la alimentación en las primeras 72 horas de vida del pollito produce una cierta disminución en la pendiente de las curvas de incorporación de radioactividad a proteína pero en presencia de

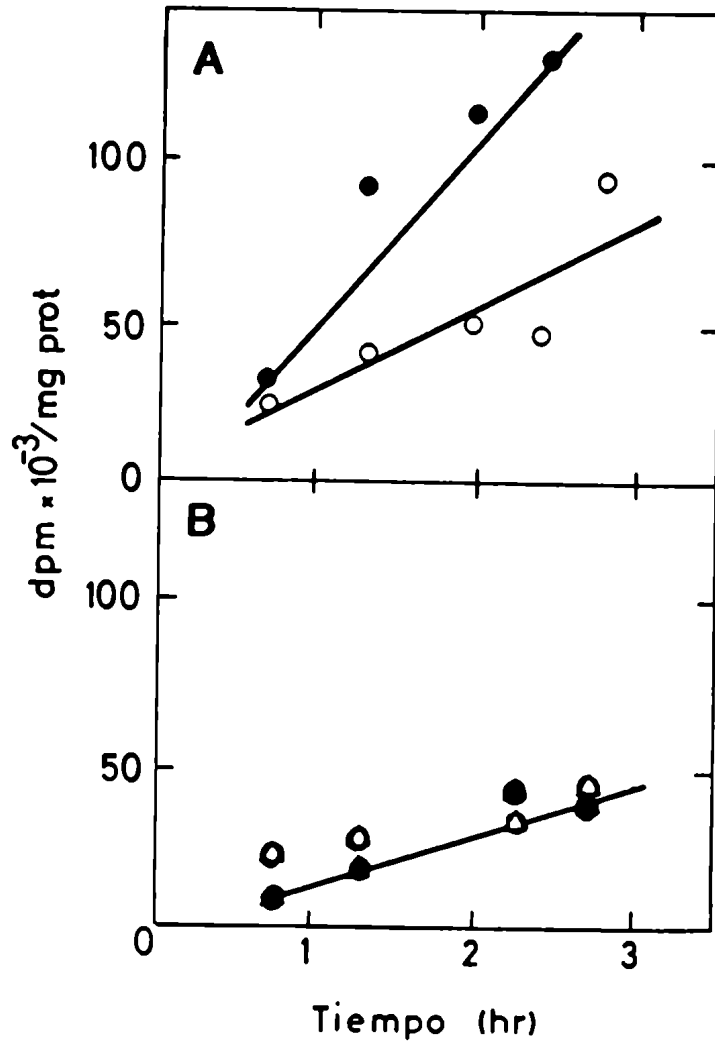


Figura 36. Incorporación de Man-²³H a proteína en función del tiempo de incubación bajo condiciones de stress.

Se utilizaron partículas de lóbulos ópticos de animales de 3 días. A. Incubados sin suero y B. con el agregado de 20% de suero fetal bovino en el medio. Los pollos fueron mantenidos desde el nacimiento bajo luz continua y con agua. Un lote sin alimento (●) y otro con el suministro de alimento balanceado "ad libitum" (○).

suero esta disminución es mucho mayor, llegando a los mismos valores independientemente si los animales se han alimentado o no.

Además, puede observarse que las curvas en presencia de suero son todas prácticamente iguales en cualquiera de las condiciones previas de los pollitos: ayuno de alimento, privación de agua o cuando ambos son suministrados "ad libitum".

3.19. Efecto del corte de las principales aferencias nerviosas del lóbulo óptico sobre la síntesis y glicosilación de sus proteínas

Se ensayaron animales de distintas edades (6, 9 y 19 días) en todos los casos, después de 5 días de la enucleación.

3.19.a. Cinética de incorporación de Man- 2^3H a proteína en lóbulos ópticos de pollos de 6 días, luego de 5 días de enucleados

Con el objeto de conocer el efecto de la enucleación sobre la incorporación de tritio a proteínas en el lóbulo óptico contralateral, se diseñó el siguiente experimento: dado que la mayor cantidad de aferentes del lóbulo óptico provienen de la retina del ojo contralateral, se procedió a enuclear del lado derecho a pollitos de 1 día, para medir la incorporación de tritio a proteínas a partir de Man- 2^3H en el lóbulo óptico del lado izquierdo y compararla con la radioactividad medida en el lóbulo óptico ipsilateral (recibe los axones de la capa ganglionar del ojo del mismo lado, en este caso el lado derecho). La medición se hizo luego de 5 días de la enucleación, durante los cuales se mantuvo a los pollitos bajo luz blanca continua y se les permitió comer y beber agua "ad libitum".

Partículas de lóbulos ópticos de esos pollitos de 6 días (que fueron enucleados el primer día), contralaterales e ipsilaterales al ojo afectado,

se incubaron bajo las condiciones estándares explicadas en Materiales y Métodos, durante distintos tiempos hasta 4 horas aproximadamente. Se frenaron las incubaciones y se procesó el material como se indica en el experimento anterior.

Los resultados se observan en la Fig. 37-I. La cinética de incorporación de tritio a proteínas a partir de Man- 2^3H en el lóbulo óptico contralateral se ve afectada con respecto al lóbulo óptico ipsilateral considerado como control. Se encontró una disminución en la incorporación de radioactividad en el lóbulo óptico que no recibió sus aferencias normalmente.

3.19.b. Incorporación de Leu-4,5 ^3H a proteína

Se repitió el experimento utilizando 2,5 μCi de Leu-4,5 ^3H por cavidad para medir la síntesis de proteínas en estas condiciones.

Como puede observarse en la Fig. 37-II no hay alteración detectable en la cinética de incorporación de Leu-4,5 ^3H a proteínas en los particulados de lóbulo óptico del lado contralateral respecto al ipsilateral al ojo afectado en pollo de 6 días, luego de 5 días de enucleación.

3.19.c. Pollos de 9 días, luego de 5 días de enucleados

Con el objeto de conocer si la enucleación produce un efecto detectable en la síntesis y glicosilación de proteínas en lóbulo óptico de pollo de 9 días, luego de 5 días de enucleado, se procedió de la siguiente manera: se incubaron las partículas de tejido como en los animales de 6 días, anteriormente descritos, en presencia de Man- 2^3H o de Leu-4,5 ^3H . Los resultados se muestran en la Fig. 38, 1. Como puede observarse existe una disminución en la incorporación de Man- 2^3H a proteínas en el lóbulo óptico que no recibió los axones de la retina con respecto al control, ipsilateral

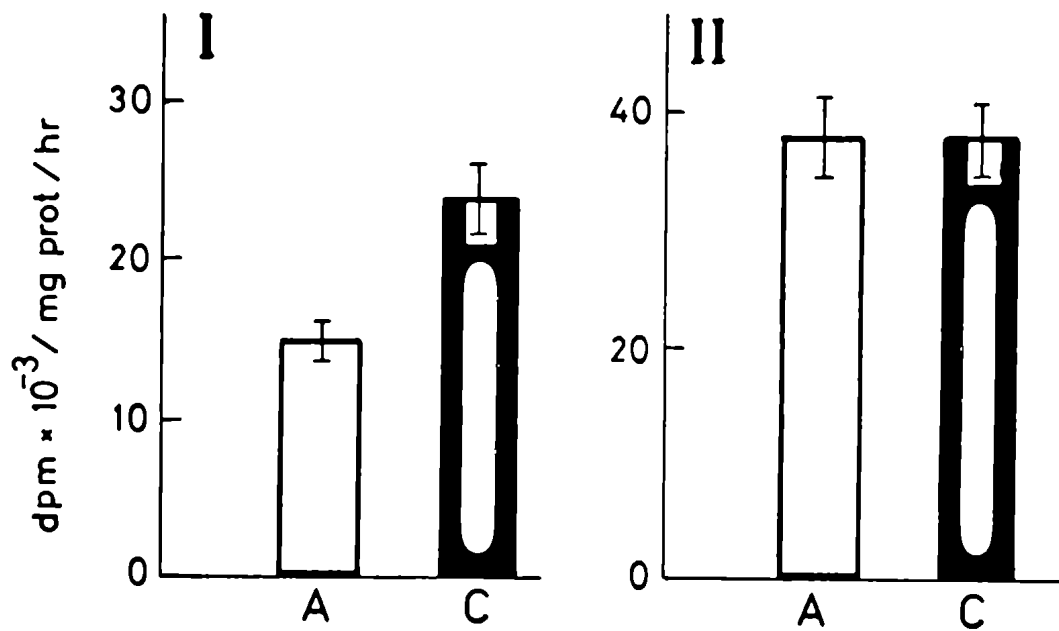


Figura 37. Efecto del corte de las principales aferencias nerviosas del lóbulo óptico sobre la síntesis y glicosilación de sus proteínas.
 C. Control (lóbulo óptico ipsilateral al ojo afectado).
 A. Afectado (lóbulo óptico contralateral al ojo afectado).
 I. Incorporación de Man-2³H a proteína de lóbulos ópticos de pollos de 6 días, luego de 5 días de enucleados.
 II. Incorporación de Leu-4,⁵³H a proteína en los mismos animales.

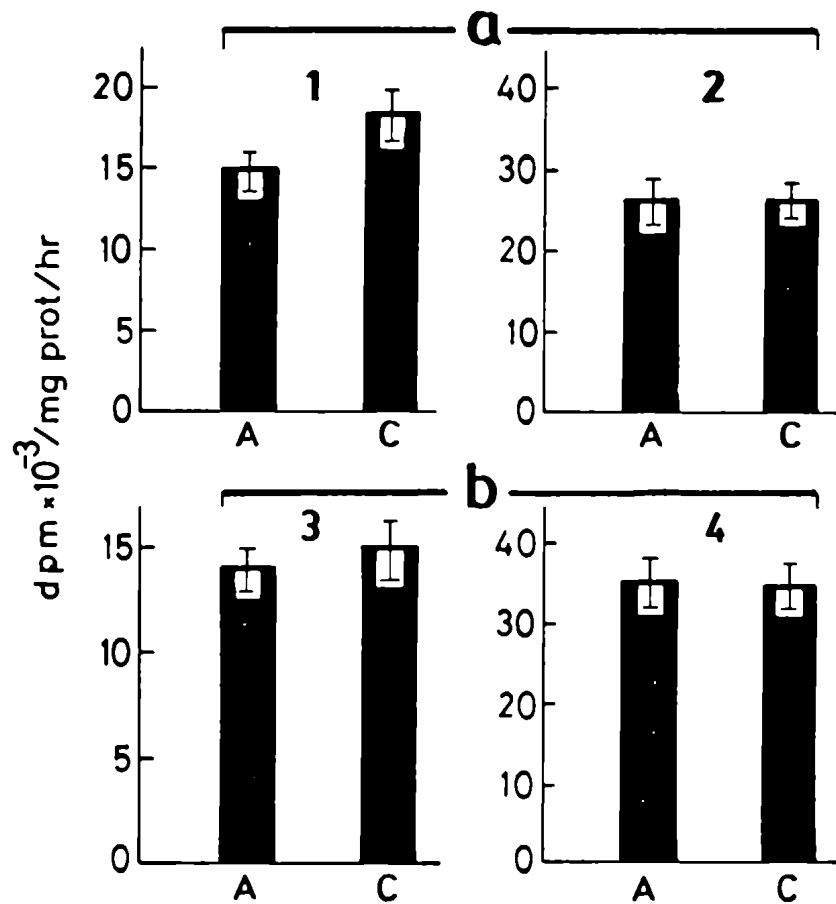


Figura 38. Efecto de la enucleación sobre la síntesis y glicosilación de proteínas.

Se incubaron partículas del lóbulo óptico ipsilateral al ojo afectado (C, control) y del lóbulo óptico contralateral (A, afectado), a: de pollos de 9 días y b: de animales de 19 días. Ambos lotes se ensayaron luego de 5 días de enucleados. Se midió incorporación de Man-2³H a proteínas en 1 y 3 e incorporación de Leu 4,5³H en 2 y 4.

al ojo afectado. En la Fig. 38, 2, se observan que no hay diferencias apreciables en la incorporación del aminoácido a proteínas.

3.19.d. Pollos de 19 días, luego de 5 días de enucleados

Se repitieron los experimentos con animales de 19 días, ya que se quería saber si en pollos de mayor edad, se mantenía el efecto inhibitorio de la enucleación sobre la incorporación de Man- 2^3H a proteína.

Los resultados se muestran en la Fig. 38, 3. No se aprecian diferencias en la cinética de incorporación de tritio a proteínas a partir de Man- 2^3H en lóbulo óptico contralateral respecto al ipsilateral al ojo afectado.

Cuando se utilizó Leu- $4,5^3\text{H}$, no se observó diferencias en la incorporación del aminoácido a proteínas. Estos resultados se muestran en la Fig. 38, 4.

3.19.e. Efecto del suero en los estudios anteriores

Para comparar el efecto de la historia previa del animal, en este caso el corte de las principales aferencias nerviosas del lóbulo óptico, con el efecto superpuesto de agregarle suero al medio de incubación, se diseñó el siguiente experimento. Se utilizaron animales de 6 días, con 5 días de enucleados ya que se observa en esta edad un efecto inhibitorio de la incorporación de Man- 2^3H a proteína, como se demostró en 3.19.a. Se le agregó 20% de suero fetal bovino al medio de incubación.

En la Fig. 39 a, se muestran los resultados. Puede observarse que en presencia del suero, tanto las partículas del lóbulo óptico ipsilateral como el contralateral al ojo afectado disminuyen la incorporación de radioactividad a proteína. Además, en presencia de suero en el medio de incubación

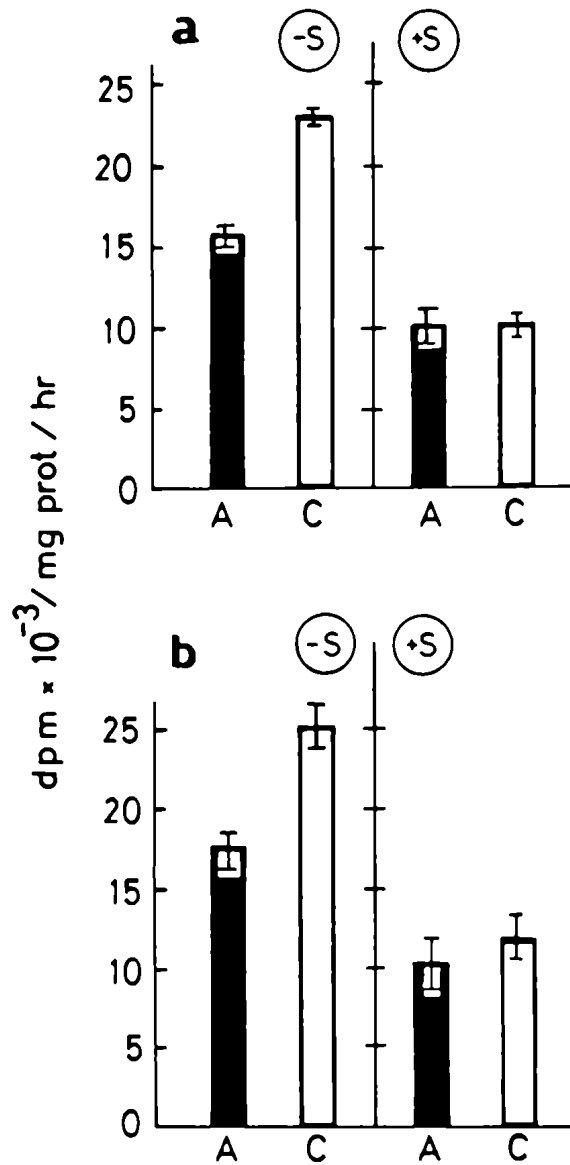


Figura 39. Efecto superpuesto de enucleación del animal y de agregarle suero al medio de incubación sobre síntesis y glicosilación de proteínas. Se incubaron partículas de lóbulo óptico C= ipsilateral y A= contralateral al ojo afectado. a: Animales de 6 días, luego de 5 días de enucleado. b: Animales de 3 días luego de 2 días de enucleados. Se midió incorporación de Man-2³H a proteína: 1 y 3 e incorporación de Leu-4,5³H a proteína 2 y 4.

-S= sin suero.
+S= más 20% suero.

ya no es detectable la diferencia entre el enucleado y el control (no enucleado).

Los mismos resultados se encontraron con pollos de 9 días con 2 días de enucleados (resultados no mostrados) y pollos de 3 días con 2 días de enucleados. Estos últimos resultados se muestran en la Fig. 39 b, respectivamente.

3.20. Cinética de incorporación de Man-2³H a proteínas en hígado de embrión de pollo de 17 días

3.20.a. Efecto del suero

Con la finalidad de estudiar si el efecto del suero sobre la incorporación de tritio a proteína es específico para el tejido nervioso, se diseñó el siguiente experimento. Partículas de hígado de embrión de pollo de 17 días fueron incubadas bajo las condiciones estándar utilizado para el tejido nervioso.

Se midió la incorporación de radioactividad a proteínas como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados se muestran en la Figs. 40 y 41. A diferencia de lo que se observa en el lóbulo óptico, en hígado no se encontró ningún cambio en la incorporación de Man-2³H a proteínas en presencia de 20% de suero en el medio de incubación respecto del control (sin suero).

3.20.b. Incorporación de Leu-4,5³H a proteínas de hígado

Con el objeto de evaluar el posible efecto del suero sobre la síntesis proteica en hígado, se procedió a medir la incorporación de Leu-4,5³H a proteína en presencia de suero fetal bovino (20% (v/v)) en el medio de incubación. Las incubaciones se realizaron durante 2 horas en las condiciones

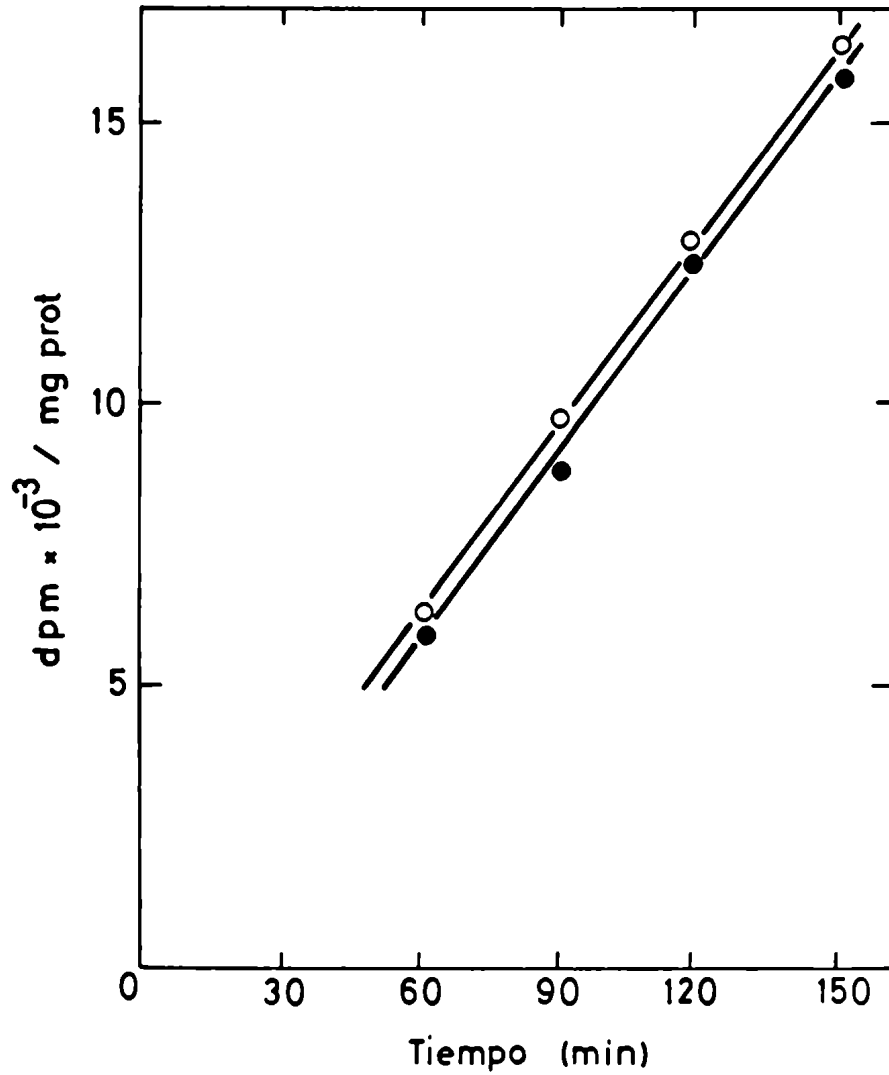


Figura 40. Cinética de incorporación de Man-2³H a proteínas de hígado de embrión de pollo de 17 días (o). En presencia de 20% (v/v) de suero fetal bovino en el medio de incubación (●).

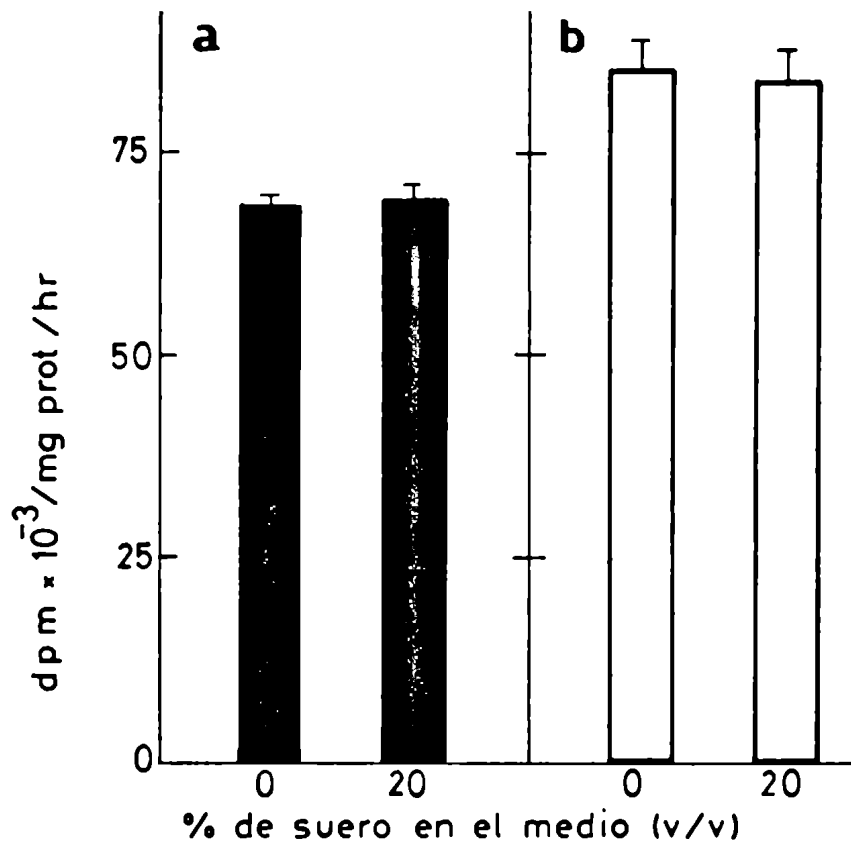


Figura 41. Incorporación de radioactividad a proteínas de hígado de embrión de pollo de 17 días, a partir de Man-2³H, (a) o de Leu-4,5³H, (b). Se realizaron incubaciones de 2 horas, en presencia de 20% (v/v) de suero fetal bovino o sin suero, control.

estándar.

