

193  
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“PRESENCIA DE ACTIVIDAD DE COLINESTERASAS EN CELULAS DEL  
EPITELIO PIGMENTARIO DE RETINA DE POLLO, EN CULTIVO”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A:  
GUSTAVO SANCHEZ CHAVEZ

MEXICO, D. F.

1990

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE GENERAL

	Página
INDICE GENERAL.....	4
INDICE DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCION.....	10
I. El Epitelio Pigmentario de la Retina.....	10
a. Morfología y Fisiología.....	10
b. Embriología.....	18
c. Influencia del Epitelio Pigmentario de la Retina en el Desarrollo de Otros Tejidos.....	20
d. Cultivo.....	22
II. Las Colinesterasas.....	24
a. Formas Moleculares.....	25
b. Biosíntesis y Secreción.....	29
c. Sitios Activos.....	31
d. Inhibidores.....	31
e. Distribución de las Colinesterasas.....	33
f. Otras Propiedades.....	35
OBJETIVO.....	38
MATERIALES Y METODOS.....	39
Animales.....	39
Aislamiento y Cultivo de las Células.....	39
Histoquímica de la Acetilcolinesterasa y de la Butiril- colinesterasa.....	40

Determinación Bioquímica de la Acetilcolinesterasa y de la Butirilcolinesterasa.....	42
Determinación de Proteínas.....	44
Análisis de las Formas Moleculares de la Acetilcolinesterasa y de la Butirilcolinesterasa.....	44
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
Características del Epitelio Pigmentario en Cultivo.....	46
Histoquímica de las Colinesterasas.....	46
Determinación Bioquímica de la Actividad de Colinesterasas en Células del Epitelio Pigmentario .....	48
Formas Moleculares de Acetilcolinesterasa y Butirilcolinesterasa.....	49
Figuras.....	51
Gráficas.....	56
<b>DISCUSION.....</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>74</b>
<b>APENDICE A.....</b>	<b>89</b>
<b>APENDICE B.....</b>	<b>89</b>
<b>APENDICE C.....</b>	<b>90</b>

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diagrama de una sección transversal del ojo de los vertebrados.....	11
Figura 2. Organización celular de las capas de la retina de los vertebrados.....	12
Figura 3. Diagrama de una célula del epitelio pigmentario de la retina de ave.....	14
Figura 4. Representación esquemática del desarrollo de la retina y estructuras relacionadas de vertebrados..	19
Figura 5. Representación esquemática mostrando la estructura cuaternaria de las formas asimétricas y globulares de Acetilcolinesterasa.....	28
Figura 6. Sitio activo de la Acetilcolinesterasa.....	32
Figura 7. Cultivos primarios de células del epitelio pigmentario de la retina de embrión de pollo de 7 días.....	51
Figura 8. Actividad de colinesterasas en células del epitelio pigmentario de la retina de pollo después de un día de cultivo.....	52
Figura 9. Actividad de colinesterasas en células del epitelio pigmentario de la retina de pollo después de 4 días de cultivo.....	53
Figura 10. Actividad de colinesterasas en células del epitelio pigmentario de la retina de pollo después de 5 días de cultivo.....	54
Figura 11. Corte transversal de la retina de pollo de 8 días de nacido que muestra la distribución de la actividad de Acetilcolinesterasa.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

- A<sub>4</sub> Forma asimétrica de acetilcolinesterasa o de butirilcolinesterasa con 4 subunidades catalíticas y una cola de naturaleza de colágena.
- A<sub>8</sub> Forma asimétrica de acetilcolinesterasa o de butirilcolinesterasa con 8 subunidades catalíticas y una cola de naturaleza de colágena.
- A<sub>12</sub> Forma asimétrica de acetilcolinesterasa o de butirilcolinesterasa con 12 subunidades catalíticas y una cola de naturaleza de colágena.
- AChE Acetilcolinesterasa.
- BChE Butirilcolinesterasa.
- BW 284C51 1,5-bis(4-alil-dimetil-amonio-fenil)pentan-3-uno-dibromuro.
- DFP Di-isopropil-fluorofosfato.
- DTNB Acido 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoico.
- EP Epitelio pigmentario de la retina.
- G<sub>1</sub> Forma globular de acetilcolinesterasa o de butirilcolinesterasa con una subunidad catalítica.
- G<sub>2</sub> Forma globular de acetilcolinesterasa o de butirilcolinesterasa con 2 subunidades catalíticas.
- G<sub>4</sub> Forma globular de acetilcolinesterasa o de butirilcolinesterasa con 4 subunidades catalíticas.
- iso-OMPA Tetra-isopropil-pirofosforamida.
- PM Peso molecular.
- S Unidades Svedverg.