El resultado se observa en el histograma de la Fig. 41, donde se incluyen también como un control adicional la incorporación de Man- 2^3H a proteína en las mismas condiciones experimentales y en el mismo animal. Según estos datos, la incorporación del aminoácido a la proteína no se encuentra alterada.

3.21. Efecto del suero sobre la cinética de incorporación de radioactividad a proteínas de la corteza cerebral de rata de 5 días

3.21.a. Incorporación de Man- 2^3H en presencia de 20% de suero en el medio

A fin de establecer si el efecto del suero sobre la incorporación de radioactividad a proteínas a partir de Man- 2^3H se repetía en sistema nervioso central de otra especie, se procedió de la siguiente manera. Partículas de corteza cerebral de ratas de 5 días se incubaron bajo condiciones estándar. Las incubaciones se frenaron a los tiempos correspondientes y se procedió como se indica en Materiales y Métodos para la obtención de la radioactividad incorporada a proteínas.

Como puede observarse en los resultados que se muestran en la Fig. 42, existe una disminución en la incorporación de tritio a proteínas provocada por la presencia de suero en el medio de incubación con respecto a los valores control (sin suero).

3.21.b. Incorporación de Man- 2^3H a proteína en función de la concentración de suero utilizada en el medio

Con el fin de establecer si en corteza cerebral de rata de 5 días, al igual que en lóbulos ópticos de pollo, el efecto de la disminución de incorporación de tritio a proteínas a partir de Man- 2^3H es una función de la can-

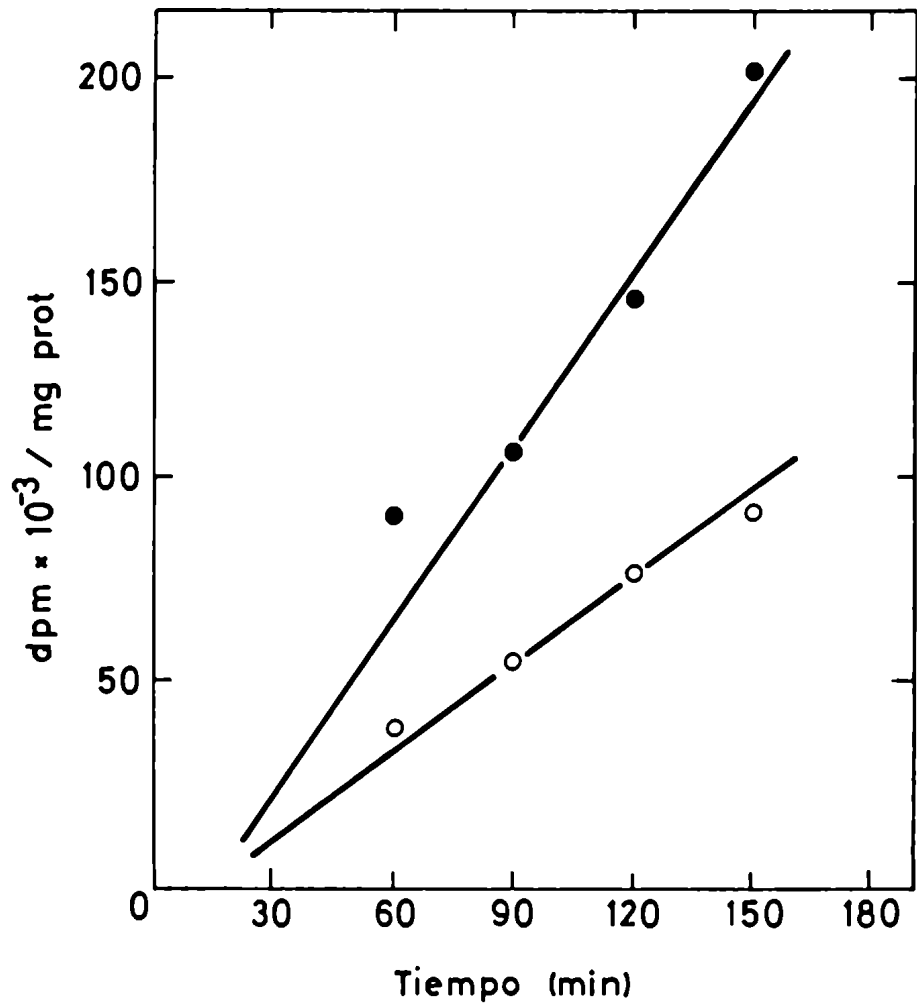


Figura 42. Cinética de incorporación de Man-2³H a proteína de corteza cerebral de rata de 5 días (●).

Efecto de agregarle 20% (v/v) de suero fetal bovino al medio de incubación (○).

tividad de suero en el medio de incubación, se realizó el siguiente experimento: partículas de corteza cerebral de rata de 5 días se incubaron bajo condiciones estándar con distintas proporciones de suero fetal bovino en el medio de incubación (2.5, 10 y 20% (v/v)) y el control sin suero, durante 2 horas. Para la medición de radioactividad en proteína y cantidad de proteína incubada se siguieron las indicaciones que se explican en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en el histograma de la Fig. 43, A. Puede observarse que la disminución en la incorporación de tritio en proteínas a partir de Man- 2^3H en corteza cerebral de rata de 5 días depende de la concentración de suero en el medio de cultivo.

3.21.c. Incorporación de Leu-4,5 ^3H en presencia de distintas concentraciones de suero en el medio de incubación

Con el objeto de conocer si la radioactividad incorporada a proteínas a partir de Leu-4,5 ^3H depende de las proporciones de suero presentes en el medio de incubación en corteza cerebral de rata de 5 días, se procedió como sigue: se realizaron incubaciones de partículas de corteza cerebral de rata de 5 días durante 2 horas variándoles las proporciones de suero presentes en el medio: 0, 2,5, 10 y 20% (v/v). Las incubaciones se hicieron bajo condiciones estándar, utilizándose 2,5 μl de Leu-4,5 ^3H por cavidad. Se siguieron las indicaciones de Materiales y Métodos para la medición de radioactividad en proteínas.

Los resultados pueden observarse en el histograma de la Fig. 43, B. Se encontró una leve disminución en la incorporación del aminoácido a proteínas, la que es más marcada con mayores concentraciones de suero en el medio de incubación.

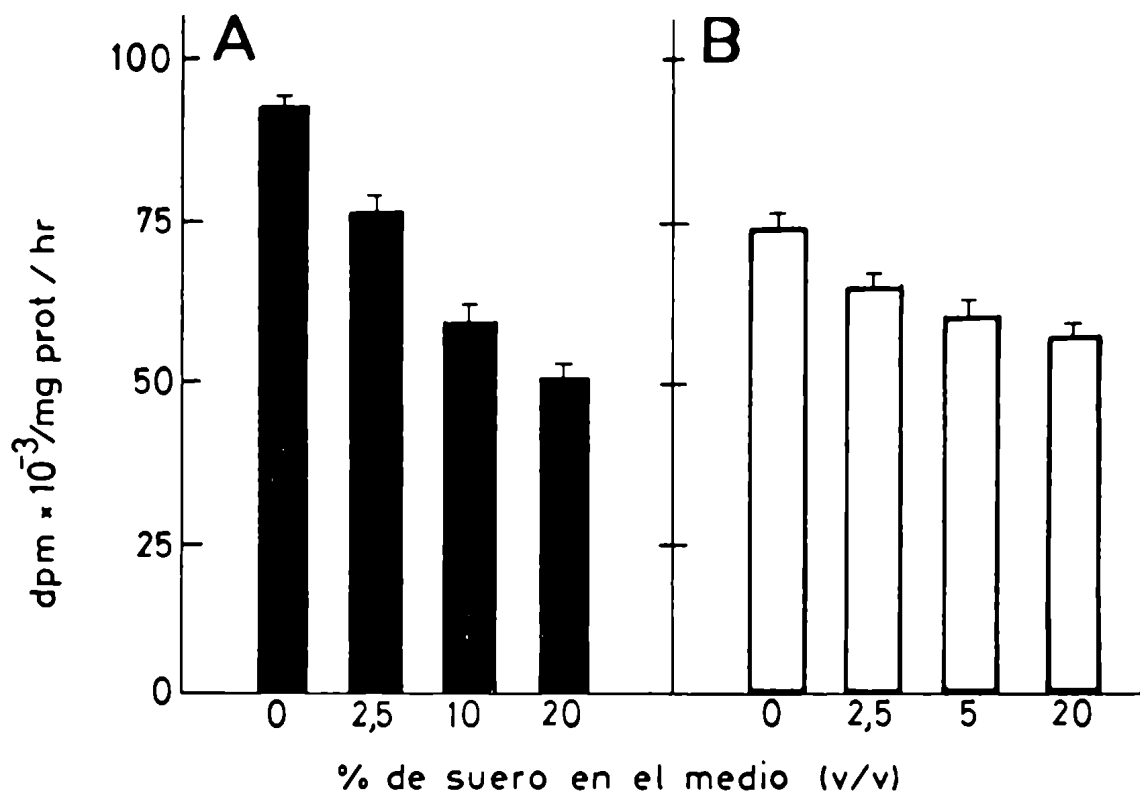


Figura 43. Incorporación de radioactividad a proteínas en corteza cerebral de rata de 5 días en función de la concentración de suero fetal bovino agregado al medio.

Se incubaron durante 2 horas en presencia de Man-2³H (A) o de Leu-4,5³H (B).

3.22. Efecto del suero sobre la incorporación de radioactividad a proteínas de la corteza cerebral de rata de 90 días

3.22.a. Incorporación de Man-2³H en presencia de 20% de suero

Se realizaron estudios paralelos de incorporación de Man-2³H a proteínas en corteza cerebral de rata adulta, para conocer si el efecto del suero se mantiene en esta edad. Partículas de dicho tejido se incubaron bajo las condiciones estándar con 20% de suero fetal bovino en el medio. Los resultados de la Fig. 44-A muestran que no hay un efecto inhibitorio del suero importante en este tejido.

3.22.b. Incorporación de Leu-4,5³H en presencia de 20% de suero

El siguiente experimento se diseñó con la finalidad de establecer si un efecto similar inhibitorio del suero sobre la incorporación de Leu-4,5³H a proteínas que se encontró en corteza cerebral de rata de 5 días ocurre en la corteza cerebral de rata adulta. Para lo cual se incubaron partículas de tejido en presencia y ausencia de 20% de suero fetal bovino en el medio.

Los resultados se muestran en la Fig. 44-B. En la corteza cerebral de rata adulta prácticamente no se observa la disminución de la síntesis de proteína en presencia de suero.

3.23. Captación de Man-2³H en lóbulos ópticos de embrión de pollo de 20 días

Se midió la captación de este azúcar radioactivo por el tejido en distintas condiciones experimentales:

- en las condiciones estándar (en presencia de glucosa) variando la oferta radioactiva;
- incubaciones en presencia o ausencia de glucosa a tiempos relativamente

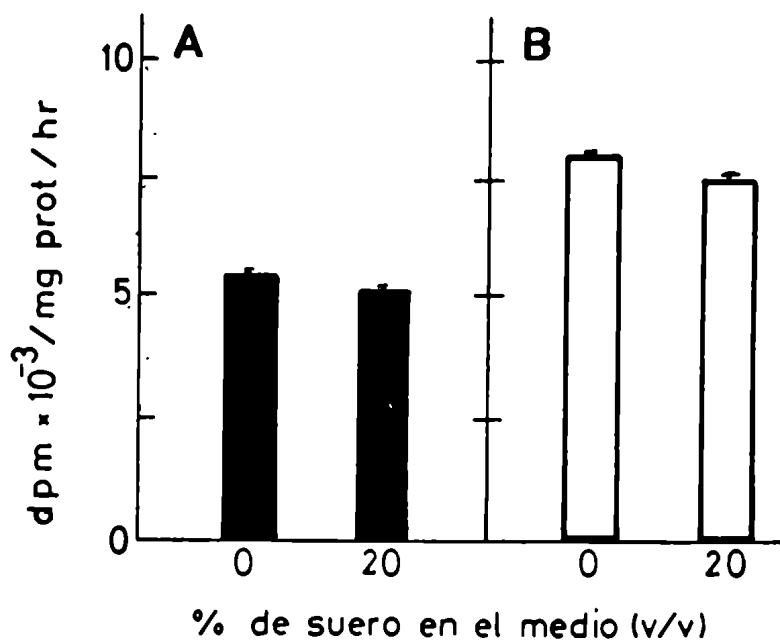


Figura 44. Efecto del suero fetal bovino (20%) sobre la incorporación de radioactividad a proteínas de corteza cerebral de rata de 90 días, control= sin suero.

A. Incorporación de Man-2³H.

B. Incorporación de Leu-4,5³H.

Se hicieron incubaciones de 2 horas.

- cortos (intervalos de 15 seg) y más largos (intervalos de 2 min);
- efecto del suero en embriones de dos edades (E6 y E18).

3.23.a. En presencia de glucosa frente a dos dosis distintas de oferta de Man-2³H

Con la finalidad de evaluar si la captación de Man-2³H en presencia de glucosa varía con la oferta del precursor radioactivo, se diseñó el siguiente experimento: partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo de 20 días se incubaron durante distintos tiempos, hasta 10 minutos, en presencia de glucosa en el medio en tubos Eppendorf y en baño de agua a 37°C (300 ± 30 µg prot/tubo, 5 ó 15 µCi Man-2³H/tubo y 50 µl medio/tubo). Se frenaron las incubaciones y se procedió como se indica en Materiales y Métodos para la medición de captación de precursores radioactivos y cantidad de proteína incubada.

Los resultados se muestran en la Fig. 45. Se observa que la captación de Man-2³H en presencia de glucosa es función de la oferta de radioactivo agregado al medio.

3.23.b. En presencia o no de glucosa en el medio

En casi todos los experimentos descriptos en el presente trabajo se han incubado las partículas de lóbulo óptico con Man-2³H en presencia de concentración fisiológica de glucosa en el medio. Para determinar si la captación del azúcar radioactivo no se altera en presencia o ausencia de glucosa en el medio, se efectuaron los experimentos cuyos resultados se muestran en las Figs. 46 y 47. Los detalles experimentales de la incubación como los de su ulterior procesamiento están explicados en la sección Materiales y Métodos (Captación de azúcares radioactivos).

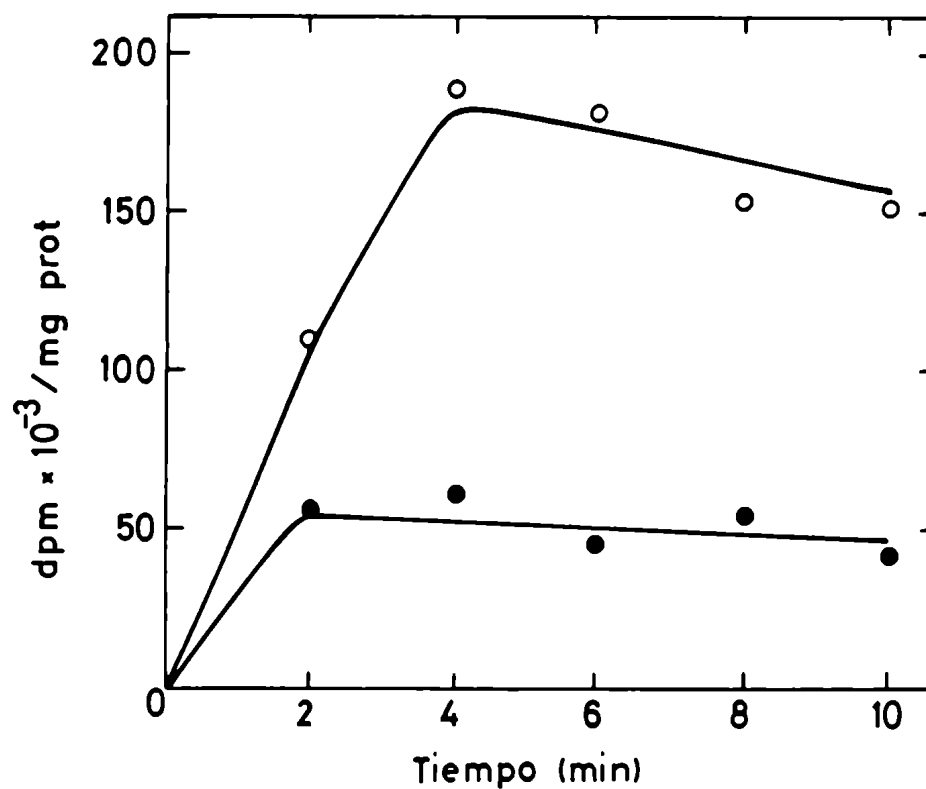


Figura 45. Captación de Man-²³H en función del tiempo de incubación y de la oferta de radioactivo en el medio.

Partículas de lóbulos ópticos de embrión de pollo de 20 días se incubaron en presencia de 50 μ l de medio conteniendo 50 μ g de glucosa más 5 μ Ci de Man-²³H (●) o 15 μ Ci de Man-²³H (○). Otras condiciones experimentales en Materiales y Métodos.

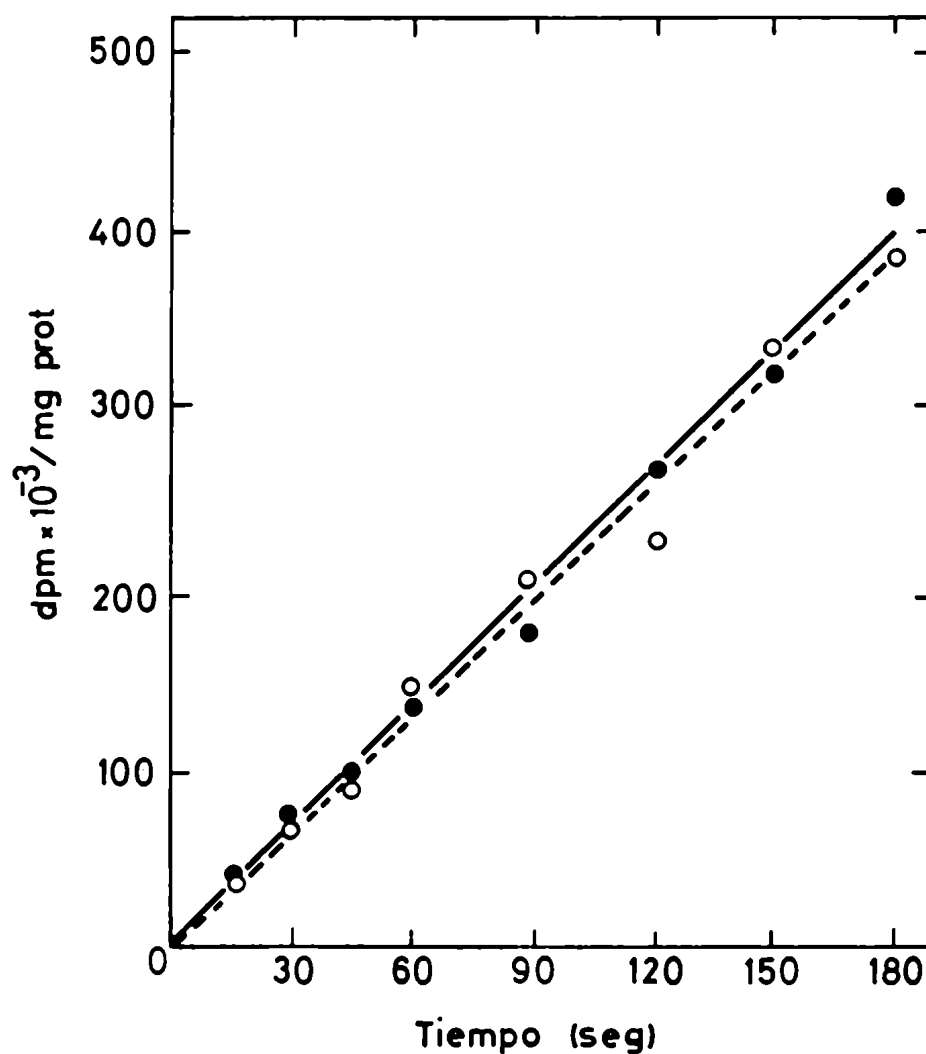


Figura 46. Captación de Man- 2^3H en función del tiempo de incubación medido cada 15 segundos en ausencia de glucosa (o) o presencia de 1 g/l de glucosa en el medio (●).

Se incubaron partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 20 días con 15 μCi de Man- 2^3H .