## RESUMEN

Tradicionalmente se ha considerado a la Acetilcolinesterasa (AChE) como un marcador de la neurotransmisión colinérgica, ya que es la enzima que hidroliza a la acetilcolina. Existen evidencias bioquímicas, neuroanatómicas, neurofisiológicas y farmacológicas que indican que la AChE puede tener funciones no sinápticas (Greenfield, 1984).

Se ha encontrado a la AChE y a la Butirilcolinesterasa (BChE) en tejidos no nerviosos. También están presentes en etapas tempranas de desarrollo embrionario como la blástula de invertebrados y de vertebrados y en etapas precedentes a la sinaptogénesis en mamíferos (Drews, 1975).

Asimismo se han encontrado estas enzimas durante la morfogénesis del sistema visual de vertebrados, en donde se ha observado que la actividad de BChE aparece primero o en regiones diferentes a la AChE, lo que ha dado lugar a que se postule a la BChE como un marcador de la proliferación celular y a la AChE como un marcador de la diferenciación celular (Layer, 1983; Layer et al, 1987a, 1987b, 1988a, 1988b).

Por otro lado en experimentos realizados en co-cultivos de células de epitelio pigmentario de la retina y células de la retina neural, se observó que el epitelio pigmentario tiene un papel inductor en la estratificación de las neuronas de la retina, organización que semeja a la que presentan *in vivo*; paralelamente a estos cambios estructurales, los niveles de AChE y de BChE se modifican (Vollmer et al. 1984; Vollmer, 1986a, 1986b, 1987). Por otro lado, la actividad de AChE determinada bioquímicamente, se ha reportado en el epitelio pigmentario de

retina de pollo (EP) (Martelly y Gautron, 1988; Martínez et al, 1988).

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se determinaron histoquímica (Karnovsky y Roots, 1964) y bioquímicamente (Ellman et al, 1961) las actividades de AChE y de BChE en cultivos primarios de células del EP de embrión de pollo de 7 días. Se encontró que dichas actividades no presentan variaciones significativas en las células durante el cultivo, sin embargo en los medios de cultivo, la AChE se incrementa notablemente con respecto al tiempo. Por otro lado la localización de ambas colinesterasas en las células es diferente de acuerdo con el estado de diferenciación en que se encuentren las células. La BChE está presente preferentemente en células que están en proliferación, mientras que la AChE se localiza en células diferenciadas, lo que concuerda con lo propuesto por Layer y Vollmer (Layer, 1983; Vollmer, 1984; Vollmer y Layer, 1986a, 1986b, 1987; Layer et al, 1987a, 1987b, 1988a, 1988b).

Asimismo se indentificaron las formas moleculares de ambas enzimas con el uso de gradientes continuos de sacarosa (Villafruela, 1980, 1981), y se encontró que las formas moleculares de AChE asociadas a las células parecen corresponder a la A<sub>12</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>2</sub> y G<sub>1</sub>, mientras que las formas de BChE son la A<sub>2</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>2</sub> y G<sub>1</sub>; con ligeras variaciones G<sub>4</sub> entre el primero y cuarto día de cultivo. La forma molecular principal de AChE y de BChE presente en los medios de cultivo es la G<sub>4</sub>.

Los resultados obtenidos sugieren una posible participación de la BChE y de la AChE en los procesos de proliferación y diferenciación celular.



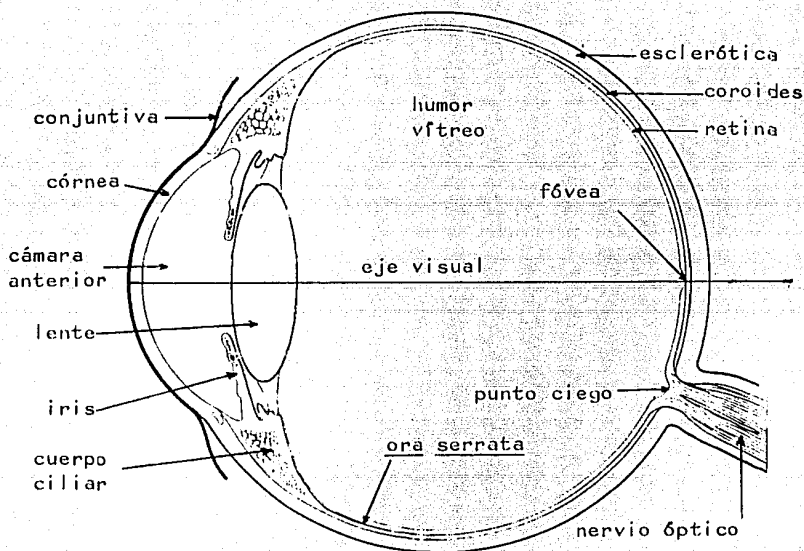
## INTRODUCCION

### I. El Epitelio Pigmentario de la Retina.

El epitelio pigmentario de la retina (EP) consiste de una monocapa de células hexagonales pigmentadas, localizada entre los segmentos externos de los fotorreceptores de la retina neural y la coroides (Figuras 1 y 2). La monocapa es más gruesa en la zona central de la retina y se adelgaza a nivel de la ora serrata. El tamaño de las células es de 20 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro y 7 a 10  $\mu\text{m}$  de grosor, según la especie (Nguyen-Legros, 1978; Kuwabara, 1979a; Salceda, 1986; Gordon y Essner, 1987). El EP presenta funciones complejas, tales como transportar numerosos compuestos a uno y otro lado de la retina, formar parte de la barrera hematorretiniana, absorber el exceso de luz, sintetizar mucopolisacaridos ácidos del espacio subretiniano, fagocitar segmentos externos de los fotorreceptores, metabolizar la vitamina A, además de tener una influencia trófica e interacción inductiva sobre otros tejidos (Nguyen-Legros, 1978; Coulombre, 1979; Steinberg y Wood, 1979a; Young y Bok, 1979; Zinn y Benjamin-Henkind, 1979; Clark, 1986).

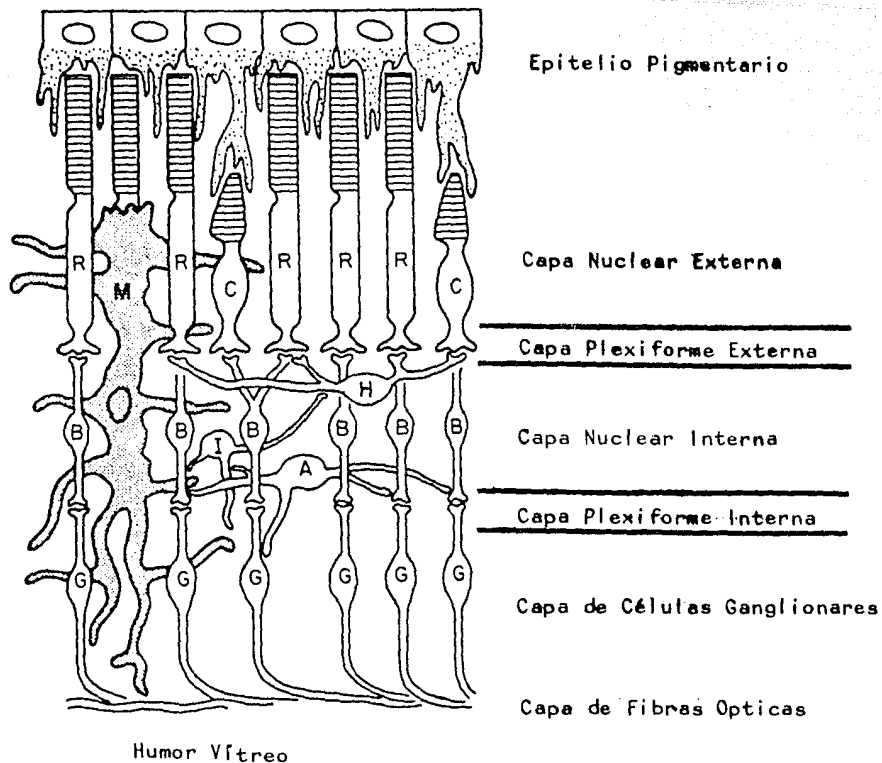
#### a. Morfología y Fisiología.