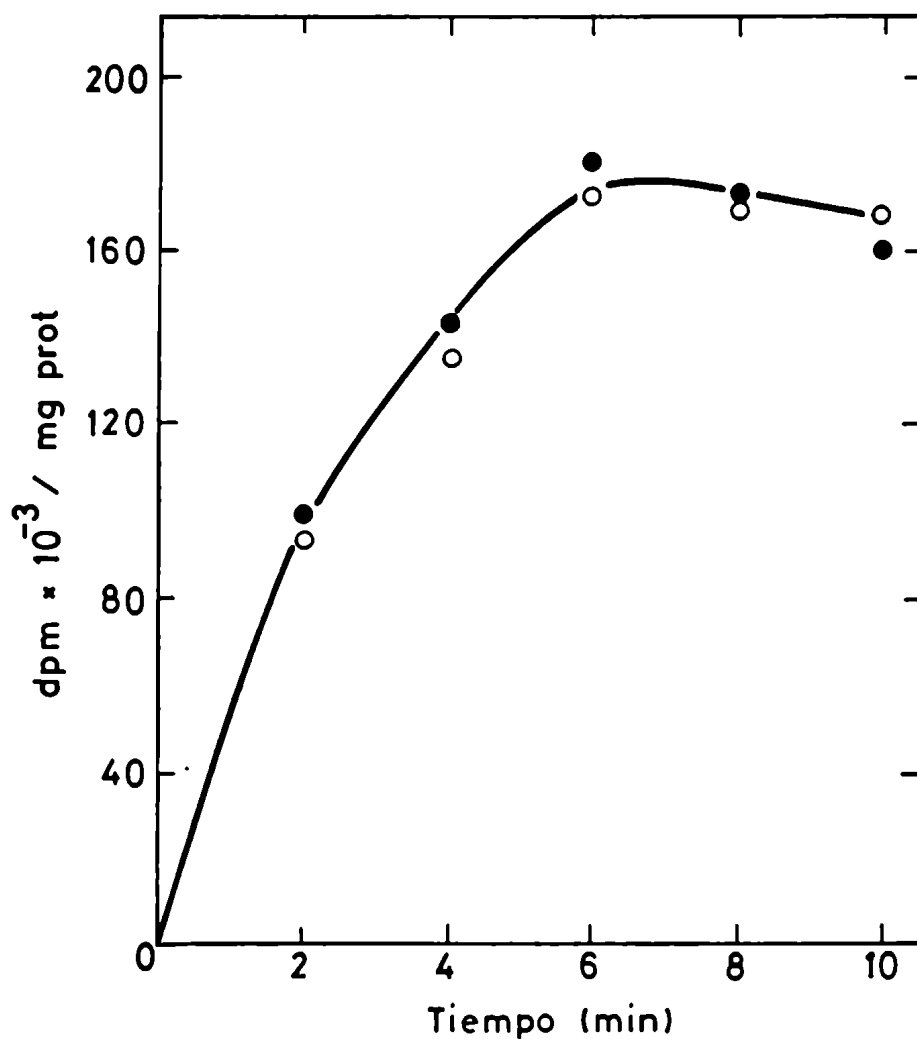


Figura 47. Captación de Man-2³H en función del tiempo de incubación hasta 10 minutos, en ausencia (●) o presencia de 1 g/l de glucosa (○) en el medio de incubación conteniendo 5 μ Ci de Man-2³H. Se utilizaron lóbulos ópticos de embriones de 18 días.

Puede observarse en esta serie de experimentos que la captación de Man-2³H parece no alterarse por la presencia o no de glucosa en el medio de incubación, ya sea medida a intervalos de 15 segundos en incubaciones cortas (Fig. 46 o a intervalos de 2 min en incubaciones más largas (Fig. 47).

3.23.c. Efecto del suero sobre la captación de Man-2³H

Con la finalidad de conocer el efecto del suero sobre la captación de Man-2³H, se efectuó el siguiente experimento: se procedió a medir la captación de Man-2³H en partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo de dos edades (E6 y E18), siguiendo las indicaciones de Materiales y Métodos. En el medio de cultivo se agregó 20% (v/v) de suero fetal bovino. Se quiso, de esta manera, conocer si hay alguna relación entre la disminución de la incorporación de tritio a proteínas a partir de Man-2³H en presencia de suero con la captación del azúcar radioactivo en estas condiciones.

Los resultados de una serie de experimentos se presentan en la Fig. 48. Puede observarse que no hay alteración en la cinética de captación de Man-2³H en presencia de suero con respecto al control (sin suero) en las incubaciones de las partículas de los lóbulos ópticos de embriones de 6 días.

Este resultado no es inesperado ya que en los embriones de esta edad aparentemente el suero no afecta la incorporación de Man-2³H a proteína. En cambio, tenía más interés estudiar también, en el caso de los embriones de 18 días, ya que como se vio en los experimentos de la Fig. 25 el suero tiene un marcado efecto inhibitorio sobre la incorporación de Man-2³H a proteína. Como se muestra en la Fig. 49 tampoco hay alteración en la cinética de captación de Man-2³H por el tejido en presencia de suero. Este interesante resultado se va a analizar en la sección Discusión, ya que indicaría que de todas las etapas metabólicas intermedias en la incorporación de manosa a glicoproteína, el

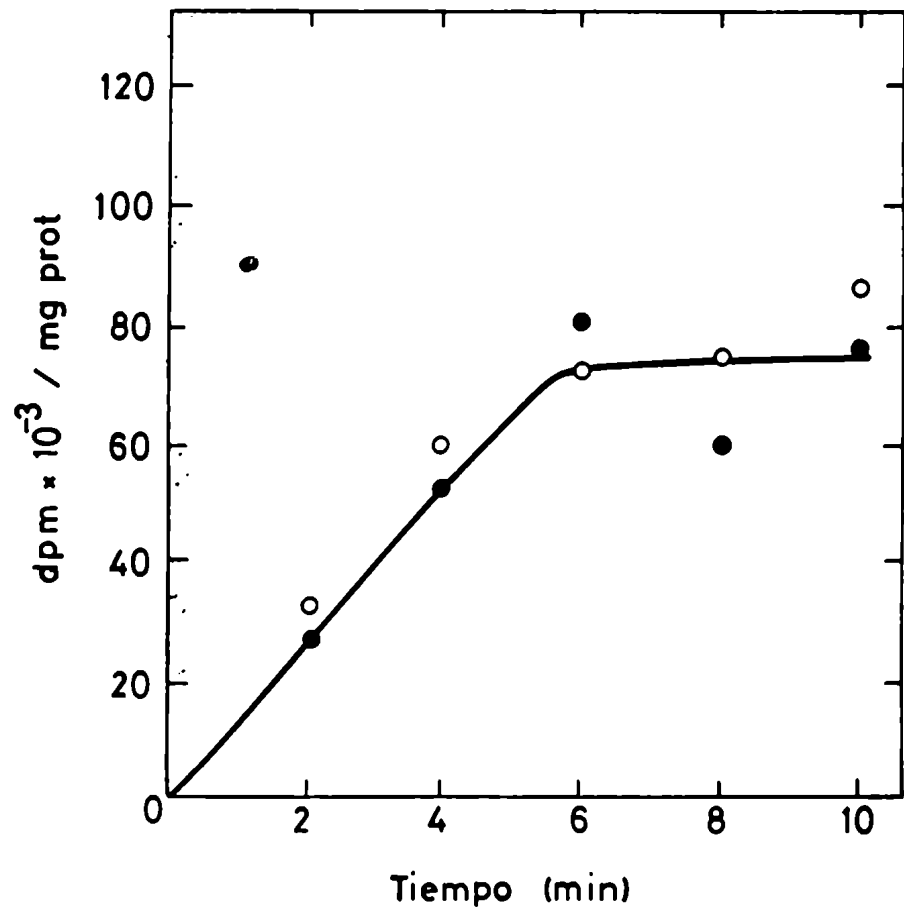


Figura 48. Captación de Man-²³H en lóbulo óptico de embrión de pollo de 6 días.

Se incubó en 50 μ l de medio, sin glucosa, conteniendo 5 μ Ci de Man-²³H sin suero (o) o en presencia de 20% (v/v) de suero fetal bovino (●).

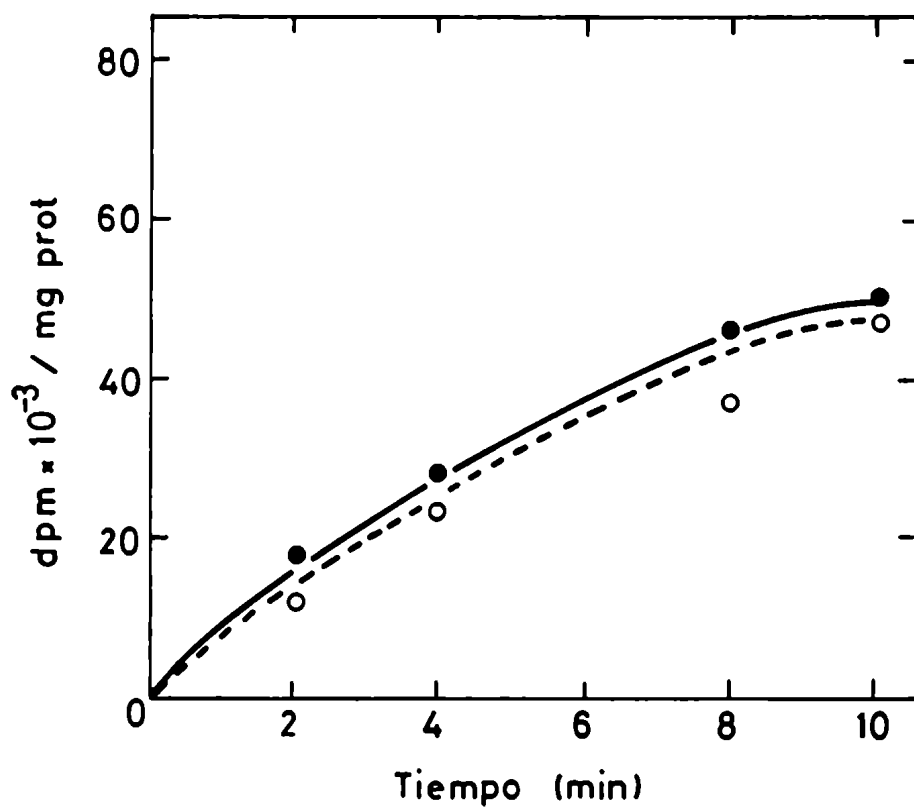


Figura 49. Efecto del suero sobre la captación de Man-²³H.

Se incubaron partículas de lóbulos ópticos de embrión de pollo de 18 días en 50 ul de medio sin glucosa, en presencia de 5 μ Ci de Man-²³H (●), sin suero o con 20% (v/v) de suero fetal bovino (o).

suero no afectaría la primera etapa (entrada del azúcar) y posiblemente lo haría en alguna etapa posterior (metabolización de la Man-6-P). Además, puede observarse que la captación de Man-2³H es levemente mayor en los lóbulos ópticos de embriones de 6 días respecto al de 18 días.

3.24. Cinética de captación de glucosa-¹⁴C y de 2-deoxiglucosa en lóbulos ópticos de embrión de pollo. Efecto del suero

Debido a que el tejido nervioso metaboliza indistintamente glucosa y manosa, tenía interés estudiar si la captación de glucosa es o no afectada por la presencia de suero en el medio de incubación. Además, se repitieron estos experimentos con un análogo de la glucosa, la 2-deoxiglucosa. Esto tiene la ventaja de que puede medirse la acumulación del éster fosfórico dentro de las células, ya que la 2-deoxiglucosa-P no se metaboliza o lo hace muy lentamente quedando atrapado en el tejido. Esta característica de la 2-deoxiglucosa será utilizada en los experimentos siguientes (medida su acumulación en el tejido), pero antes conviene dilucidar si su captación, medida a tiempos cortos es o no afectada por el suero. Se incubaron partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo de 16 días en un medio sin glucosa más 2,5 μ Ci de glucosa-¹⁴C en presencia o ausencia de suero. Las incubaciones se frenaron cada 15 segundos con PBS + glucosa fría y luego se siguieron las indicaciones de Materiales y Métodos para medición de captación de azúcares.

Los resultados se muestran en la Fig. 50. Puede observarse que la captación de glucosa-¹⁴C en partículas de lóbulo óptico en presencia de suero fetal bovino en el medio no sufre variaciones apreciables respecto a los valores control, sin suero.

Los experimentos con la 2-deoxiglucosa se muestran en la Fig. 51.

Se incubaron partículas de lóbulos ópticos de embrión de 19 días con

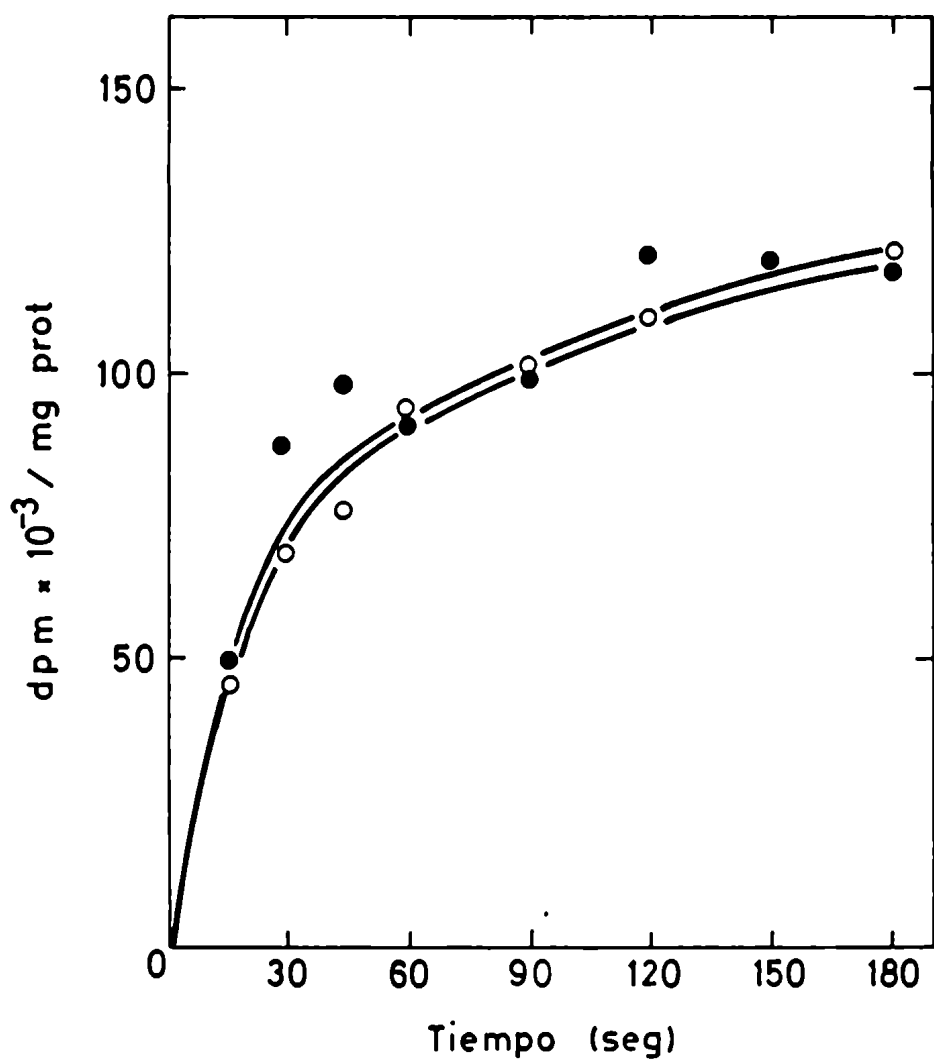


Figura 50. Captación de glucosa-¹⁴C en función del tiempo de incubación.

Se midió en partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 16 días en medio sin glucosa, salvo 2,5 μ Ci de glucosa-¹⁴C, sin suero (o) o con 20% de suero fetal bovino (●).

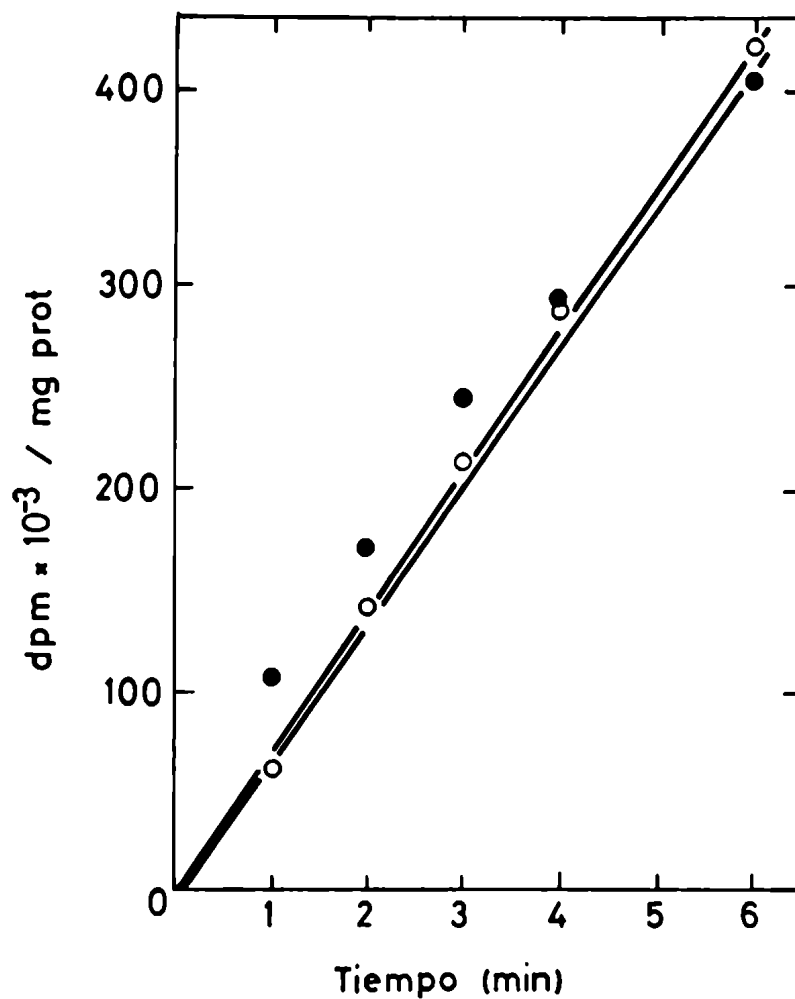


Figura 51. Captación de 2-deoxiglucosa-¹⁴C en lóbulo óptico de embrión de pollo de 19 días.

Se utilizó medio de incubación sin glucosa, con 5 μ Ci de deoxiglucosa-¹⁴C sin suero (o) o con 20% de suero fetal bovino (●).

5 uCi 2-deoxiglucosa- ^{14}C en presencia o ausencia de suero. Se frenaron las incubaciones con PBS + 2-deoxiglucosa fría (1 g/l) y se siguió el procesamiento indicado de Materiales y Métodos para la medición de captación de azúcares. Puede observarse que la cinética de captación de 2-deoxiglucosa- ^{14}C en lóbulo óptico es lineal durante los 6 minutos en que fue medida. No se encontraron diferencias en presencia de suero en el medio respecto a las incubaciones control (sin suero).

3.25. Modificaciones al método de la deoxiglucosa- ^{14}C para la medición de la utilización de glucosa

Con el objeto de medir la velocidad de utilización de glucosa en tejido nervioso se desarrolló el siguiente experimento que se basa en el uso de 2-deoxiglucosa- ^{14}C como un trazador de la fosforilación de la glucosa por la hexoquinasa en el tejido. El fundamento bioquímico del uso de este análogo de la glucosa se explicó en el experimento anterior.

Partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo de 18 días se incubaron con 2,5 μl DG- ^{14}C en presencia o ausencia de suero durante distintos tiempos hasta 90 minutos aproximadamente. A los tiempos indicados se frenaron las incubaciones y se precipitaron los ésteres fosfóricos como se indica en Materiales y Métodos para la acumulación de deoxiglucosa-6-fosfato- ^{14}C .

Los resultados se muestran en la Fig. 52. Puede observarse la cinética de acumulación de radioactividad en lóbulo óptico de embrión de pollo. La linealidad de los resultados obtenidos es comparable a la anteriormente descrita para utilización de glucosa (Fig. 18 C) medida mediante la técnica enzimática de glucosa oxidasa. Además, en la Fig. 52 se demuestra que no hay modificaciones en el consumo de glucosa en presencia de suero respecto a los valores control (sin suero).

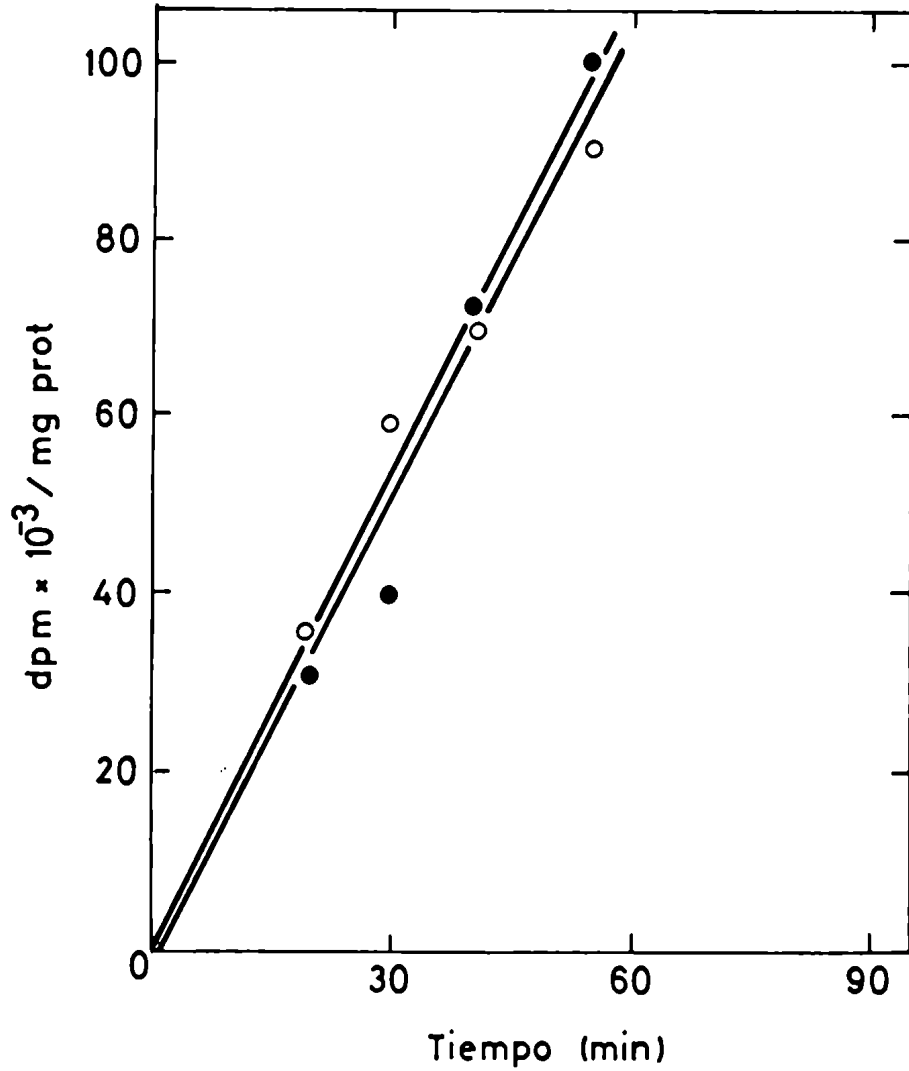


Figura 52. Acumulación de ^{14}C -deoxiglucosa-6-P en el tejido en función del tiempo de incubación.