La membrana plasmática de las células del EP, al igual que otras células epiteliales, está altamente polarizada y pueden distinguirse dos superficies: la membrana apical que se encuentra en estrecho contacto con los fotorreceptores y la membrana basolateral que ve hacia la coroides (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979). La membrana basolateral presenta interdigitaciones.



**Figura 1.** Diagrama de una sección transversal del ojo de los vertebrados superiores. La organización celular de la retina neural indicada en el cuadro está representada en la Figura 2. (Basado en Farber y Adler, 1996).

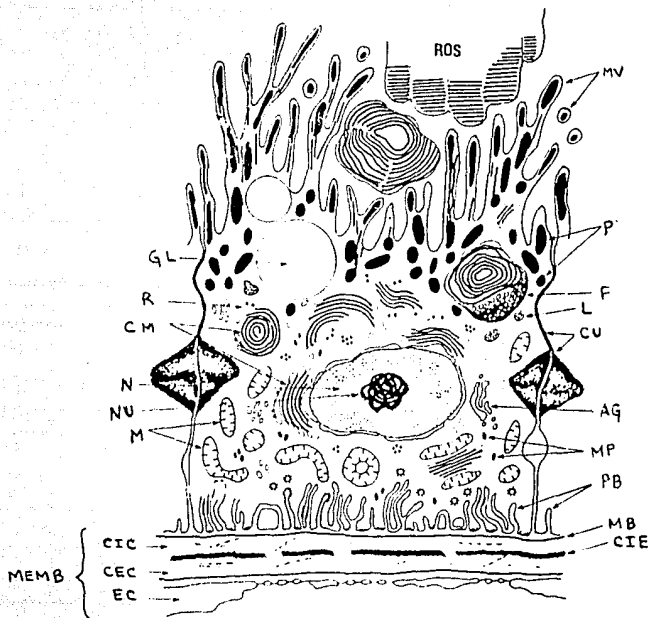
Coroides



**Figura 2.** Organización celular de las capas de la retina de los vertebrados. Los principales tipos celulares están indicados como R, bastones; C, conos; H, células horizontales; B, células bipolares; I, células interplexiformes; A, células amacrinas; G, células ganglionares; M, células de Müller (Basado en Farber y Adler, 1986).

uniones estrechas y desmosomas en banda (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979; Davson, 1980; Cooper et al, 1987) (Figura 3)...Interiormente existen paquetes circulares de microfilamentos asociados a los desmosomas en banda (Gordon y Essner, 1987). Por arriba de las uniones estrechas hay uniones de comunicación y la presencia de éstas sugiere que existe un acoplamiento eléctrico entre las células (Davson, 1980). Todas las uniones constituyen realmente una barrera impermeable a solutos e iones entre la coroides y la retina (Steinberg y Miller, 1979b).

El EP sintetiza la lámina basal, conocida como membrana de Bruch, ésta es una capa translúcida acelular que separa la membrana plasmática del epitelio del flujo sanguíneo de la coroides (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979) (Figura 3). Está constituida por cinco láminas: la primera es la membrana basal del epitelio, de naturaleza fibrilar; la segunda es la capa interna compuesta de fibrillas de colágena embebidas en un complejo protéico que forma una red laxa; la siguiente es la capa intermedia elástica con fibras elásticas de forma y tamaño variado, atravesada por fibras de colágena entre las zonas interna y externa; la cuarta capa es la externa de colágena que es similar a la interna; y la última capa es la superficie basal de los coriocapilares, constituida por el endotelio de los mismos, esta capa es discontinua en las zonas intercapilares. La membrana de Bruch contiene grandes espacios que permiten el paso de macromoléculas (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979; Caldwell et al, 1987). El depósito y acumulación de materiales residuales en esta lámina basal, junto con alteraciones de las fibras colágenas y elásticas pueden originar procesos patológicos (Kornzweig, 1979;



**Figura 3.** Diagrama de una célula del epitelio pigmentario de la retina de ave. AG, aparato de Golgi; CEC, capa externa de colágena; CIC, capa interna de colágena; CIE, capa intermedia elástica; CM, cuerpos mieloides; CU, complejos de unión; EC, endotelio de los coriocapilares; F, fagosoma; GL, gota de lípido; L, lisosoma; M, mitocondria; MB, membrana basal; MEMB, membrana de Bruch, que incluye a la MB, a la CIC, a la CIE, a la CEC, y a la EC; MP, microperoxisoma; MV, microvellosidades; N, núcleo; NU, nucleolo; P, gránulos de pigmento; PB, plegamientos basales; R, ribosoma; ROS, segmentos externos de los bastones (Basado en Nguyen-Legros, 1978).

Zinn y Benjamin-Henkind, 1979; Ennis y Kunz, 1984; Katz y Robinson, 1985).

La superficie apical de las células del EP está orientada hacia el espacio subretiniano y está en íntimo contacto con la retina neural a través de sus microvellosidades que envuelven los segmentos externos de los fotorreceptores (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979) (Figura 3). Hay dos tipos de microvellosidades; las largas que se encuentran entre los segmentos externos y las cortas que forman una vaina alrededor de los segmentos externos y que parecen estar relacionadas con la fagocitosis de dichos segmentos. Estas microvellosidades contienen retículo endoplásmico liso, ribosomas, gránulos de melanina y filamentos de actina (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979; Matsumoto et al, 1987). En vertebrados inferiores las microvellosidades son más grandes y largas, con mayor volumen de citoplasma que en el resto de la célula; y en algunos animales estas microvellosidades están en contacto con las células de Müller de la retina (Kuwabara, 1979a).

El EP secreta diversos compuestos, tales como carbohidratos y proteínas de adhesión, que constituyen la matriz interfotorreceptora (Steinberg y Wood, 1979a, Zauberman, 1979; Essner et al, 1981; Adler y Klucznik, 1981/82, 1982/83; Chihara et al, 1984; Crawford y Crawford, 1984; Clark y Hall, 1986; Docherty et al, 1987; Feeney-Burns et al, 1987; McLaughlin et al, 1987; Newsome et al, 1987; Turksen et al, 1987).

En el citoplasma existen los organelos típicos de las células eucariontes (Figura 3). Las células pueden tener más de un núcleo (Berman, 1979); el retículo endoplásmico liso consiste

de estructuras lameladas, vesiculares y tubulares, arregladas en cisternas paralelas que tienden a concentrarse en la región apical de las células (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979). Los cuerpos mieloides (Figura 3) están estructuralmente organizados por retículo endoplásmico liso y se encuentran asociados al núcleo y a las gotas de aceite, por lo que se piensa que pueden participar en el metabolismo de lípidos y en la transferencia y/o procesamiento del ARN (Matthes y Basinger, 1980). Los peroxisomas de este epitelio (Figura 3) participan probablemente en el metabolismo de la vitamina A (Robison y Kuwabara, 1975; Zinn y Benjamin-Henkind, 1979). Una de las funciones más sobresalientes del EP es fagocitar periódicamente paquetes de discos de los segmentos externos de los fotorreceptores, lo que permite su continuo recambio (Lo y Bernstein, 1981). Los paquetes de discos al ser internalizados en una vesícula fagocítica, migran a la región basal de la célula en donde se fusionan con los lisosomas, así se forma el fagolisosoma o lisosoma secundario. Los desechos se liberan a la membrana de Bruch por exocitosis (Matsumura et al, 1985). Los restos no digeribles constituyen los cuerpos residuales y gránulos de lipofuscina, estos últimos contienen ácidos grasos insaturados y otros productos finales de la fagocitosis (Berman, 1979; Bok y Young, 1979; Zinn y Benjamin-Henkind, 1979; Zimmerman et al, 1983; Clark, 1986).