Se utilizaron partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días en 50 μl de medio con 1 g/l de glucosa y 2,5 μl de deoxiglucosa- ^{14}C . Los detalles de las modificaciones al método Sokoloff se presentan en el texto. Se midió sin suero (o) y con 20% (v/v) de suero fetal bovino en el medio de incubación (●).

3.26. Efecto del suero en la utilización de glucosa en el lóbulo óptico de embriones de pollo de 6, 10 y 18 días.

Con el objeto de evaluar el consumo de glucosa durante el desarrollo embrionario del lóbulo óptico y su posible modificación por la presencia de suero, se midió el consumo de glucosa por el método de deoxiglucosa- ^{14}C . Se incubaron partículas de lóbulos ópticos de embriones de 6, 10 y 18 días en presencia de 20% de suero (v/v) en el medio de incubación durante distintos tiempos hasta 2 horas aproximadamente. El material incubado se procesa como se indica en Materiales y Métodos para medición de acumulación de deoxiglucosa-6-P.

Los resultados se muestran en la Fig. 53. Se observa que las cinéticas de acumulación de radioactividad no se modifican por la presencia de suero en el medio de incubación. Adicionalmente, se observa que dichas acumulaciones, indicadoras del consumo de glucosa, tienen valores similares durante las edades embrionarias estudiadas, siendo levemente mayores en los embriones de menor edad (6 días).

3.27. Medición "in vitro" de la actividad de la hexoquinasa de lóbulo óptico de pollo. Efecto del suero

Con el objeto de explorar si la disminución de la incorporación de Man- ^{3}H a proteínas en presencia de suero pudiera deberse a un efecto sobre la hexoquinasa, se procedió a determinar "in vitro" la actividad de esta enzima en ausencia y presencia de suero fetal bovino como se indica en Materiales y Métodos. Estas mediciones se efectuaron de dos maneras: a) precipitación directa del éster fosfórico y b) diferencia de la concentración de glucosa al tiempo inicial y al fin de la incubación. En el Esquema VI-B

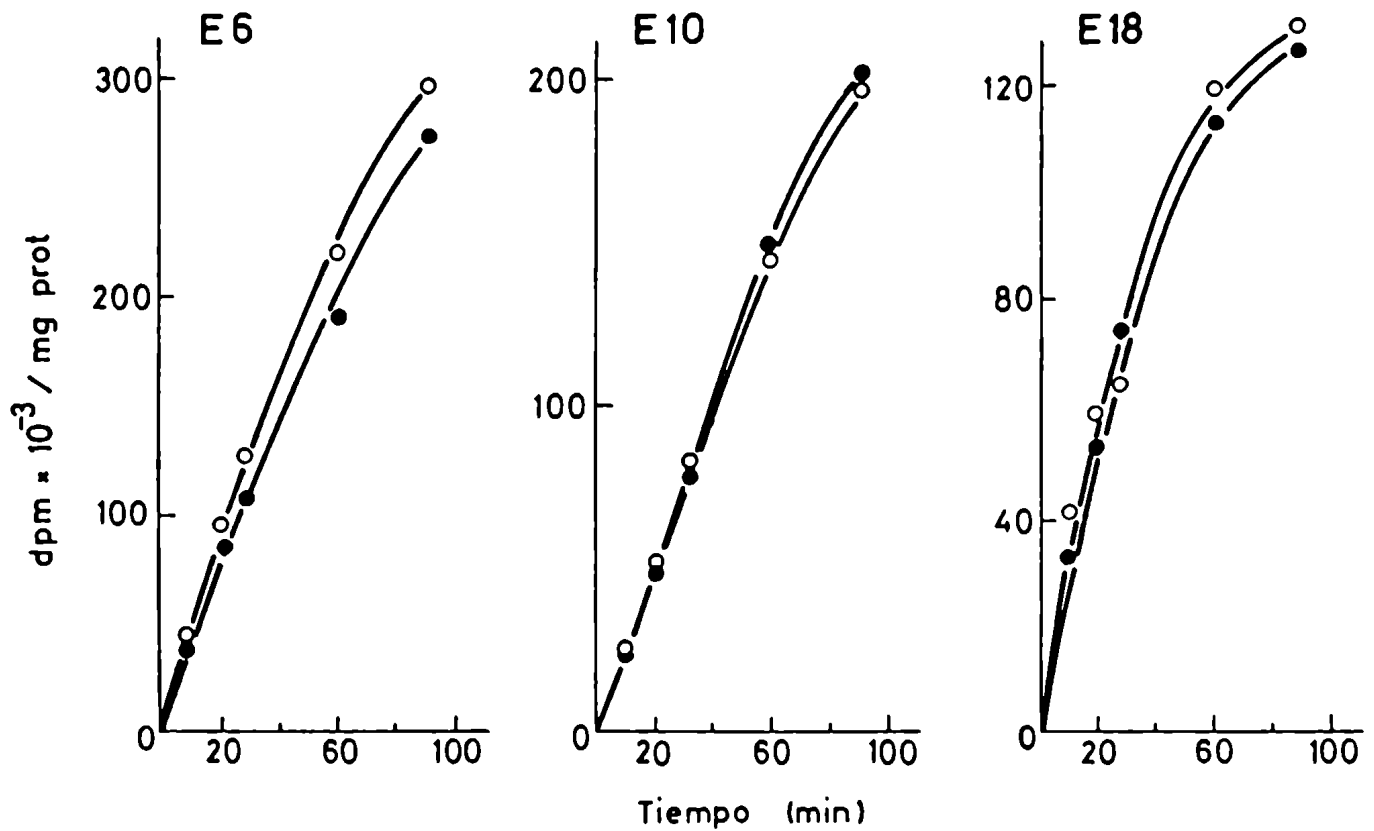


Figura 53. Consumo de glucosa medido por el método de ¹⁴C-deoxiglucosa en función del tiempo de incubación.

Se incubaron partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo de 6, 10 y 18 días, sin suero (o) y agregándole 20% (v/v) de suero fetal bovino al medio de incubación (●).

puede verse el diseño experimental.

En la Fig. 54-a se observa que cuando se utiliza homogenato como fuente de enzima la actividad de la hexoquinasa en presencia de suero es menor que en el control (sin suero). Esta diferencia se conserva aunque mucho menos marcada, cuando se utiliza la fracción soluble o el precipitado (hexoquinasa asociada a membranas). En estos experimentos la medición se efectuó directamente precipitando los ésteres fosfóricos.

Los mismos resultados se obtuvieron cuando se midió la actividad de esta enzima como diferencia del nivel de glucosa del medio de incubación (Fig. 54-b).

Además, se midió la actividad de la hexoquinasa de lóbulo óptico de pollo de 6 días "in vitro" a los 20, 40 y 60 minutos, utilizándose homogenato como fuente de enzima.

Los resultados calculados en forma indirecta midiendo la desaparición de glucosa-¹⁴C del medio se muestran en las Fig. 55. Se encontró que las curvas con y sin suero tienen un cruce alrededor de los 25-30 minutos de incubación. Por otro lado, las curvas no mantienen buena linealidad, lo que es más visible en el experimento con suero.

Cuando la actividad de la enzima se midió por el método directo (precipitación del éster fosfórico) el resultado que se obtiene fue el mismo.

Se efectuó además otra serie de experimentos midiendo la actividad de la hexoquinasa utilizando deoxiglucosa como sustrato. Los resultados se muestran en la Fig. 56. En todos los casos se midió acumulación de deoxiglucosa-6-P. Cuando se mide por diferencia del nivel de la deoxiglucosa del medio, el resultado que se obtiene es similar.

Si se comparan los resultados de todas las mediciones de hexoquinasa a partir del lóbulo óptico de pollo (Figs. 54, 55 y 56) se puede inferir que

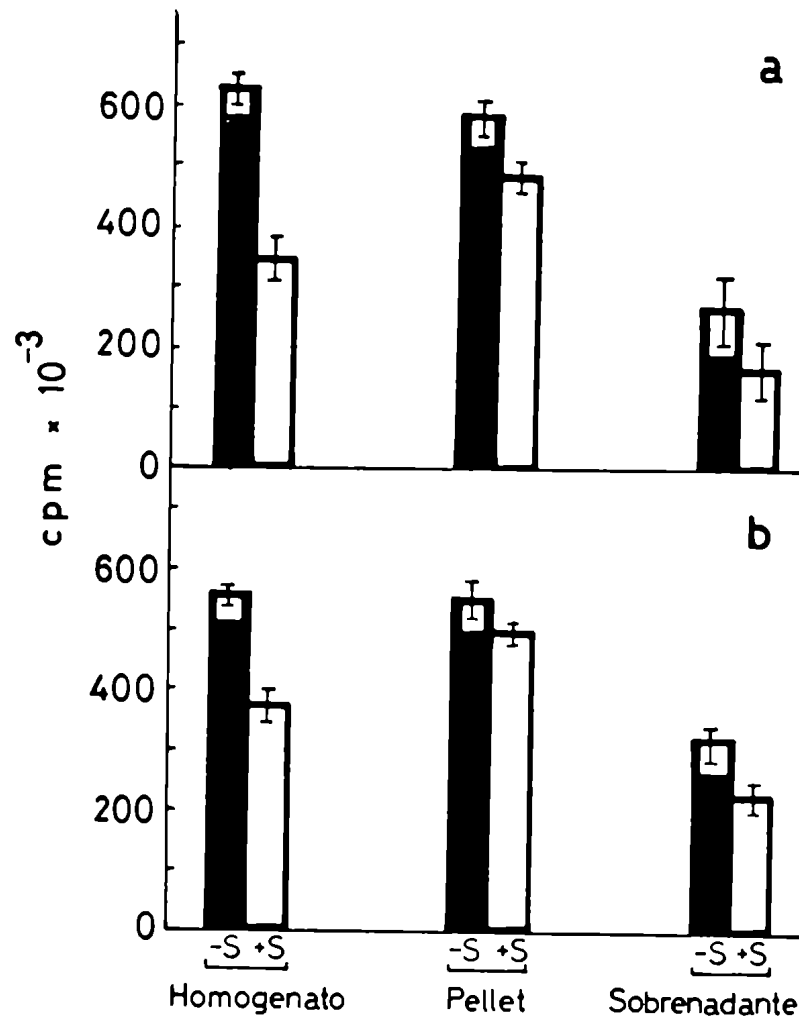


Figura 54. Medición "in vitro" de la actividad de hexoquinasa de lóbulo óptico de pollo.

Se utiliza como fuente de enzima el homogenato y las fracciones del sobrenadante y pellet de una centrifugación a 35.000 g por 30 minutos. Los detalles metodológicos figuran en Materiales y Métodos. Las mediciones se hacen sin suero (-S) y con 25% de suero fetal bovino agregado al medio (+S) e incubando durante 1 hora. Se grafican los ésteres fosfóricos precipitados en a y la diferencia entre ¹⁴C-glucosa inicial menos la remanente en el medio, en b.

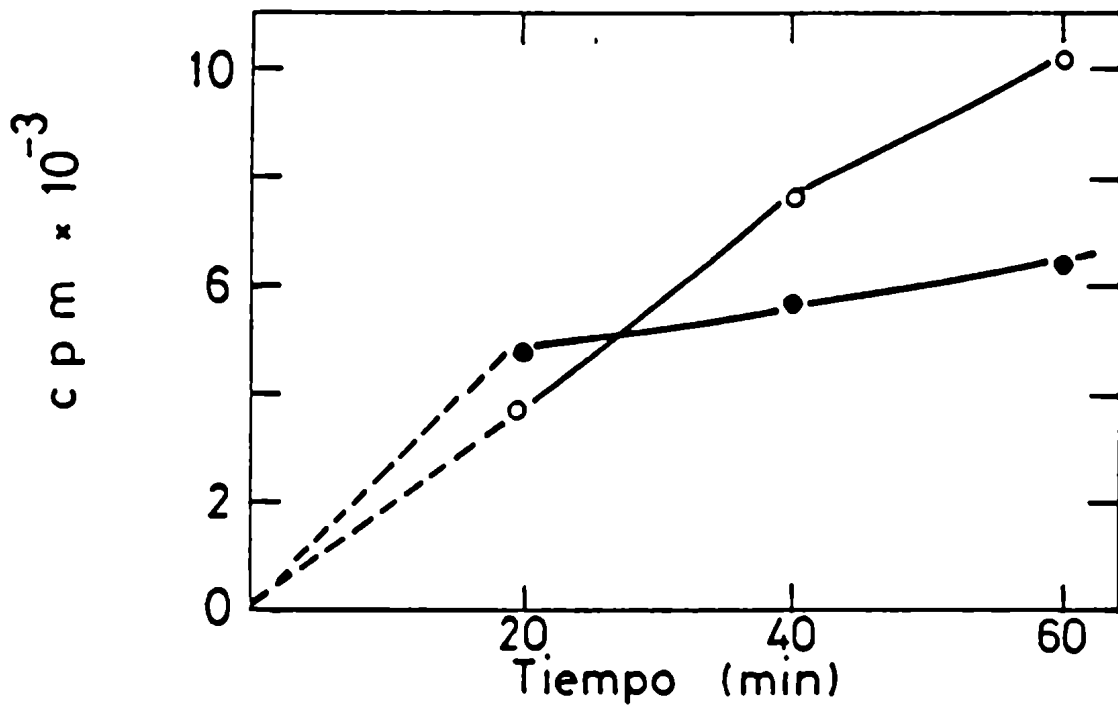


Figura 55. Medición "in vitro" de la actividad de la hexoquinasa de lóbulo óptico en función del tiempo de incubación. Se usó homogenato como fuente de enzima, ¹⁴C-glucosa, sin suero (o) y con 25% de suero fetal bovino en el medio (o).

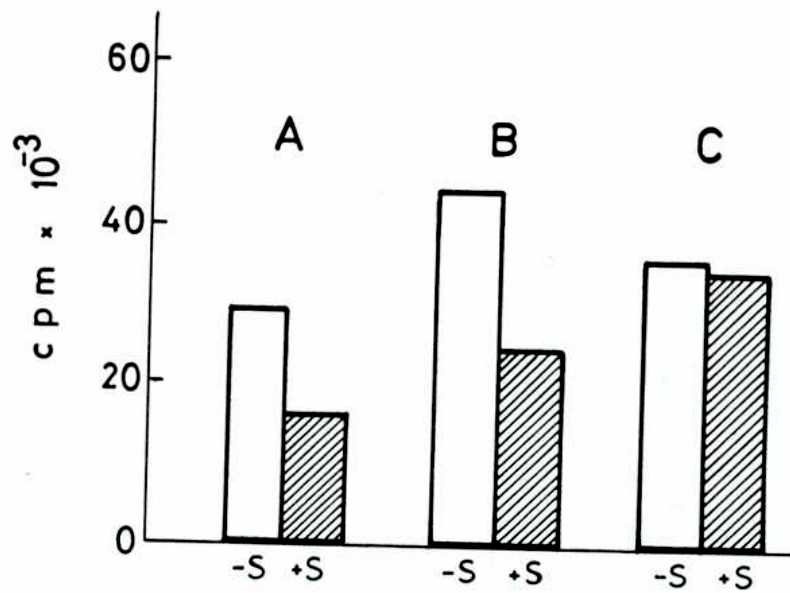


Figura 56. Mediciones de la enzima hexoquinasa de l6bulo 6ptico de pollo. Se midi6 la acumulaci6n de ¹⁴C-deoxiglucosa-6-P, utiliz6ndose homogenato como fuente de enzima, en presencia o ausencia de suero a distintos tiempos de incubaci6n: A. 1 min; B. 5 min y C. 40 min.

aparentemente el suero disminuye en forma leve su actividad.

El significado biológico de estos resultados es difícil de interpretar debido a las limitaciones que tiene este tipo de estudio "in vitro".

3.28. Medición de lípido-azúcares intermediarios del camino del dolicol en lóbulos ópticos de embrión de pollo de 18 días con suero en el medio de incubación

Con el objeto de profundizar el conocimiento del efecto que la presencia de suero en el medio de incubación produce sobre la incorporación de Man- 2^3H a proteínas, se realizó el siguiente experimento: partículas de lóbulo óptico de embriones de pollo de 18 días, se incubaron durante 2 horas como se indica en Materiales y Métodos ($2,2 \pm 0,2$ mg prot/cav, 100 μCi Man- 2^3H /cav y 500 μl medio/cav). Se usaron cajas Nunc de 16 cavidades, se incubaron 3 cavidades con suero 20% (v/v) en el medio y 3 controles, sin suero. Al finalizar la incubación el material se procesó para la obtención y análisis cromatográfico de oligosacáridos derivados de los lípido-azúcares intermediarios como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados se muestran en la Tabla V. Se observa una apreciable disminución de G₃: (GlcNAc)₂MangGlc₃ y de G₂: (GlcNAc)₂MangGlc₂ en presencia de suero con respecto al valor control, sin suero. Conviene destacar que esta disminución es similar a la observada en la incorporación de Man- 2^3H a proteína por efecto del suero.

Condiciones experimentales	Carbohidratos totales unidos al dolícol		G3 (a)		G2 (b)	
	dpm/mg prot.	% control	cpm	% control	cpm	% control
Control	5.553	100	673	100	288	100
+20% suero	2.912	52,4	369	54,8	247	85,7

(a) G3 = (GlcNAc)₂MangGlc₃
 (b) G2 = (GlcNAc)₂MangGlc₂

Tabla V. Medición de lípido-azúcares intermediarios del camino del dolícol en lóbulos ópticos de embrión de pollo de 18 días con suero en el medio de incubación.

Los valores numéricos se obtuvieron del análisis cromatográfico de los oligosacáridos.

3.29. Incorporación de Man-2³H a proteína en presencia de sueros de distintas especies

Con el fin de evaluar si el efecto inhibitor de la incorporación de tritio a proteínas se produce solamente en presencia de suero fetal bovino se diseñó el siguiente experimento. Partículas de lóbulos ópticos de pollo de 18 días se incubaron en medios que contenían igual proporción de sueros provenientes de distintas fuentes: caballo, vaca, embrión de pollo de 18 días, pollito de 7 días, ternero y humano. En todos los casos la concentración del suero en el medio fue del 20% (v/v). Las incubaciones se frenaron a las 2 horas. El material se procesó para la medición de incorporación de tritio a proteínas como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados de la Fig. 57 muestran que la disminución de la incorporación de Man-2³H a proteína es producida por todos los sueros testados, independientemente de su fuente de origen.

3.30. Tratamientos efectuados sobre el suero antes de su incubación

3.30.a. Calentamiento y variación del pH

Para evaluar los efectos del calentamiento, pH y una combinación de ambos sobre el suero, se realizaron los siguientes experimentos:

A. Calentamiento: Se fraccionó el suero fetal bovino y se procedió a calentarlo a distintas temperaturas, durante los tiempos indicados: 60°C-30 minutos, 80°C-10 minutos, 95°C-15 minutos, 95°C-45 minutos y 95°C-90 minutos y luego se centrifugó. B. Variación del pH: Distintas fracciones de suero se llevaron a pH 4,5 - pH 2,5 - pH 10 durante 12 horas y luego de centrifugarlo se neutralizó a pH 7,4 para su incubación. C. Combinación de calentamiento y variación de pH: Se hicieron las siguientes combinaciones: 60°C-30 minutos -

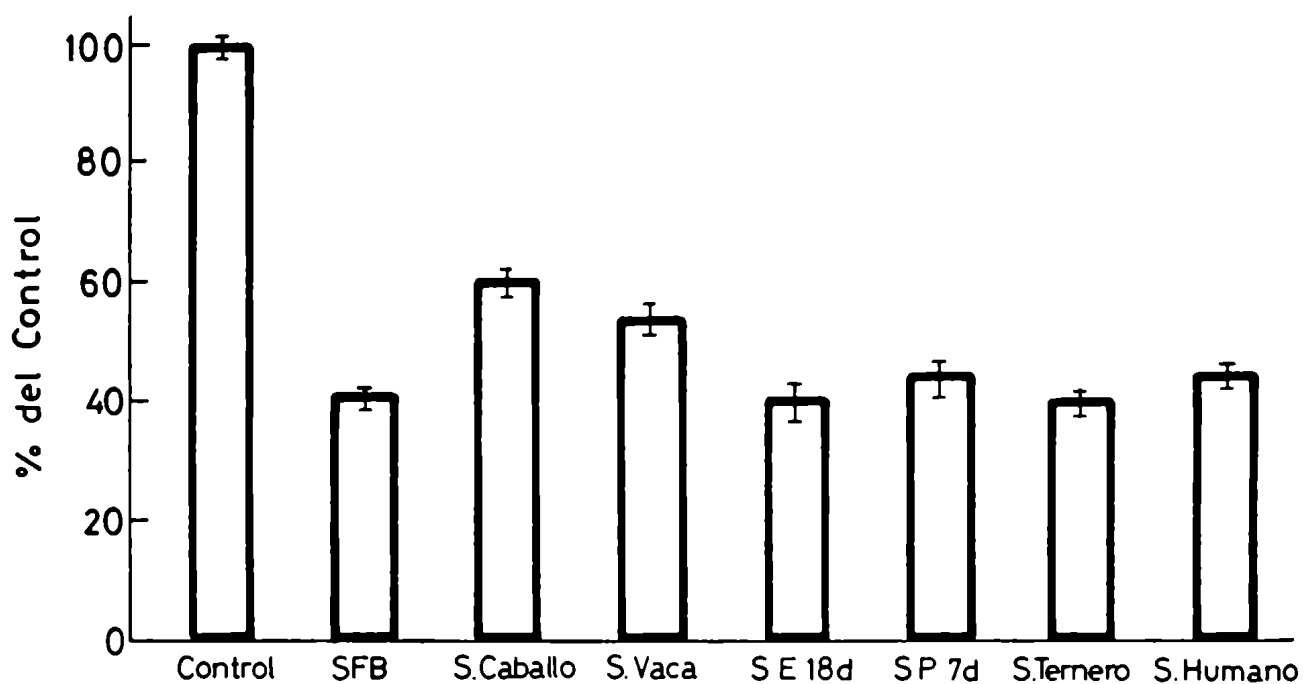


Figura 57. Incorporación de Man-2³H a proteínas en presencia de 20% de suero proveniente de distintas fuentes.

Se incubaron partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días en las condiciones explicadas en Materiales y Métodos.

pH 4,7; 80°C-10 minutos-pH 4,5; 95°C-15 minutos-pH 4,5; 95°C-45 minutos-pH 4,5 y 95°C-90 minutos-pH 4,5.

Partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo de 18 días se incubaron en condiciones estándar utilizando 20% suero (v/v) a los que se los trató con calentamiento, pH o ambos.

Se siguieron las indicaciones de Materiales y Métodos para la medición de radioactividad en proteínas. Las incubaciones se frenaron luego de 2 horas.

Los resultados se muestran en la Fig. 58 A, B y C. En A) puede observarse que el suero calentado en las distintas condiciones no produce variación respecto al control (sin calentar). En la Fig. 58 B se observa que el tratamiento de pH no altera los resultados.

En la Fig. 58 C se muestran las combinaciones de calentamiento y pH. No se producen variaciones con respecto a la disminución en la incorporación de radioactividad por la presencia del suero en el medio de incubación.

Estos resultados son bastante sorprendentes y se van a discutir en la sección siguiente.

3.30.b. Dializado

Con el objeto de evaluar el efecto de dializar el suero y comprobar si el efecto inhibitorio de la incorporación de Man-2³H a proteínas se mantiene se realizaron los siguientes experimentos: se dializó durante 24 hs el suero fetal bovino para lo cual se colocó 1 ml en bolsita para diálisis con "cut-off" en 1, 3,5, 8 y 12 kD y se utilizó agua o ClNa 0,15 M con numerosos cambios de 2 litros del líquido y agitación continua. También se testó el suero fetal bovino dializado comercial (Gibco). Siempre se utilizó 20% (v/v) de suero en el medio de incubación. Partículas de lóbulos ópticos de

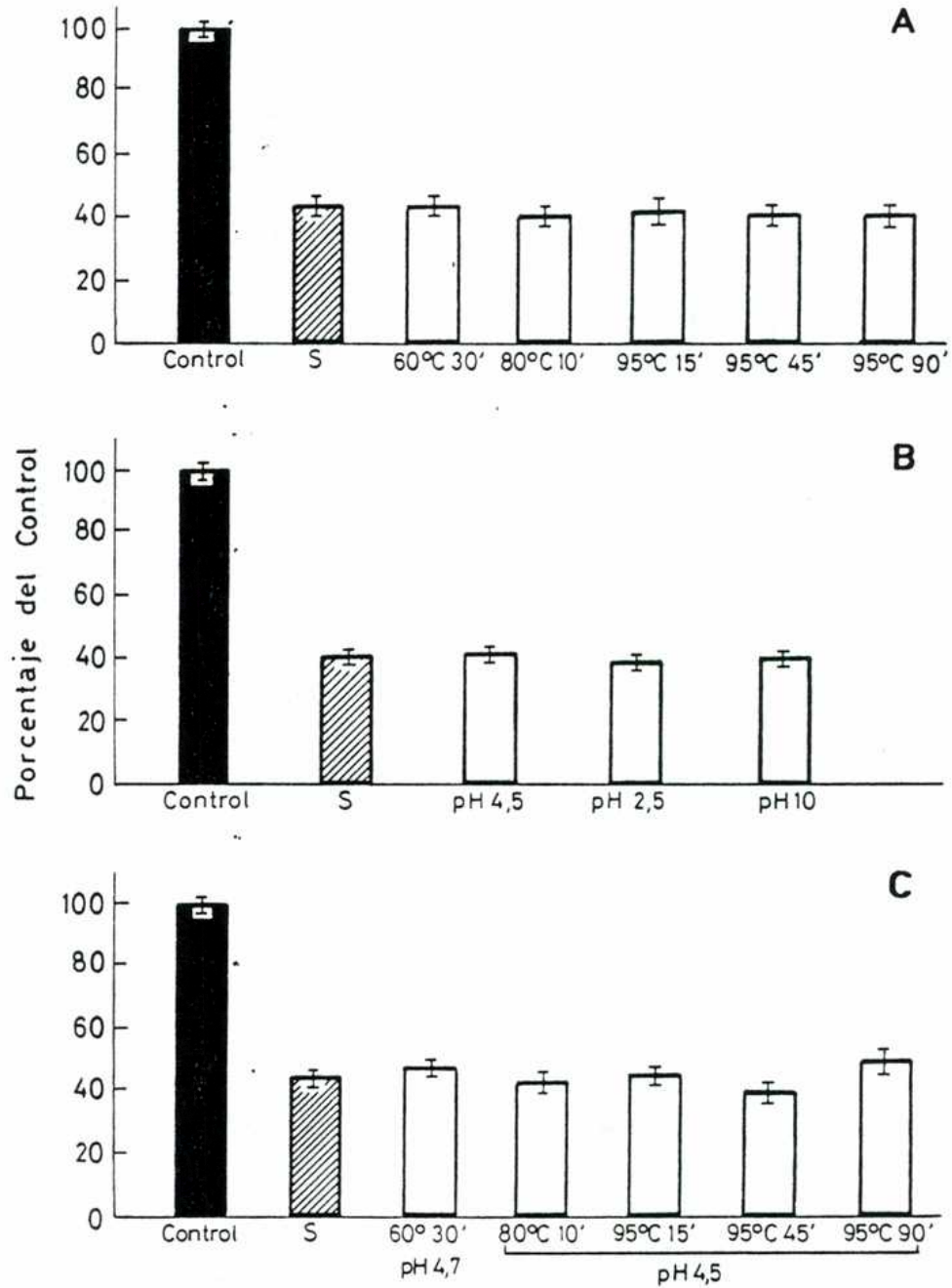


Figura 58. Tratamientos efectuados sobre el suero antes de su incubación con partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días. A. Calentamientos. B. Variación del pH y c. Combinación de calentamiento y variación de pH. Se mide incorporación de Man- 2^3H a proteínas en presencia de 20% del suero tratado o sin suero, control.

embriones de pollo de 18 días se incubaron en condiciones estándar durante 2 horas. El material se procesó como se indica en Materiales y Métodos.

Los resultados se observan en la Fig. 59-a, donde se observa que no hay alteración en el efecto inhibitor producido por el suero sobre la incorporación de ^3H a proteína cuando el suero previamente es dializado con "cut-off" de 1, 3,5 y 8 kD. Sin embargo, al dializar con "cut-off" de 12 kD, la inhibición fue menor.

3.30.c. Ultrafiltrado

Con el fin de conocer el efecto de la fracción ultrafiltrada del suero en la incorporación de $\text{Man}2^3\text{H}$ a proteínas se diseñó el siguiente experimento: se utilizaron filtros de Amicon "cut-off" 30 y 10 kD y se midieron tanto el efecto del filtrado como el del concentrado en las incubaciones. La concentración de suero agregado al medio siempre fue de 20% (v/v).

Partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo de 18 días se incubaron bajo condiciones estándar durante 2 horas. Los experimentos se hicieron por triplicado. El material se procesó como se indica en Materiales y Métodos para medir radioactividad en proteínas y proteína incubada.

Los resultados que se presentan en la Fig. 59-b muestran que tanto los concentrados como los filtrados ("cut-off" 30 y 10 kD) inhiben la incorporación de radioactividad a proteína en la misma proporción del suero que se incluye en el histograma como control.

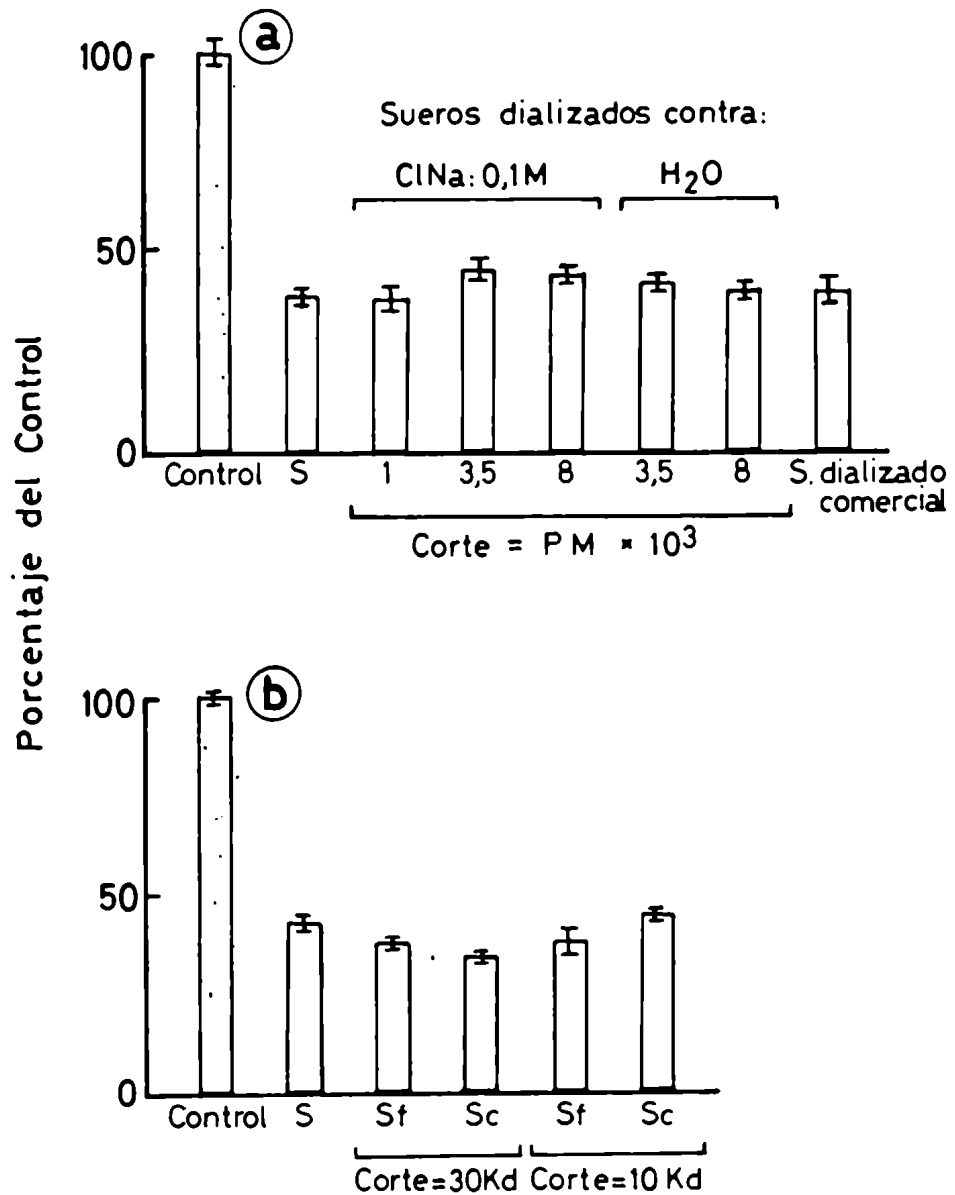


Figura 59. Tratamientos realizados al suero fetal bovino previos a su incubación con partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días.

Se grafica en cada caso el porcentaje del control (sin suero).

a. Suero dializado y b. suero ultrafiltrado. Se dan detalles de estos tratamientos en Resultados.

Sf= suero filtrado y Sc= suero concentrado.

3.31. Caracterización del suero ultrafiltrado ("cut-off" PM=10 kD)

3.31.a. Incorporación de Leu-4,5³H a proteínas

Para verificar si el pequeño efecto del suero en la incorporación de Leu-4,5³H a proteína se mantiene con preparaciones más purificadas y concentradas se diseñó el siguiente experimento: partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo de 18 días se incubaron en presencia de 20% (v/v) de suero ultrafiltrado (Amicon "cut-off" 10 kD) en condiciones estándar durante 3 horas. El material se procesó como se indica en Materiales y Métodos para incorporación de tritio a proteínas.

El resultado que se grafica en la Fig. 60 muestra que el suero ultrafiltrado disminuye en forma apreciable la incorporación de Leu-4,5³H a proteína. Se magnifica así la pequeña inhibición mostrada por el suero sin tratar (Fig. 32).

3.31.b. Variación del pH y calentamiento

Con el objeto de evaluar el efecto del tratamiento (pH y temperatura) del suero ultrafiltrado con Amicon de "cut-off"=10 kD sobre la incorporación de Man-2³H a proteína se diseñó el siguiente experimento: partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo de 18 días se incubaron durante 2 horas con Man-2³H y en presencia o ausencia de suero tratado como se indicará a continuación. Distintas alícuotas del suero ultrafiltrado fueron tratadas con calentamiento a 80° durante 10 min, calentamiento a 60° durante 30 min y el mismo procedimiento pero a pH 4,7. Además se llevó durante un día el pH del suero ultrafiltrado a 2,5 ó a 10 para luego neutralizarlo para ser agregado en el medio de incubación. Se procesó el material como se indica en Materiales y Métodos para la medición de radioactividad en proteínas. Los

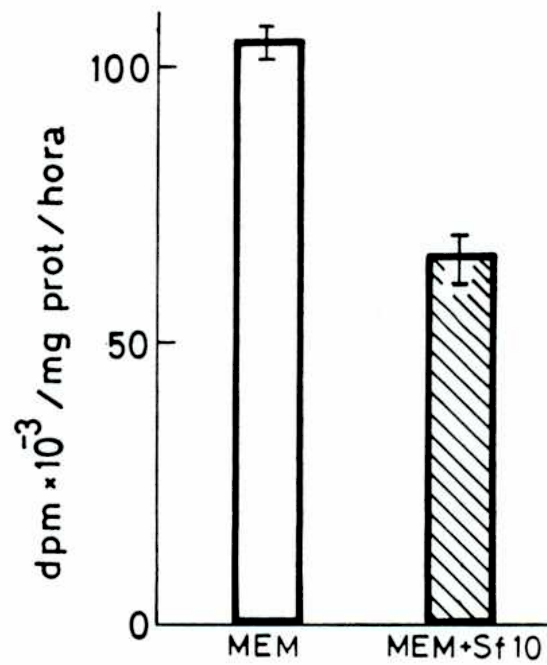


Figura 60. Velocidad relativa de incorporación de Leu-4,5³H a proteínas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días.

MEM= Medio sin suero; MEM + SF10= En presencia de 20% de suero ultrafiltrado ("cut-off"= 10 kD). El tiempo de incubación fue de 3 horas.

resultados de la Fig. 61 muestran que el suero ultrafiltrado no es afectado por las variaciones del pH y del calentamiento en cuanto a su efecto sobre la incorporación de Man- 2^3H a proteína. Estos resultados son semejantes a los obtenidos con el suero total.

3.31.c. Preincubación del suero con quimotripsina y tripsina

Con el fin de establecer el efecto que produce la incubación con quimotripsina y tripsina del suero fetal bovino previo a su agregado al medio de incubación, se diseñó el siguiente experimento: se digirieron las proteínas del suero con tripsina o quimotripsina; luego se inhibieron dichas enzimas como se explica en Materiales y Métodos y posteriormente se procedió a agregarlos en el medio de incubación: 20% (v/v). Partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo se incubaron con Man- 2^3H durante 2 horas. El material se procesó como se indica en Materiales y Métodos para la medición de incorporación de radioactividad a proteínas.

Los resultados se muestran en la Fig. 62. Se incluyeron los efectos de los inhibidores de las enzimas como control agregados en forma individual. Se observa que tanto la preincubación del suero con tripsina como quimotripsina evitan la inhibición de la incorporación de Man- 2^3H a proteína mientras que los inhibidores solos no tienen ningún efecto. Esto sugiere que la inhibición del suero es producida por un factor de naturaleza proteica.

3.32. Intercambio iónico en columna de FPLC (mono Q) del suero ultrafiltrado

Con el objeto de purificar el factor sérico que está en la fracción ultrafiltrada (filtro de Amicon "cut-off" en PM=10 kD), se pasó dicha fracción por la columna mono Q de FPLC. Se utilizó como eluyente A: Tris-HCl 50 mM pH 7,6 y B: Tris-HCl 50 mM con un gradiente superpuesto de 1 M ClNa, de 0

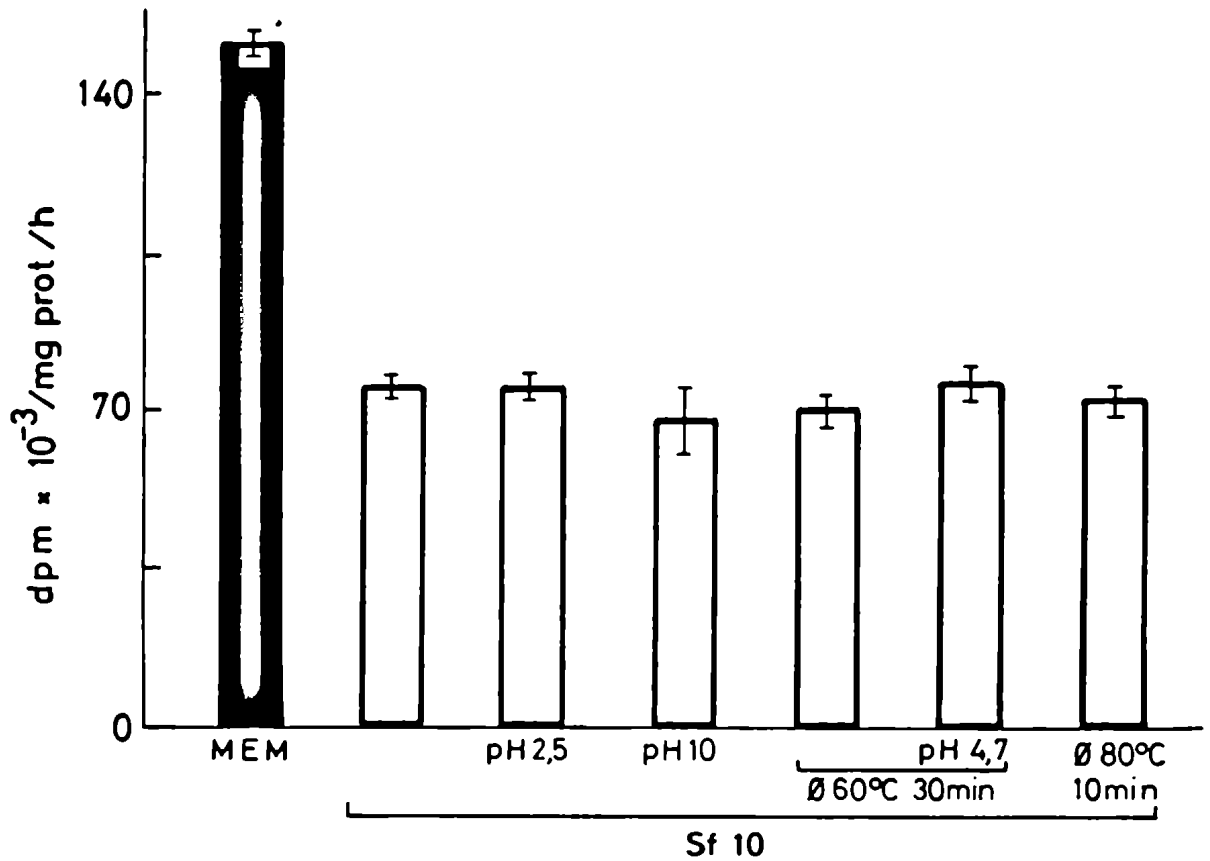


Figura 61. Tratamientos efectuados al suero fetal bovino ultrafiltrado por filtro de "cut-off" 10 kD. Se midieron efectos de variación de pH, calentamientos y tratamiento combinado sobre la velocidad de incorporación de Man-²³H a proteínas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días.