Los gránulos de pigmento (Figura 3) contienen eumelanina parda o negra que es un polímero de la indol-5,6-quinona, la cual se sintetiza a partir de la tirosina a través de varias actividades enzimáticas de las cuales la de la tirosinasa es la más importante (García et al, 1979; Mund y Rodrigues, 1979; Zinn

y Benjamin-Henkind, 1979). Esta enzima se sintetiza en la superficie del retículo endoplásmico rugoso y posteriormente se transfiere al aparato de Golgi en unas vesículas que más tarde se fusionan con otras provenientes del retículo endoplásmico liso para formar así a los premelanosomas, que son estructuras membranosas de interior fibrilar; aquí la tirosinasa está asociada a una red protéica finamente estriada (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979). La síntesis de melanina continúa hasta llenar el gránulo de melanoproteína y constituir al gránulo de melanina maduro, el cual ya no tiene actividad de tirosinasa. Estos gránulos de melanina son ovoides o esféricos, los primeros están localizados en la parte apical de la célula dentro de las microvellosidades, mientras que los esféricos se encuentran de la parte apical a la porción media del citoplasma; tienen de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de largo y un  $\mu\text{m}$  de diámetro (García et al, 1979; Mund y Rodrigues, 1979; Zinn y Benjamin-Henkind, 1979; Stanka et al, 1981; Herman y Steinberg, 1982). El pigmento protege a la retina contra el daño producido por el exceso de luz, ya que absorbe energía en el espectro visible y en el ultravioleta (Carr y Siegel, 1979; García et al, 1979; Zinn y Benjamin-Henkind, 1979; Rapp y Williams, 1980; LaVail y Gorrin, 1987).

El componente más abundante del citoesqueleto es la actina, arreglada en paquetes de microfilamentos en el soma, en las microvellosidades y en la periferia de la célula (Murray y Dubin, 1975; Gordon y Essner, 1987). Los filamentos de actina junto con los filamentos intermedios de vimentina y los microtúbulos, participan en el movimiento de los organelos (Murray y Dubin, 1975; Burnside y Laties, 1979; Docherty et al, 1984; Clark, 1986;

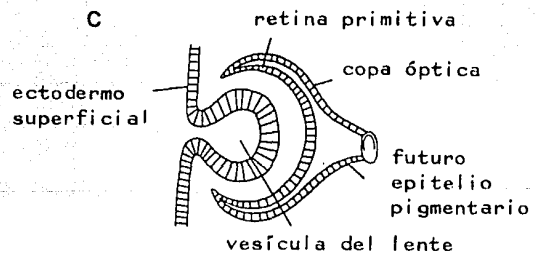
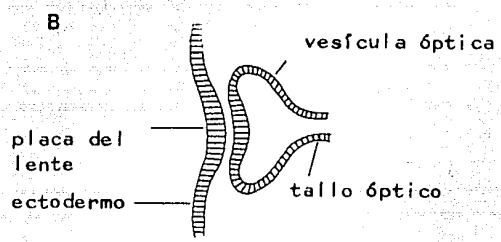
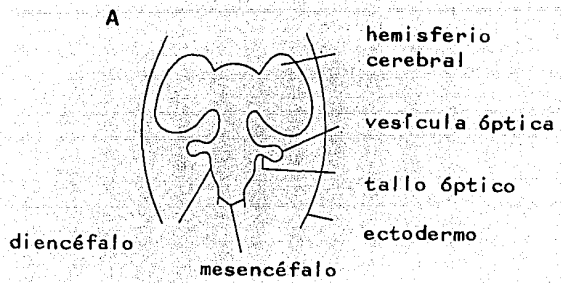


Shirakawa et al, 1986; Gordon y Esnner, 1987).

Las células del EP se caracterizan por un vigoroso metabolismo oxidativo (Young y Bok, 1979). Almacenan grandes cantidades de vitamina A en forma de gotas de lípidos, que es un precursor del retinaldehído, pigmento fotosensible de la retina neural (Berman et al, 1974; Nguyen-legros, 1978; yang et al, 1978; Seyfried-williams y McLaughlin, 1984). La presencia de vitamina E asociada posiblemente con los gránulos de lipofuscina protege a las membranas de la peroxidación de sus lípidos (Young y bok, 1979; Organisciak et al, 1987).