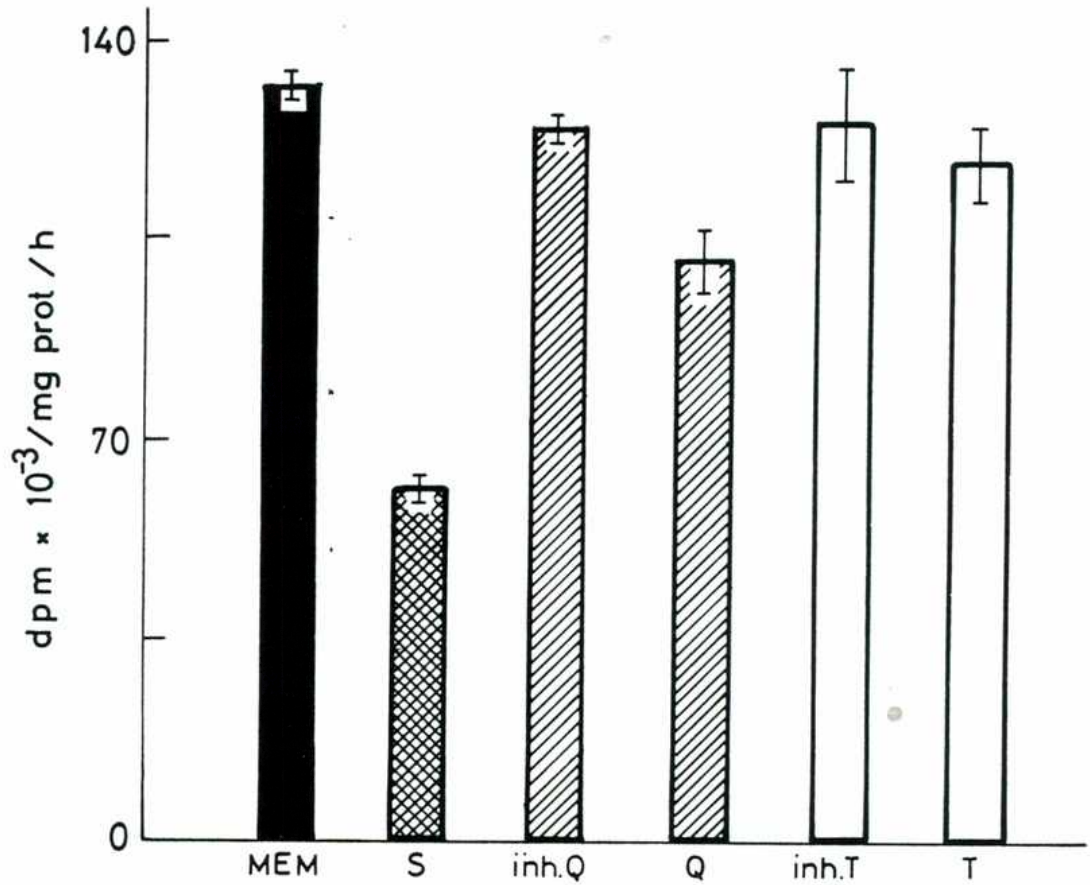


Figura 62. Efecto de la digestión de las proteínas del suero sobre la velocidad de incorporación de Man-²³H a proteínas del lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días.

Se utilizó Q= quimotripsina, inh. Q= inhibidor de quimotripsina, T= tripsina e inh. T= inhibidor de tripsina, S= suero.

a 50%. Se tomaron fracciones de 1 ml. En la Fig. 63 A se muestra el perfil de absorvancia a 280 nm de cada fracción. En la Fig. 63 B se separaron las fracciones A, B, C y D que corresponden a:

A: alícuotas de los tubos 1, 3, 5, 7 y 9.

B: 11, 12, 13, 14 y 15.

C: 17, 18, 19, 20 y 21.

D: 22, 23, 24, 25 y 26 (dializadas contra agua).

Se formó un "pool" de las alícuotas de los tubos indicados y se agregaron en proporción de 20% (v/v) al medio de incubación de partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo de 18 días incubados con Man-2³H. Se agregan los controles de medio con 20% de suero ultrafiltrado y de MEM solo. Puede observarse que el grupo D es el que inhibe más la incorporación de radioactividad a proteínas.

3.33. Esquema de purificación

El objeto del tratamiento del suero ultrafiltrado (pasaje por columna Mono Q - FPLC) ha sido concentrar el factor deseado y a la vez conseguir eliminar las otras proteínas, hormonas, sales, etc., que se encuentran en el suero.

En la Tabla VI se muestra el esquema de purificación obtenido luego del ultrafiltrado del suero con filtro Amicon ("cut-off"=10 kD) y pasaje por cromatografía de intercambio iónico. En cada paso se utilizó como unidad de comparación, el efecto de inhibir un 60% la incorporación de Man-2³H a proteína en función de la cantidad de proteína del suero necesaria para producir el mismo efecto.

Se observa que el ultrafiltrado ("cut-off"=10 kD) purifica 42 veces mientras que la columna de intercambio iónico, 8.400 veces.

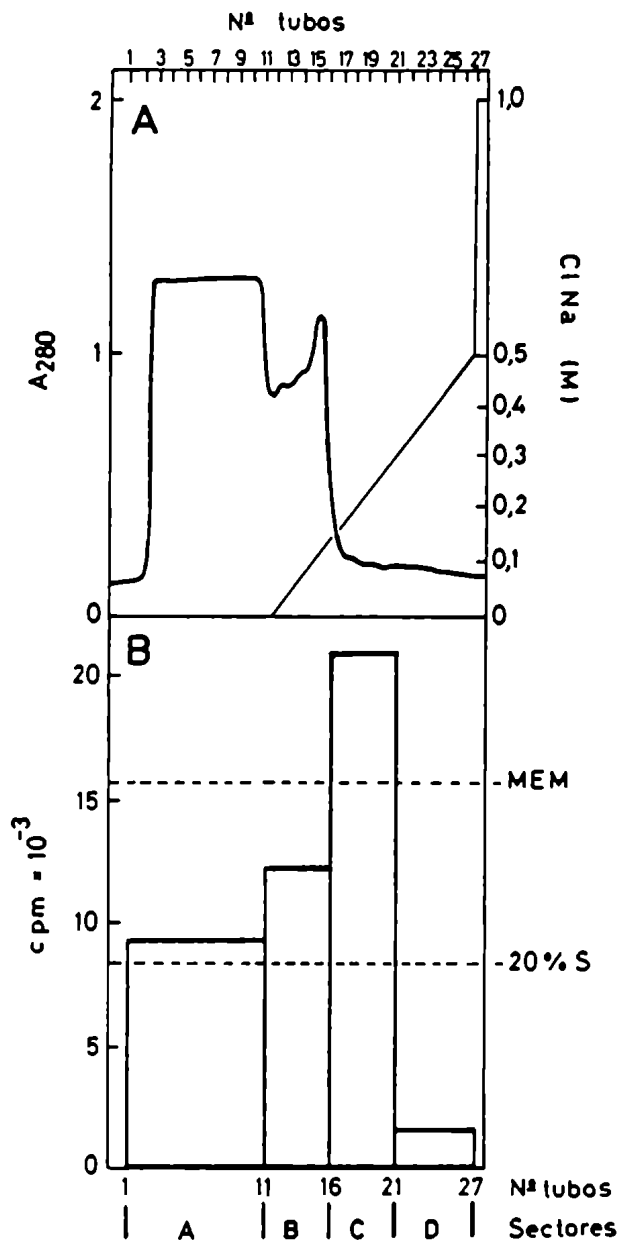


Figura 63. Columna de intercambio iónico (MonoQ) por FPLC del suero ultrafiltrado.

A. Perfil de A²⁸⁰.

B. Incorporación de Man-2³H a proteínas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días en función del agregado de 20% (v/v) en el medio de incubación de alícuotas del eluido de la columna Mono Q.

Se incluye la incorporación de Man-2³H del medio solo y con el agregado de 20% de suero ultrafiltrado como controles (línea de trazos).

Condición experimental	ug prot. por ensayo(a)	Purificación
Suero total	525	1
Suero ultra-filtrado	12,5	42
FPLC (fracción D)	0,0625	8.400

Tabla VI. Esquema de purificación de los factores proteicos del suero que producen los efectos estudiados en SNC.

(a) La unidad de comparación utilizada ha sido inhibir un 60% la incorporación de Man-2³H a proteínas en función de la cantidad de proteínas de cada fracción necesaria para producir dicho efecto.

3.34. Gel desnaturizante de la fracción inhibitoria de la columna de intercambio iónico

Para conocer la cantidad de proteínas presentes en la fracción D dializada de la columna de intercambio iónico se realizó un gel de acrilamida-poliacrilamida desnaturizante (Fig. 64). En carriles paralelos del gel se corrieron muestras de suero fetal bovino sin tratar y de estándares de peso molecular (97,4, 66, 45, 29, 20,1, y 14,2 kD).

Puede observarse que se obtuvieron unas proteínas de peso molecular aparente de aproximadamente 14 kD, otra de 60 kD y otra de 66 kD, lo que indica que se ha conseguido purificar apreciablemente el factor proteico responsable de la inhibición, aunque no a homogeneidad.

3.35. Efecto del suero ultrafiltrado ("cut-off" 10 kD) sobre la fosforilación de proteínas "in vivo"

Con el objeto de evaluar el posible efecto del suero sobre la fosforilación de proteínas, se diseñó el siguiente experimento: partículas de lóbulos ópticos de embriones de pollo de 18 días se ensayaron para medir la incorporación de ^{32}P total a las mismas, como se indica en Materiales y Métodos.

En la Tabla VII, 1, puede observarse un aumento de 5 veces, en la captación de ^{32}P que se produce en presencia de 20% (v/v) de suero ultrafiltrado en el medio de incubación.

Cuando se investigó cuál era la radioactividad asociada al material precipitable por TCA caliente (Tabla VII, 2), se encontró que el suero produce un aumento en los niveles de incorporación de fosfato. Para estudiar si este aumento podía estar a nivel de proteínas específicas, el lisado de

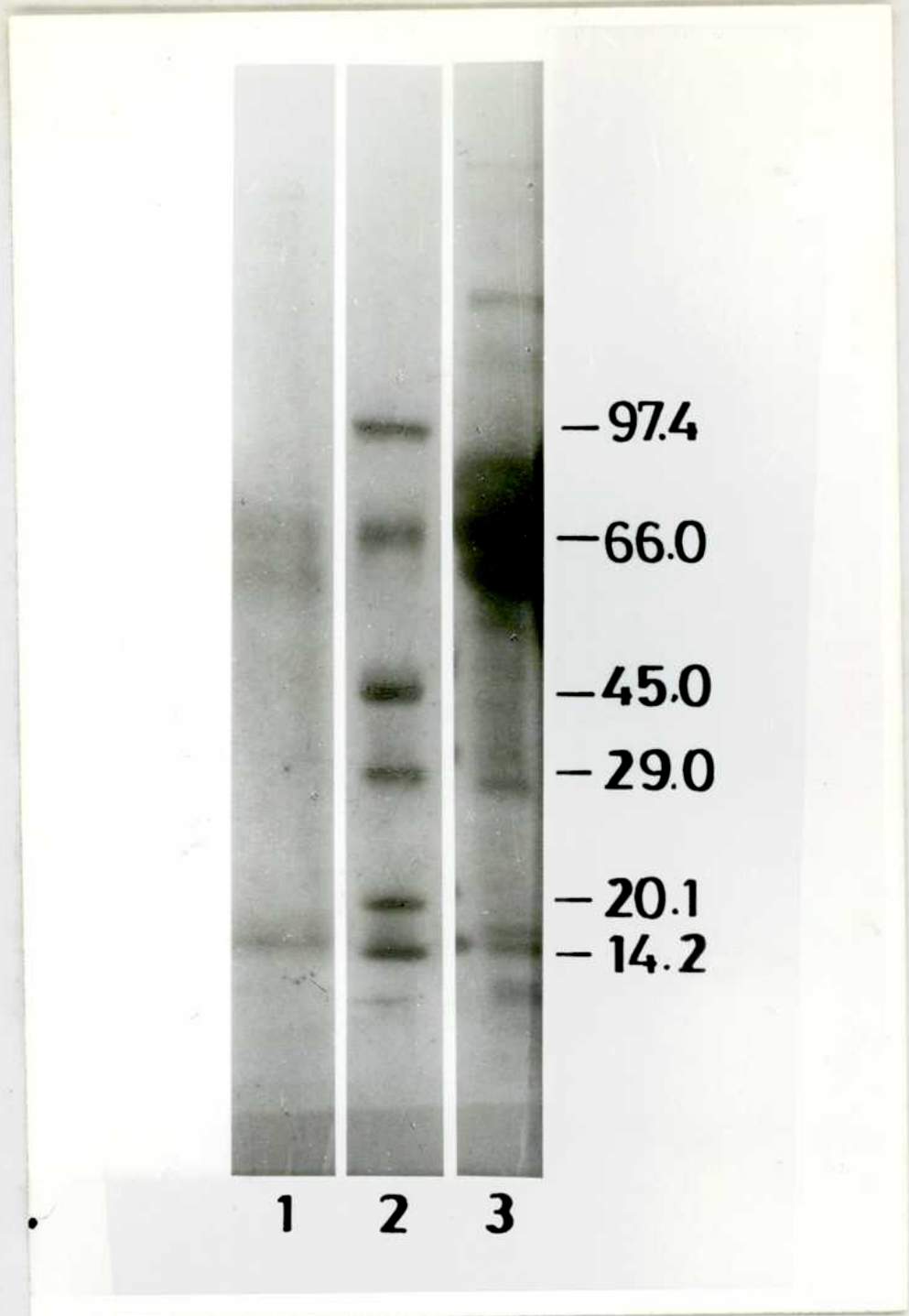


Figura 64. Calle 1. Gel desnaturalizante de la fracción D de la columna de intercambio iónico con efectos inhibitorios sobre la incorporación de Man- 2^3H a glicoproteínas de lóbulo óptico de pollo.
Calle 2. Estándares de peso molecular.
Calle 3. Suero fetal bovino.

Condiciones experimentales	1. Captación de ^{32}P	2. Incorporación de ^{32}P a TCA
	dpmx10 ⁻³ /mg prot/h	dpmx10 ⁻³ /mg prot/h
Sin suero	291	33
+20% suero	1.499	141

Tabla VII. Efecto del suero ultrafiltrado ("cut-off" 10 kD) sobre la fosforilación de proteínas "in vivo".

1. Captación de ^{32}P .

2. Incorporación de ^{32}P al material macromolecular precipitable por TCA caliente.

partículas fue sometido a una electroforesis en gel de poliacrilamida. El gel mostró (Fig. 65) que no hay aparentemente diferencias cuantitativas en las proteínas fosforiladas en presencia o ausencia de suero. Conviene aclarar que en los carriles C y D se sembró aproximadamente la misma radioactividad.

3.36. Efecto del suero sobre la liberación de glicoproteínas al medio

3.36.a. Marcación con Man-2³H

Para evaluar si el tejido nervioso, en presencia de suero en el medio de incubación, libera mayor cantidad de glicoproteínas recién sintetizadas, se diseñó el siguiente experimento: partículas de lóbulos ópticos de embrión de pollo de 17 días se incubaron durante 21 hs con 30, μ Ci de Man-2³H y 500, μ l de MEM en cada cavidad. Se agregó 20% (v/v) de suero fetal bovino. Cada experimento se hizo por triplicado.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se pasó el particulado junto con el medio a un tubo Eppendorf. Luego de centrifugar en la microfuge se separan el precipitado y el sobrenadante. Al precipitado se lo procesó como se indica en Materiales y Métodos para medición de incorporación de radioactividad a proteínas. Como se muestra en la Tabla VIII-1, se encontró el resultado esperado: marcada disminución en la incorporación de Man-2³H a proteínas de las partículas incubadas (intracelular).

En la centrifugación inicial de las partículas incubadas se obtuvo un sobrenadante, se lo procesó de la siguiente manera: se lo separó en dos partes, una de 50 μ l y otra de aproximadamente 450 μ l que se guardó para un estudio ulterior. A los 50 μ l se les agregó como "carrier" proteínas de lóbulo óptico (500 μ g) y manosa fría (una punta de espátula) y 500, μ l de TCA 25%, se lo calentó a 90°C durante 20 minutos. El resto del procesamiento se indica en Materiales y Métodos para medición de radioactividad en proteínas. Como puede observarse en la Tabla VIII-1, se encontró 3,6 veces mayor can-

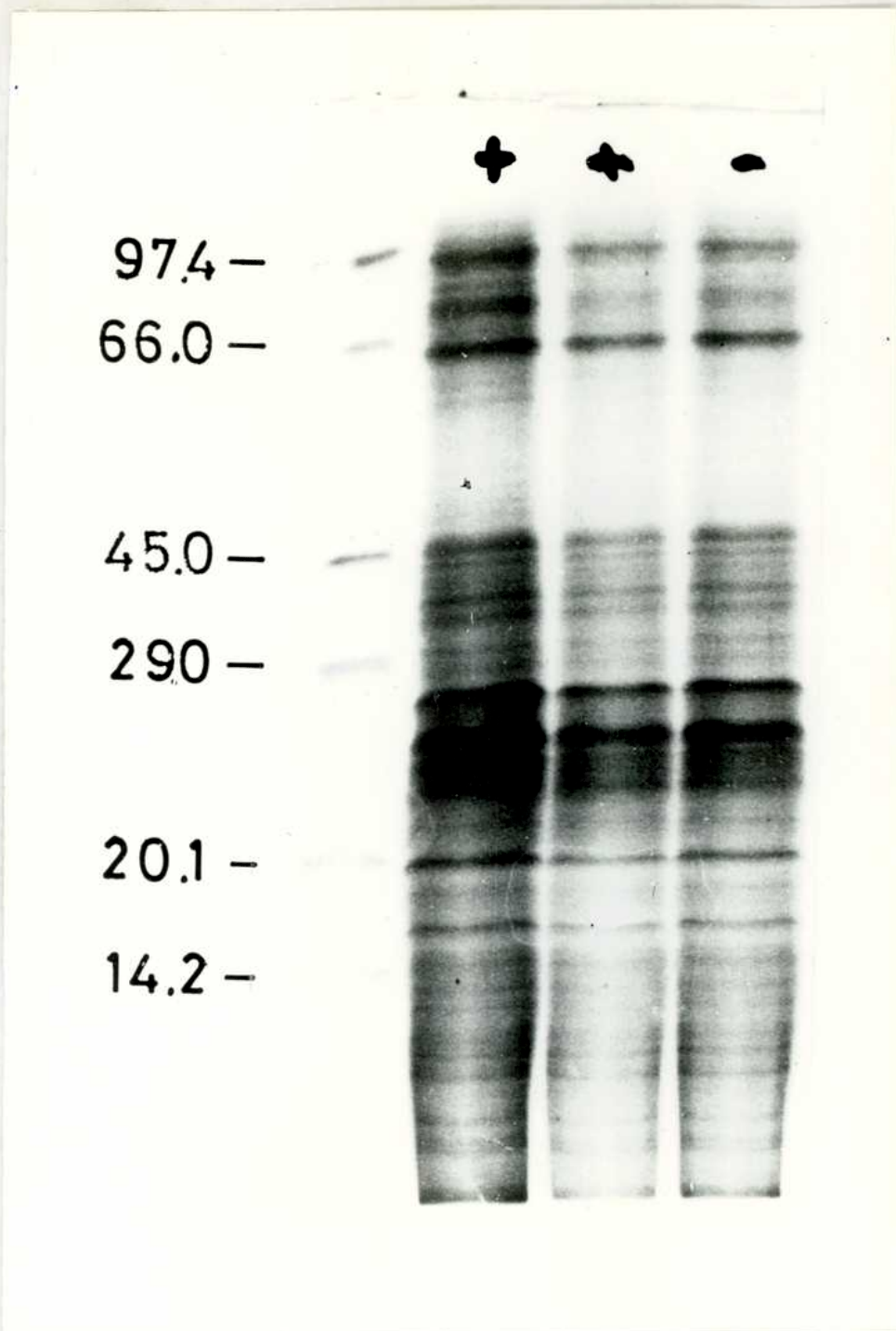


Figura 65. Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida de ^{32}P -proteínas de lóbulo óptico de pollo.

Carril A. Estándares de peso molecular.

Carriles B y C. Incorporación de ^{32}P a proteínas en presencia de suero fetal bovino en la incubación (se sembró el gel, carril B, tres veces más material que en el carril C).

Carril D. Control: incorporación de ^{32}P a proteínas sin suero en el medio de incubación.

tividad de Man- 2^3H asociada al material TCA insoluble extracelular cuando se midió el medio de incubación que contenía 20% (v/v) de suero, que el control, sin suero, luego de 21 hs de incubación con partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 17 días.

3.36.b. Marcación con Leu 4,5 ^3H

Con la finalidad de estudiar si el suero produce una liberación de proteínas recientemente sintetizadas se diseñó el siguiente experimento: se incubaron partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 17 días con 25 μl de Leu 4,5 ^3H durante 21 hs siguiendo las indicaciones de Materiales y Métodos (ver 3.8.) para las incubaciones prolongadas. Se midió la radioactividad incorporada al particulado y también la asociada al material TCA caliente insoluble del medio de incubación, al final de las 21 hs de incubación del tejido.

Los resultados se muestran en la Tabla VIII-2. Puede observarse que las proteínas que se liberan al medio en presencia de suero tienen 2,9 veces mayor radioactividad que las del control, sin suero.

3.37. Incorporación de radioactividad a proteínas totales (intra y extracelulares)

Con el fin de evaluar si el suero afecta la cantidad de radioactividad total asociada al material TCA caliente insoluble se procedió de la siguiente manera: se sumó la marca incorporada a proteínas en el tejido más las proteínas liberadas al medio, tanto si la incubación se hizo en presencia o ausencia de suero fetal bovino. Se va a estudiar este problema con la marcación en Man- 2^3H y en Leu 4,5 ^3H .

Condiciones experimentales		Intracelular		Extracelular		Total	
		cpm	%	cpm	%	cpm	%
1.	Sin suero	130.146	91	12.650	9	142.796	100
	+20% suero	51.793	53	46.360	47	98.153	100
2.	Sin suero	267.871	82	59.960	18	327.831	100
	+20% suero	111.066	40	166.740	60	277.806	100

Tabla VIII. Incorporación de radioactividad a proteínas totales. Efecto del suero.

1. A partir de Man-2³H.

2. A partir de Leu-4,5³H.

3.37.a. A partir de Man-2³H

Se tomaron los datos de 3.39. que se muestran en la Tabla VIII-1. Puede observarse que el porcentaje de marca en las proteínas intracelulares pasa de ser el 91% del total en el control (sin suero) al 53% en presencia de suero. Hay una mayor proporción de radioactividad en las glicoproteínas extracelulares en el medio cuando se incuba en presencia de suero. Es de hacer notar que mientras sin suero las glicoproteínas radioactivas son principalmente intracelulares, en presencia de suero la distribución de la marca es aproximadamente igual (glicoproteínas intra y extracelulares).

3.37.b. A partir de Leu 4,5³H

Se confeccionó la Tabla VIII-2, a partir de los datos de 3.40.1. Puede observarse que haciendo la marcación con Leu 4,5³H, al igual que con Man-2³H, existe una distribución de la marca distinta en las proteínas intracelulares y las del medio en presencia y ausencia de suero.

4. DISCUSION

En este trabajo se ha encarado el estudio de la regulación de la glicosilación de proteína en tejido nervioso de pollo. Se ha usado el lóbulo óptico como sistema modelo debido a que desde el punto de vista de su fisiología es un tejido relativamente sencillo, ya que la mayoría de las aferencias nerviosas vienen de la retina, habiendo sido ampliamente estudiado en qué momento del desarrollo se forman las conexiones neuronales. Además, morfológicamente, es fácil de disecar. Esto ha permitido poder interpretar mejor los resultados obtenidos con animales de distintas edades.

Durante el transcurso de estos estudios, buscando reguladores exógenos del proceso de glicosilación, se encontró un novedoso efecto del suero. Este disminuye marcadamente la incorporación de manosa tritiada a proteína mientras que influye poco en la síntesis de proteína. Como se va a discutir más adelante, lo más llamativo de este efecto es que parece ser específico del sistema nervioso y que el tejido embrionario responde en forma distinta según la edad. Además el factor responsable es una proteína presente en los sueros de todas las especies estudiadas, resistiendo tratamientos bastante drásticos de pH y calentamiento.

Para un mejor ordenamiento de la discusión de los hallazgos presentados en esta Tesis, se los analizará en las siguientes secciones.

4.1. Síntesis y regulación de glicoproteínas en el lóbulo óptico de pollo durante el desarrollo

Aunque el lóbulo óptico de embrión de pollo es una estructura muy estudiada hasta el presente, no se han hecho mediciones de la glicosilación de proteínas durante su desarrollo, y tampoco estudios sobre su regulación. Previamente a esos estudios, en esta Tesis, se han efectuado mediciones de algunos parámetros básicos, como la velocidad de crecimiento del lóbulo óp-

tico. Los resultados que se grafican en la Fig. 12 muestran que la velocidad de crecimiento es alta cuando transcurre la etapa de proliferación celular (lóbulo óptico del embrión de 6 días: L0-E6). En la etapa de migración celular L0-E10 es baja. En el período que coincide con la formación de las 5 últimas capas del lóbulo, la acumulación de proteínas por día y por unidad aumenta, para volver posteriormente a los valores basales. Es decir que se ha encontrado una correlación entre los estudios morfológicos, (en cuanto a tamaño, espesor, número de capas e histoquímica) y la velocidad de crecimiento medida como acumulación de proteínas. Paralelamente se midieron azúcares totales por lóbulo óptico en función de la edad, encontrándose un perfil muy similar al de proteínas acumuladas (Fig. 13).

Con el objeto de encontrar si durante el desarrollo del lóbulo óptico hay una correlación entre la variación de la acumulación de azúcares y proteínas por un lado y la velocidad relativa de síntesis de las correspondientes macromoléculas, se efectuaron los experimentos mostrados en las Figs. 15 y 21.

Primero se midió la velocidad relativa de síntesis de proteínas durante el desarrollo, encontrándose que la máxima incorporación de Leu-4,5³H a proteínas por mg prot. y por hora se tiene durante la etapa de proliferación celular. Además otro pico de alta incorporación se encontró previo a la eclosión (Fig. 15).

Luego se midió la velocidad relativa de glicosilación de proteínas en el lóbulo óptico en función de la edad (Fig. 21). Al igual que en el caso de síntesis de proteínas se encontró que hay dos valores máximos: uno en la etapa de proliferación celular y otro un poco antes de la eclosión.

De los resultados recién discutidos, se puede observar que hay una buena correlación entre la acumulación de proteínas totales y su síntesis. Lo mismo ocurre entre la variación de la acumulación de los azúcares totales y la

velocidad de glicosilación.

Por otro lado, tiene además interés estudiar la posible dependencia entre la existencia de aceptor proteico y la glicosilación. En 1983, Lennarz (122) encontró que si no hay aceptor proteico disponible, aún en presencia de dolicol-monofosfato, se detiene la reiniciación del ciclo del dolicol (Fig. 11). Por consiguiente tiene mucho interés determinar si en el lóbulo óptico hay una dependencia entre la síntesis de proteína y la regulación de la glicosilación. Analizando los resultados expuestos en las Figs. 15 y 21, se puede concluir que ambos procesos se modulan en forma paralela durante el desarrollo. Aunque esto era algo teóricamente previsible, no obstante tiene interés el haberlo podido comprobar experimentalmente en un sistema biológico en evolución.

4.2. Efecto del suero sobre la incorporación de manosa y leucina tritiadas a proteína en el lóbulo óptico de pollo

Como se comentó más arriba, uno de los hallazgos más sorprendentes e interesantes efectuados durante el transcurso de esta Tesis es el del efecto del suero en los procesos metabólicos anteriormente mencionados. Se encontró una marcada disminución de la incorporación de manosa tritiada a proteínas (Fig. 30). Lo llamativo de este fenómeno es que el tejido responde en forma diferente a la presencia del suero, según su estadio del desarrollo (Fig. 31). Durante la etapa de proliferación celular hay un leve aumento en la incorporación de Man- 2^3H a proteínas, mientras que se observó una marcada disminución en la 3ra. etapa del desarrollo del lóbulo óptico, es decir durante la finalización de la maduración de su citoarquitectura, luego de la llegada de los axones provenientes de la retina.

Trabajando con el lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días, se vio que la disminución de la incorporación de Man- 2^3H a proteína es dosis depen-

diente (Fig. 26). Esto se mantiene también en incubaciones de hasta 18 horas (Fig. 27). Agregando 20% (v/v) de suero fetal bovino en el medio se obtuvieron valores del 40% con respecto al control, sin suero.

En cuanto al efecto del suero en la síntesis de proteínas se encontró una pequeña disminución en la incorporación de Leu-4,5³H a proteína en lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días ante 10% de suero fetal bovino en el medio de incubación (Fig. 32).

Todos los experimentos realizados hasta ahora se habían efectuado en lóbulo óptico de embrión de pollo. Tenía interés estudiar la especificidad de otros tejidos con respecto al suero. Se encontró que no tenía efecto sobre la incorporación de Man-2³H (Fig. 40) ni Leu-4,5³H a proteína en hígado de embrión de pollo de 18 días (Fig. 41), como tampoco se encontró que no tenía ninguna influencia en riñón y pulmón (resultados no mostrados). Además se midió su efecto en tejido nervioso de otra especie, encontrándose una disminución en la incorporación de Man-2³H a proteínas de corteza cerebral de rata de 5 días (Fig. 42) siendo también dosis dependiente (Fig. 43).

Trabajando con lóbulo óptico de pollo se probaron sueros provenientes de distintas fuentes (caballo, ternero, vaca, pollo de 7 días y embriones de 18 días, y humano), se encontró que todos ellos disminuyen apreciablemente la incorporación de Man-2³H a proteínas (Fig. 57).

El marcado efecto del suero en el proceso de glicosilación de proteína resultó algo inesperado. Buscando información sobre trabajos relacionados con este tema en otros laboratorios, se encontró que, aunque en general, se considera que la presencia del suero es indispensable en cultivos de neuronas (40,112), otros investigadores tratan de reemplazar lo que ellos consideran un "fluido biológico indefinido", por el agregado al medio de cultivo sintético de hormonas, factores de crecimiento y otros sustratos (113,114,115). Por otro lado, estudios previos realizados en cultivos de

neuronas (120) indicaron efectos tóxicos del suero fetal bovino durante la anoxia, aunque no se han aislado aún los factores del suero que lo provocan. Otro efecto inhibitorio "in vitro" sobre la vía biosintética de gangliósidos es producido por el suero, especialmente por una proteína de aproximadamente 70 kD (121).

Nuestros resultados recién discutidos unidos a los hallazgos comunicados por otros laboratorios nos llevó a efectuar una serie de estudios sobre el posible factor del suero responsable de todos estos efectos. Esto lo vamos a discutir en la Sección 4.4.

4.3. Efecto del suero sobre otras vías metabólicas y su relación con la historia previa del animal

Dado que el suero es una compleja mezcla de factores, hormonas, metabolitos, etc., se efectuaron dos distintas clases de series de experimentos: en la primera se analiza la historia previa del animal (anterior a la disección del lóbulo óptico) y en la segunda, una serie de efectos del suero a nivel de incorporación de $^{32}\text{P}_i$, glucosamina- ^3H y uridina- ^3H . Además se encontró un marcado efecto en las glicoproteínas recién sintetizadas liberadas al medio (Tabla VIII).

Con respecto al primer punto, las variables utilizadas fueron luz y oscuridad, ayuno de agua o de alimento o suministro "ad libitum" de ambos y enucleación (lóbulo óptico contralateral y control ipsilateral), ver Resultados. En todos los casos se pudo observar diferencias en la incorporación de Man- $^2^3\text{H}$ a proteína. Por ejemplo, disminución en el caso de la luz, de ayuno de agua, de suministro de alimento y enucleación. Lo más llamativo de los resultados encontrados es que el efecto del suero en todos los casos anula las pequeñas diferencias producidas en la historia previa del animal, provocando siempre una marcada inhibición en la incorporación de

manosa radioactiva a proteína.

Con respecto al segundo punto, la presencia de suero produce un aumento del 500% en la captación del $^{32}\text{P}_i$ y su incorporación al material TCA insoluble caliente (Tabla VII), en cambio tanto con uridina- ^3H o glucosamina- ^3H , el suero produce una disminución de incorporación de tritio en RNA y gangliósidos respectivamente (Fig. 33 y Tabla IV). Estos resultados pueden considerarse preliminares y como se dijo al principio, debido a la complejidad de la composición del suero hace que sea difícil evaluar la significación biológica de los mismos.

4.4. Naturaleza del factor sérico y su posible sitio de acción en el metabolismo celular

Recapitulando los principales hallazgos efectuados en esta Tesis, se refieren al suero que cuando está presente en el medio de incubación, disminuye marcadamente la incorporación de Man- $^2^3\text{H}$ a proteína. Dos aspectos importantes interesaba profundizar en este estudio. Uno se refiere a la naturaleza del factor del suero responsable de esa inhibición y el segundo se refiere al sitio en la vía metabólica, que va de la manosa a la glicoproteína, en que actúa este factor. Se aclara que podría ser más de un sitio e incluso podría ser por una vía indirecta. Dada la compleja mezcla en la composición del suero y para determinar cuál es el o los factores responsables de los fenómenos biológicos encontrados en este trabajo, fue conveniente primero estudiar algunas propiedades para conocer su naturaleza y luego intentar su purificación. Los experimentos realizados en este sentido, que se muestran en la Fig. 58, indican que la disminución de la incorporación de Man- $^2^3\text{H}$ a proteínas por el suero se mantiene inalterada aunque previamente se hayan efectuado tratamientos drásticos de calentamiento y variación de pH. Además, este factor sérico no es dializable (Fig. 59) y cuando se lo pasa a través de

filtros Amicon (10 y 30 kD), conserva su efecto biológico (Figs. 60 y 61). El tratamiento con tripsina y quimotripsina indicaría que este factor es de naturaleza proteica (Fig. 62).

Una vez que se dilucidó la naturaleza de este factor, se intentó la purificación del mismo según el esquema de la Tabla VI. Básicamente consiste en dos etapas: una ultrafiltración y una columna de intercambio iónico (FPLC). Se alcanzó una purificación de 8.400 veces y el producto más puro corrido en electroforesis en geles de poliacrilamida muestra tres polipéptidos principales (Fig. 64). La unidad de medición utilizada es la cantidad de proteína que disminuye en un 60% la incorporación de Man- 2^3H a proteína.

Con respecto al segundo problema que se va a enfocar, se refiere al sitio en la vía metabólica en el cual actúa este factor. Por razones de claridad, conviene antes analizar en forma resumida el esquema metabólico de utilización de manosa y su incorporación a las glicoproteínas en el lóbulo óptico de pollo (Esquema VII). El primer paso es la fosforilación de estos azúcares por la hexoquinasa I. Una vez dentro de la célula, la manosa sigue dos vías principales: isomerización de Man-6-P a Fru-6-P, entrando en el metabolismo intermedio de la célula. En la otra vía, hay una transferencia del fosfato de Man-6-P, dando Man-1-P. Luego se forma el correspondiente nucleótido azúcar (GDP-Man) y el lípido intermediario (DMP-Man). Ambos entran al ciclo del dolicol como se vio en la Fig. 11.

En la etapa de la isomerización cuando se usa Man- 2^3H , es en esta etapa donde el tritio se intercambia con el agua, eliminándose la marca de los intermediarios metabólicos siguientes, ya sea la vía de síntesis de aminoácidos, formación de ATP y de carbohidratos, etc.

Se estudiaron en profundidad dos etapas en este esquema metabólico: la primera, entrada de la manosa y su fosforilación, y la última etapa, que comprende el ciclo del dolicol y la transferencia del oligosacárido a la pro-

teína aceptora.

Estudiando esta última etapa, se aislaron los intermediarios del ciclo del dolicol y se encontró que el efecto del suero es aproximadamente similar en los lípido-azúcares intermediarios y en las glicoproteínas recién sintetizadas (Tabla V). Puede observarse en dicha Tabla, que en el lípido oligosacárido precursor inmediato de la síntesis de glicoproteínas (G3) el suero produce una disminución de 45% de la manosa radioactiva incorporada con respecto al control. De esos resultados se puede concluir que el suero ejerce su efecto en una etapa previa a la formación del dolicol monofosfato manosa (DMP-Man) y otros intermediarios.

Por consiguiente, la otra posibilidad de explicar la disminución de la incorporación de manosa tritiada a proteína en presencia de suero podría ser, la entrada de manosa a la célula y su ulterior fosforilación. Como se explicó en Resultados, se estudió la captación de Man- 2^3H por partículas de lóbulo óptico de embrión de pollo de 18 días, no encontrándose ninguna diferencia en presencia o ausencia de suero, por lo menos hasta 10 min de incubación (Fig. 48). Como un control, se hizo el mismo experimento pero con embrión de pollo de 6 días, con o sin suero y tampoco se encontró ninguna diferencia (Fig. 49).

Como se dijo anteriormente, el tejido nervioso utiliza indistintamente glucosa o manosa (106), luego tenía interés verificar si la captación de glucosa podía ser afectada por el suero. Al igual que lo observado en el caso de la manosa, el suero no parece afectar la entrada de glucosa a la célula (Fig. 50). Incluso cuando se utiliza el análogo, 2-deoxiglucosa, tampoco se observan diferencias (Fig. 51).

Cuando se estudian estos problemas a tiempos largos (18 hs) y se mide el consumo de glucosa (utilizando desaparición en el medio medido enzimáticamente) y el de manosa tritiada (medición directa de radioactividad

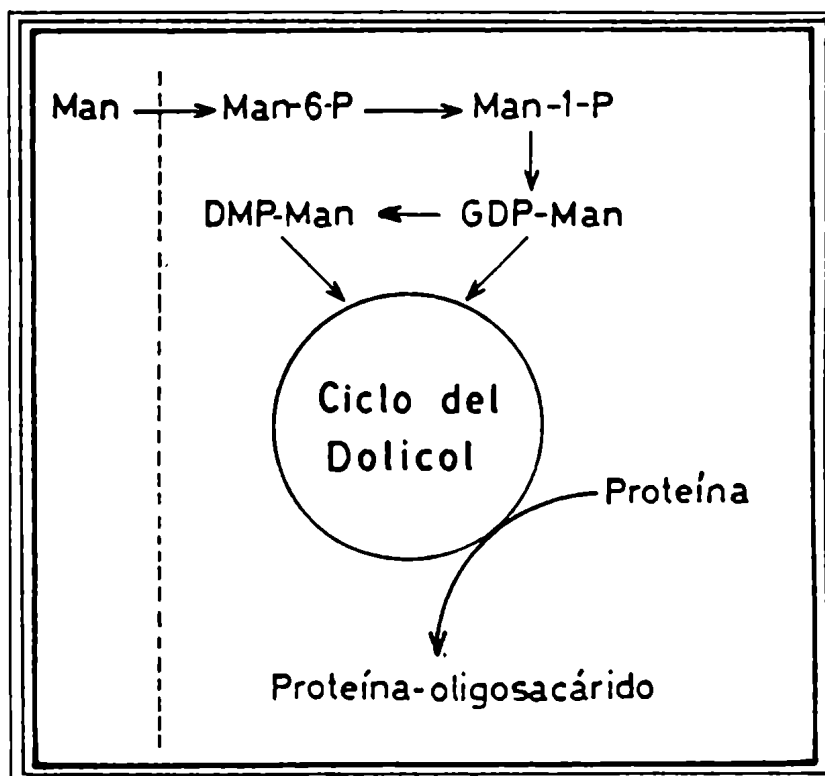
en el medio) se encontró que mientras el suero no afecta el consumo de glucosa, en cambio aparentemente disminuiría el de manosa (Tabla III). Como se dijo en su oportunidad, esta disminución es sólo aparente, ya que hay una incrementada liberación de radioactividad en el material TCA caliente insoluble al medio (Tabla VIII).

Como no se ha profundizado más este problema, se desconoce hasta el presente si se trata de liberación de glicoproteínas al medio o de ruptura celular inespecífica que podría estar aumentada en presencia de suero. Esto va a ser estudiado en el futuro.

También se midió consumo de 2-deoxiglucosa, con lóbulos ópticos de embriones de pollo de distintas edades, se observó que el suero no afecta mayormente este consumo (Fig. 53). Por otro lado, se efectuaron mediciones "in vitro" de la actividad de la hexoquinasa I de lóbulo óptico de pollo de 6 días (Figs. 54, 55 y 56). Se observó que el suero tiene un pequeño efecto inhibitorio, pero, dada las limitaciones que tienen estas mediciones "in vitro", no se puede saber si esta diferencia es suficiente para explicar el efecto del suero sobre la incorporación de manosa tritiada a proteína.

De acuerdo con los datos obtenidos en esta Tesis, aunque aún no se conoce la etapa metabólica precisa en que podría actuar el factor del suero, hay que descartar la entrada de la manosa a la célula. Por otro lado debería ser una etapa anterior a la síntesis de DMP-Man y por consiguiente a la entrada de la manosa al ciclo de dolicol (Fig. 11 y Esquema VII).

Esquema VII. Camino metabólico de la manosa hasta su incorporación en las glicoproteínas



5. CONCLUSIONES

Se ha estudiado en esta Tesis la regulación de la glicosilación de proteínas de lóbulo óptico de pollo durante el desarrollo. Se utilizó este tejido nervioso porque es fácil de disecar y morfológicamente está muy bien caracterizado, recibiendo la mayoría de sus aferencias de la retina contralateral.

Durante el desarrollo del lóbulo óptico se encontró una buena correlación entre la variación de la acumulación de azúcares y proteínas por un lado y la velocidad relativa de síntesis de proteínas y su glicosilación. Además, por los resultados encontrados parecería que ambos procesos se modulan en forma paralela en función de la edad del animal, ya que hay aparentemente una dependencia entre la regulación de la glicosilación y la síntesis de proteína.

Estudiando los reguladores exógenos de la glicosilación de proteínas se encontró un novedoso efecto del suero en la misma. Utilizando el micrométodo de incubación de partículas de lóbulo óptico de embriones de pollo de distintas edades, se midió la incorporación de Man- 2^3H a proteínas, en presencia o ausencia de suero. Se encontró que ejerce una marcada disminución, que es dosis dependiente, mientras que influye poco en la síntesis de proteínas. Lo interesante de este fenómeno es que el tejido responde al suero en forma diferente de acuerdo a su estadio del desarrollo. Además, este efecto parece ser específico del sistema nervioso, habiéndoselo encontrado en dos especies distantes en la evolución: aves y mamíferos.

Se enfocó el problema de determinar el sitio de la vía metabólica (manosa a glicoproteína) en el cual actúa el suero. Se encontró que la captación de azúcares a la célula (manosa o glucosa) no se ve afectada. Por otra parte, en las últimas etapas (lípidos-azúcar intermediarios ---- glicoproteínas), incu-

bando partículas de lóbulo óptico con Man-2³H ya se observó el pronunciado efecto inhibitorio del suero a nivel de los lípidos intermediarios. Aunque, aún, no se ha podido determinar con precisión en qué etapa ocurre este fenómeno, debe estar, en caso de ser un efecto directo, posiblemente a nivel de éster fosfórico o de nucleótido-azúcar.

Con respecto a la naturaleza del factor del suero responsable de esta inhibición, los hallazgos más salientes de este trabajo son:

- . éste se encuentra en todos los sueros (de pollo a humano);
- . es una proteína, no dializable, que resiste tratamientos drásticos de calentamiento y variación de pH;
- . fue purificada parcialmente (8.400 veces), dando en electroforesis desnaturalizantes en geles de poliacrilamida tres polipéptidos de aproximadamente 66, 60 y 14 kD.

Juan Posi

Juan Urrutia

6. REFERENCIAS

1. Stieda, L. Studien über das zentrale Nervensystem der Vögel und Säugetiere, Z. wiss. Zool., 19 (1869) 1-94.
2. Cowan, W.M., Adamson, L. y Powell, T.P.S. An experimental study of the avian visual system. J. Anat. (Lond.), 95 (1961) 545-562.
3. Huber, G.C. y Crosby, E.C. A phylogenetic consideration of the optic tectum. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash), 19 (1933) 15-22.
4. Jungherr, E. Certain nuclear groups of the avian mesencephalon. J. Comp. Neurol., 82 (1945) 55-75.
5. Leghissa, S. Il differenziamento ontogenetico ed istogenetico del tetto ottico nell'embrione de pollo. Arch. Sci. Biol. (Bologna), 12 (1957) 601-628.
6. La Vail, J.H. y Cowan, W.M. The development of the chick optic tectum. I. Normal morphology and cytoarchitectonic development. Brain Research, 28 (1971) 391-419.
7. La Vail, J.H. y Cowan, W.M. The development of the chick optic tectum. II. Autoradiographic studies. Brain Research, 28 (1971) 421-441.
8. Kelly, J.P. y Cowan, W.M. Studies on the development of the chick optic tectum. III. Effects of the early eye removal. Brain Research, 42 (1972) 263-288.
9. McGraw, C.F. y McLaughlin, B.J. Fine structural studies of synaptogenesis in the superficial layers of the chick optic tectum. J. of Neurocytology, 9 (1980) 79-93.

10. McGraw, C.F., McLaughlin, B.J. y Boykins, L.G. A freeze-fracture study of synaptic junction development in the superficial layers of the chick optic tectum. *J. of Neurocytology*, 9 (1980) 95-106.
11. Rager, G. Morphogenesis and physiogenesis of the retinotectal connection in the chicken. II. The retinotectal synapsis. *Proc. Royal Soc. London Series B*, 192 (1976) 353-370.
12. Hamburger, V. y Hamilton, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* 88 (1951) 49-92.
13. Fujita, S. Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 122 (1964) 311-328.
14. Hamburger, V. y Levi-Montalcini, R. Some aspects of neuroembryology. In P. Weiss (Ed.), *Genetic Neurology*, Univ. of Chicago Press, Chicago, 1950, pp. 128-160.
15. Rutishauser, U., Thiery, J.P., Brackenbury, R. Adhesion among neural cells of the chick embryo. *J. Cell. Biol.*, 79 (1976) 371-381.
16. Hamdi, F.A. y Whitteridge, D. The representation of the retina on the optic tectum of the pigeon. *Quart. J. Exp. Physiol.* 39 (1954) 111-119.
17. Sperry, R.W. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fibers patterns and connections. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 50 (1963) 703-710.
18. De Long, G.R. y Coulombre, A.J. Development of the retinotectal topographic projection in the chick embryo. *Exp. Neurol.* 13 (1965) 351-363.

19. Fillogamo, G. Conseguenze della demolizione dell'abbozzo dell'occhio sullo sviluppo del lobo ottico nell'embrione di pollo. Riv. Biol., 42 (1950) 73-79.
20. Cowan, W.M., Martin, A.H. y Wenger, E. Mitotic patterns in the optic tectum of the chick during normal development and after early removal of the optic vesicle. J. Exp. Zool. 169 (1968) 71-92.
21. Lillie's. Development of the chick. Revised by Howard Hamilton (B.H. Willier, ed.).
22. Cajal, S.R. Estructura del lóbulo óptico de las aves y origen de los nervios ópticos. Rev. Trimestr. Histol., 3-4 (1889).
23. Cajal, S.R. Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des Vertébrés, Vol. 2, Maloine, Paris, 1911.
24. Van Gehuchten, A. La structure des lobes optiques chez l'embryon de poulet. La cellule, 8 (1892) 1-46.
25. Huber, G.C. y Crosby, E.C. A phylogenetic consideration of the optic tectum. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 19 (1933) 15-22.
26. Hart, J.R. Some observations on the development of the avian optic tectum. Ph.D. Thesis, Univ. of Wisconsin, 1969.
27. Karten, H.J. Projections of the optic tectum of the pigeon (Columba livia). Anat. Rec. 151 (1965) 369.
28. Cragg, B.G., Evans, D.H.L. y Hamlyn, L.H. The optic tectum of Gallus domesticus: a correlation of the electrical responses with the histological structure. J. Anat. (Lond.), 88 (1954) 292-306.

29. Holden, A.L. The field potential profile during activation of the avian optic tectum. *J. Physiol. (Lond.)*, 194 (1968) 75-90.
30. Holden, A.L. Types of unitary response and correlation with the field potential profile during activation of the avian optic tectum. *J. Physiol. (Lond.)*, 194 (1968) 91-104.
31. McGill, J.L., Powell, T.P.S. y Cowan, W.M. The retinal representation upon the optic tectum and isthmo-optic nucleus in the pigeon. *J. Anat. (Lond.)*, 100 (1966) 5-33.
32. O'Leary, J.L. y Bishop, G.H. Analysis of potential sources in the optic lobe of duck and goose. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 22 (1943) 73-87.
33. Peters, J.J., Vanderake, A.R. y Powers, T.H. Electrical studies of functional development of the eye and optic lobes in the chick embryo. *J. Exp. Zool.*, 139 (1958) 459-468.
34. Sedlacek, J. The response of optic evoked potentials to strychnine in chick embryos. *Exp. Brain Res.* 9 (1969) 357-364.
35. Cicero, T.J., Cowan, W.M. y Moore, B.W. Changes in the concentrations of the two brain specific proteins, S-100 and 14-3-2, during the development of the avian optic tectum. *Brain Research*, 24 (1970) 1-10.
36. Merlie, J.P., Sebbane, R., Gardner, S., Olson, E. y Lindstrom, J. The regulation of acetylcholine receptor expression in mammalian muscle. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* XLVIII (1983) 136-146.
37. Catterall, W.A. The molecular basis of neuronal excitability. *Science*, 223 (1984) 653-661.

38. Morris, R. Thy-1 in the developing nervous tissue. *Dev. Neurosci.*, 7 (1985) 133-160.
39. Edelman, G.M. Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 2 (1986) 81-116.
40. Alperin, M.D., Idoyaga-Vargas, V. y Carminatti, H. Rate of protein glycosylation in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 47 (1986) 355-362.
41. Rossi, S.G., Idoyaga-Vargas, V. y Carminatti, H. An improved micromethod of incubation for the study of glycoprotein biosynthesis in the central nervous system. *Anales de la Asociación Química Argentina* (Aceptado para su publicación en diciembre de 1988).
42. Rambourg, A. y LeBlond, C.P. Electron microscopic observations on the carbohydrate-rich cell coat present at the surface of cells in the rat. *J. Cell. Biol.*, 32 (1967) 27-53.
43. Banker, G., Crain, B. y Cotman, C.W. Molecular weights of the polypeptide chains of synaptic plasma membranes. *Brain Res.*, 42 (1972) 503-514.
44. Margolis, R.K., Margolis, R.U., Petri, C. y Lai, D. Distribution and metabolism of glycoproteins and glycosaminoglycans in subcellular fractions of brain. *Biochemistry*, 14 (1975) 479-484.
45. Wachneltd, T.V., Morgan, I.G. y Gombos, G. The synaptosomal plasma membrane: protein and glycoprotein composition. *Brain Res.* 34, (1971) 403-406.
46. Mahler, H.R. Glycoproteins of the synapse, in *Complex Carbohydrates of the Nervous System* (Margolis, R.U., and Margolis, R.K., eds.), pp. 165-184 (1979) Plenum, New York.

47. Kelly, P.T. Nervous system glycoproteins: molecular properties and possible functions, in *The Biology of Glycoproteins* (Ivan, R.J., ed.) pp. 323-369 (1984) Plenum, New York.
48. Gurd, J.W. Synapse plasma membrane glycoproteins. Molecular identification of lectin receptors. *Biochemistry*, 16 (1977) 369-374.
49. Gurd, J.W. Identification of lectin receptors associated with rat brain post synaptic densities. *Brain Res.*, 126 (1977) 154-159.
50. Kelly, P.T. y Cotman, C.W. Identification of proteins and glycoproteins at synapses in the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, 252 (1977) 786-793.
51. de Silva, N.S., Gurd, J.W. y Schwartz, C. Developmental alterations of rat brain synaptic membranes. Reaction of glycoproteins with plant lectins. *Brain Res.*, 165 (1979) 283-293.
52. Rostas, J.A.P., Kelly, P.T., Pesin, R.H. y Cotman, C.W. Protein and glycoprotein composition of synaptic junctions prepared from discrete synaptic regions and different species. *Brain Res.*, 168 (1979) 151-167.
53. Fu, S.C., Cruz, T. y Gurd, J.W. Development of synaptic glycoproteins: effect of post-natal age on the synthesis and concentration of synaptic membrane and synaptic junctional fucosyl- and sialyl glycoproteins. *J. Neurochem.*, 36 (1981) 1338-1351.
54. Mena, E.E., Foster, A.C., Fagg, G.E. y Cotman, C.W. Identification of synapse specific components: synaptic glycoproteins, proteins and transmitter binding sites. *J. Neurochem.*, 37 (1981) 1557-1566.

55. Gurd, J.W. y Fu, S.C. Concanavalin A receptors associated with rat brain synaptic junctions are high mannose-type oligosaccharides. *J. Neurochem.*, 39 (1982) 719-725.
56. Gurd, J.W., Bissoon, N. y Kelly, P.T. Synaptic junctional glycoproteins are phosphorylated by cyclic-AMP dependent protein kinase. *Brain Res.*, 269 (1983) 287-296.
57. Gurd, J.W. Phosphorylation of the postsynaptic density glycoprotein gp180 by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *J. Neurochem.*, 45 (1985) 1128-1135.
58. Gurd, J.W. Phosphorylation of the post synaptic density glycoprotein, gp180 by endogenous tyrosine kinase. *Brain Res.*, 269 (1985) 287-296.
59. Gurd, J.W. y Bissoon, N. In vivo phosphorylation of the postsynaptic density glycoprotein gp180. *J. Neurochem.*, 45 (1985) 1136-1140.
60. Kearney, K.A. y Gurd, J.W. Phosphorylation of synaptic membrane glycoproteins: the effects of Ca^{2+} and calmodulin. *J. Neurochem.*, 46 (1986) 1683-1691.
61. Rutishauser, U., Thiery, J.P., Brackenbury, R., Sela, B.A. y Edelman, G.M. Mechanisms of adhesion among cells from neural tissue of the chick embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73 (1976) 577-581.
62. Rutishauser, U., Gall, W.E. y Edelman, G.M. Adhesion among neural cells of the chick embryo. IV. Role of the cell surface molecule CAM in the formation of neurite bundles in cultures of spinal ganglia. *J. Cell Biol.*, 79 (1978) 382-393.

63. Keilhauer, G., Faissner, A. y Schachner, M. Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature (Lond.)*, 316 (1985) 728-730.
64. Nybroe, O., Linnemann, D. y Bock, E. N-CAM biosynthesis in brain. *Review. Neurochem. Int.* 12 (1988) 251-262.
65. Bock, E., Richter-Landsberg, A., Faissner, A. y Schachner, M. Demonstration of immunochemical identity between th nerve growth factor inducible large external (NILE) glycoprotein and cell adhesion molecule L1. *The Embo Journal*, 4 (1985) 2765-2768.
66. Parodi, A.J. y Leloir, L.F. The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in the eucaryotic cell. *Biochim. Biophys. Acta*, 559 (1979) 1-37.
67. Gibson, R., Kornfeld, S. y Schlesinger, S. A role for oligosaccharides in glycoprotein biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.*, 5 (1980) 290-293.
68. Staneloni, R.J. y Leloir, L.F. The biosynthetic pathway of the asparagine-linked oligosaccharides of glycoproteins. *Critical Reviews in Biochemistry*, CRC Press, Cleveland, OH., (1982) 289-326.
69. Grinna, L.S. y Robbins, P.W. Glycoproteins biosynthesis. Rat liver microsomal glucosidases which process oligosaccharides. *J. Biol. Chemistry*, 254 (1979) 8814.
70. Michael, J.M. y Kornfeld, S. Partial purification and characterization of the glucosidases which process oligosaccharides. *Arch. Biochem. Biophys.*, 199 (1980) 249.

71. Marshall, R.D. Glycoproteins. *Ann. Rev. Biochem.*, 41 (1972) 673-702.
72. Beeley, J.G. Peptide chain conformation and the glycosylation of glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76 (1977) 1051-1055.
73. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275
74. Bray, G.A. A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter. *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 279-285.
75. Sokoloff, M., Reivich, M., Kennedy, C., DesRosiers, M.H., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O. y Shinohara, M. The (^{14}C)deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochemistry*, 28 (1977) 897-916.
76. Sokoloff, L. Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system. *J. Neurochemistry*, 29 (1977) 13-26.
77. Maccione, H.J.F., Arce, A., Landa, C.A. y Caputto, R. Rat brain microsomal gangliosides. Accessibility to the neuraminidase preparation and the possible existence of different pools in relation to their biosynthesis. *Biochem. J.*, 138 (1974) 291-298.
78. Alperin, D.M., Idoyaga-Vargas, V.P. y Carminatti, H. Method for the detection of organic compounds on paper chromatograms with high recovery of the sample. *J. Chromatograph.*, 242 (1982) 299-304.

79. Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226 (1957) 497.
80. Jones, C.T. y Ralph, T.P. Metabolism during fetal life. A functional assessment of metabolic development. *Physiol. Rev.*, 65 (1985) 357-430.
81. Dobbing, J. Undernutrition and the developing brain. The relevance of animal models to the human problem. *Am. J. Dis. Child.*, 120 (1970) 411-415.
82. Goldberg, A.L. y Goldspink, D.F. Influence of food deprivation and adrenal steroids on DNA synthesis in various mammalian tissues. *Am. J. Physiol.*, 228 (1975) 310-317.
83. Gispen, W.H. y De Weid, D. Effects of hypophysectomy on RNA metabolism in rat brain stem. *J. Neurochem.*, 17 (1970) 751-761.
84. Balazs, R. y Cotterrell, M. Effect of hormonal state on cell number and functional maturation of the brain. *Nature*, 236 (1972) 348-350.
85. Barondes, S.H. y Rosen, S.D. Cell surface carbohydrate-binding proteins: role in cell recognition. *Neuronal Recognition* (Barondes, S.H., ed.) pp. 331-336. Plenum Press, New York.
86. Rutishauser, U. Developmental biology of a neural cell adhesion molecule. *Nature*, 310 (1984) 549-554.
87. Barondes, S.H. Synaptic macromolecules: identification and metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 43 (1974) 147-168.

88. Quarles, R.H. Glycoproteins in myelin and myelin-related membranes. *Complex Carbohydrates of Nervous Tissue*. (Margolis, R.U. y Margolis, R.K., eds.), pp. 209-233, Plenum Press, New York.
89. Krusius, T. y Finne, J. Structural features of tissue glycoproteins: fractionation and methylation analyses of glycopeptides derived from rat brain, kidney and liver. *Eur. J. Biochem.*, 78 (1977) 369-380.
90. Heacock, A.M. Glycoprotein requirement for neurite outgrowth in goldfish retina explants: effects of tunicamycin. *Brain Res.*, 241 (1982) 307-315.
91. Richter-Landsberg, C. y Duksin, D. Role of glycoproteins in neuronal differentiation. *Exp. Cell. Res.*, 149 (1983) 335-345.
92. Waechter, C.J., Schmidt, J.W. y Catterall, W.A. Glycosylation is required for maintenance of functional sodium channels in neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 5117-5123.
93. Merlie, J.P., Sebbane, R., Tzartos, S. y Lindstrom, J. Inhibition of glycosylation with tunicamycin blocks assembly of newly synthesized acetylcholine receptor subunits in muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 257 (1982) 2694-2701.
94. Prives, J. y Bar-Sagi, D. Effect of tunicamycin, and inhibitor of protein glycosylation, on the biological properties of acetylcholine receptor in cultured muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 1775-1780.
95. Liles, W.C. y Nathanson, N.M. Regulation of neuronal muscarinic acetylcholine receptor number by protein glycosylation. *J. Neurochem.*, 46 (1986) 89-95.

96. Harford, J.B., Waechter, C.J. y Earl, F.L. Effect of exogenous dolichyl monophosphate on a developmental change in mannosylphosphoryldolichol biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76 (1977) 1036-1043.
97. Harford, J.B. y Waechter, C.J. A developmental change in dolichyl phosphate mannose synthase activity in pig brain. *Biochem. J.*, 188 (1980) 481-490.
98. Idoyaga-Vargas, V. y Carminatti, H. Post-natal changes in dolichol-pathway enzyme activities in cerebral cortex neurons. *Biochem. J.*, 202 (1982) 87-95.
99. Bhat, N.R. y Waechter, C.J. Induction of N-glycosylation activity in cultured embryonic rat brain cells. *J. Neurochem.*, 50 (1988) 375-381.
100. Bouzat, C.B., De los Santos, E.B., Idoyaga-Vargas, V., Carminatti, H., Barrantes, F.J. y Alperin, D.M. Protein glycosylation during the post-natal development of rat cerebral cortex. Enviado para publicar al *J. Neurochem.* (1988).
101. Sadoul, K., Sadoul, R., Faissner, A. y Schachner, M. Biochemical characterization of different molecular forms of the neural cell adhesion molecule L1. *J. Neurochem.*, 50 (1988) 510-521.
102. Bhat, S. y Silberberg, D.H. Developmental expression of neural cell adhesion molecules of oligodendrocytes in vivo and in culture. *J. Neurochem.*, 50 (1988) 1830-1838.
103. Gennerini, G., Hirsh, M.R., He, H.T., Hirn, M., Finne, J. y Goridis, C. Differential expression of mouse neural cell-adhesion molecule (N-CAM)

- mRNA species during brain development and in neural cell lines. *J. Neurosci.*, 6 (1986) 1983-1990.
104. Owens, G.C., Edelman, G.M. y Cunningham, B.A. Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84 (1987) 294-298.
105. Poltorak, M., Sadul, R., Landa, C., Fahrig, J. y Schachner, M. Myelin-associated glycoprotein, a member of the L2/HNK-1 family of neural cell adhesion molecules, is involved in neuron-oligodendrocyte and oligodendrocyte-oligodendrocyte interaction. *J. Cell Biol.*, 105 (1987) 1893-1899.
106. Sloviter, H.A. y Kamimoto, T. The isolated perfused rat brain preparation metabolizes mannose but not maltose. *J. Neurochem.*, 17 (1970) 1109-1111.
107. Lund-Andersen, H. Transport of glucose from blood to brain. *Physiol. Rev.*, 59 (1979) 305-352.
108. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (1970) 680-685.
109. Pardrige, W.M. Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiol. Rev.*, 63 (1983) 1481-1535.
110. Carson, D.D., Earles, B.J. y Lennarz, W.J. Enhancement of protein glycosylation in tissue slices by dolichylphosphate. *J. Biol. Chem.*, 256 (1981) 11552-11557.

111. Lewis, L.D., Ljunggren, B., Norberg, K. y Siesjö, B.K. *J. Neurochem.*, 23 (1974) 659-662.
112. Kaufman, L.M. y Barrett, J.N. Serum factor supporting long-term survival of rat central neurons in culture. *Science*, 220 (1983) 1394-1396.
113. Bottenstein, J., Mather, J. y Sato, G. Growth of neuroepithelial-derived cell lines in serum-free hormone-supplemented media. *Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif.*, 6 (1979) 531-544.
114. Michler-Stuke, A. y Bottenstein, J. Proliferation of glial-derived cells in defined media. *J. Neurosci. Res.*, 7 (1982) 215-228.
115. Bottenstein, J. y Sato, G. Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (1979) 514-517.
116. Ríos, H., Flores, V. y Fiszer de Plazas, S. Postnatal development of GABA receptor sites in chick optic lobe: effect of light and dark-rearing. *Comunicaciones Biológicas*, 1 (1983) 395-401.
117. Morgan, M.J. y Faik, P. Carbohydrate metabolism in cultured animals cells. *Biosci. Rep.*, 1 (1981) 669-686.
118. Lajtha, A.L., Maker, H. y Clarke, D.D. Metabolism and transport of carbohydrates and amino acids, de *Basic Neurochemistry* (Siegel G.J., Albers R.W., Agranoff B.W. y Katzman R., eds.) pg. 329-353. Little Brown. Boston. Massachusetts.
119. Sharon, N. Glycoprotein biosynthesis, de *Complex Carbohydrates*, pg. 118-141. Addison-Wesley. Reading. Massachusetts.

120. Pauwels, P.J., Opperdoes, F.R. y Trouet, A. Effects of antimycin, glucose deprivation, and serum on cultures of neurons, astrocytes and neuroblastoma cells. *J. Neurochem.*, 44 (1985) 143-148.
121. Quiroga, S. y Caputto, R. An inhibitor of the UDP-N-Acetylgalactosamine: GM3, N-Acetylgalactosaminyltransferase: Purification and properties, and preparation of an antibody to this inhibitor. *J. Neurochem.*, 50 (1988) 1695-1700.
122. Grant, S.R. y Lennarz, W.J. Relationship between oligosaccharide-lipid synthesis and protein synthesis in Mouse LM Cells. *Eur. J. Biochem.*, 134 (1983) 575-583.

7. ABREVIATURAS

PBS: solución salina de fosfatos

TCA: ácido tricloroacético

NCS: solubilizador de tejidos (Amersham Co.)

SFB: suero fetal bovino

DG: deoxiglucosa

SDS: dodecil sulfato de sodio

PTA: ácido fosfo-túngstico

LO: lóbulo óptico

E: embrión de pollo

FPLC: fast protein liquid chromatography

D: dolicol

DMP: dolicol-monofosfato

Man: manosa

GDP-Man: guanidina-difosfato manosa

the 1990s, the number of people in the UK who are aged 65 and over has increased from 10.5 million to 13.5 million (19.5% of the population).

There are a number of reasons for this increase. One of the main reasons is that people are living longer. The life expectancy at birth in the UK is now 77 years for men and 81 years for women. This is an increase of 12 years since 1950.

Another reason is that people are staying healthier for longer. The number of people who are aged 65 and over and who are in good health has increased from 6.5 million in 1990 to 8.5 million in 2000.

There are also a number of reasons why people are staying healthier for longer. One of the main reasons is that people are eating healthier food. The number of people who are eating a healthy diet has increased from 15% in 1990 to 25% in 2000.

Another reason is that people are exercising more. The number of people who are exercising regularly has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.

There are also a number of reasons why people are staying healthier for longer. One of the main reasons is that people are taking better care of themselves. The number of people who are taking care of themselves has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.

Another reason is that people are getting better care. The number of people who are getting better care has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.

There are also a number of reasons why people are staying healthier for longer. One of the main reasons is that people are taking better care of themselves. The number of people who are taking care of themselves has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.

Another reason is that people are getting better care. The number of people who are getting better care has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.

There are also a number of reasons why people are staying healthier for longer. One of the main reasons is that people are taking better care of themselves. The number of people who are taking care of themselves has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.

Another reason is that people are getting better care. The number of people who are getting better care has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.

There are also a number of reasons why people are staying healthier for longer. One of the main reasons is that people are taking better care of themselves. The number of people who are taking care of themselves has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.

Another reason is that people are getting better care. The number of people who are getting better care has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.

There are also a number of reasons why people are staying healthier for longer. One of the main reasons is that people are taking better care of themselves. The number of people who are taking care of themselves has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.

Another reason is that people are getting better care. The number of people who are getting better care has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.

There are also a number of reasons why people are staying healthier for longer. One of the main reasons is that people are taking better care of themselves. The number of people who are taking care of themselves has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.

Another reason is that people are getting better care. The number of people who are getting better care has increased from 10% in 1990 to 20% in 2000.