#### b. Embriología.

El EP, como la retina neural y el cerebro, se desarrollan a partir de la placa neural del ectodermo anterior. La placa neural tiene una depresión en su centro llamada surco neural, cuyos bordes convergen gradualmente y al fusionarse forman el tubo neural (Mund y Rodríguez, 1979; Farber y Adler, 1986). La región anterior del tubo neural se divide en tres dilataciones conocidas como vesículas primarias: el prosencéfalo en la región más rostral, seguido del mesencéfalo y el rombencéfalo. Posteriormente el prosencéfalo se subdivide en el telencéfalo y en el diencefalo (Mund y Rodríguez, 1979; Farber y Adler, 1986) (Figura 4a.). Estas vesículas primarias originan a distintas regiones del encéfalo. Una pequeña evaginación a cada lado del diencefalo se proyecta para formar las vesículas ópticas primarias, las cuales son huecas. Las células del ectodermo superficial que están en oposición directa con las vesículas ópticas proliferan y esta superficie en proliferación se invaginan



**Figura 4.** Representación esquemática del desarrollo de la retina y estructuras relacionadas de vertebrados. A, Región anterior del tubo neural dividida en las vesículas primarias. B, Vesícula óptica que induce al ectodermo superficial a formar la vesícula del cristalino. C, Copa óptica embrionaria (Basado en Farber y Adler, 1986).

y forma la vesícula del cristalino. Al mismo tiempo, las vesículas ópticas se invaginan y forman las copas ópticas, constituidas por dos capas de células (Mund y Rodrigues, 1979; Farber y Adler, 1986) (Figura 4b). La pared externa de la copa formada por la porción proximal de la vesícula óptica permanece como una capa sencilla de células columnares o cuboidales, que posteriormente formarán al EP, cuerpo ciliar e iris. La capa interna de la copa, cuya porción posterior comienza a proliferar, origina a la retina, el epitelio ciliar no pigmentado y al epitelio posterior del iris (Mund y Rodrigues, 1979; Farber y Adler, 1986) (Figura 4c).

Las células del EP son de las primeras en dejar de dividirse y en diferenciarse (Stroeva y Mitashov, 1983). En el pollo, la división celular del EP continúa hasta el quinto día de desarrollo embrionario, a partir del cual las células sólo crecen, las células dejan de dividirse totalmente al decimotercer día (Stroeva y Mitashov, 1983). Los gránulos de pigmento aparecen desde el tercer día de desarrollo embrionario y a partir del quinto día la síntesis de melanina aumenta y comienza a almacenarse (Mund y Rodrigues, 1979).

#### **c. Influencia del Epitelio Pigmentario de la Retina en el Desarrollo de Otros Tejidos.**

Durante la embriogénesis, el EP induce la diferenciación de otros tejidos oculares, modula su morfogénesis, crecimiento y organización (Coulombre, 1979).

El EP induce la formación de la coroides y el desarrollo de los fotorreceptores; cuando los segmentos externos de los mismos

comienzan a desarrollarse, en la membrana apical del EP empiezan a diferenciarse las microvellosidades (Coulombre, 1979). El EP induce la formación de la esclerótica a partir del mesénquima periocular, que está mediada por la membrana basal depositada debajo del EP. También parece tener una función trófica, ya que los segmentos externos de las células visuales en diferenciación, permanecen rudimentarios hasta que entran en contacto con las células del EP (Coulombre, 1979). Asimismo, se ha observado, en cultivo de tejidos, que las células del EP tienen cierta influencia en la agrupación y estratificación de las células de la retina neural (Vollmer et al, 1984; Vollmer y Layer, 1986a, 1986b, 1987; Liu et al, 1988).

Aunque las células del EP se diferencian muy temprano en el desarrollo, se ha observado que son capaces de transdiferenciarse para formar células tanto de la retina neural, como células del cristalino o células del epitelio del iris. (Coulombre, 1979). El EP durante el desarrollo embrionario de los urodelos, puede transformarse en retina neural cuando se pone en contacto con la placa nasal o con otocistos (Coulombre, 1979). Esta capacidad de proliferación y transdiferenciación de las células del EP, está relacionada con la regeneración de la retina neural, del iris y del cristalino en anfibios (Coulombre, 1979). La capacidad de regeneración disminuye con la edad del animal (Stroeva y Mitashov, 1983). Recientemente se ha propuesto que los componentes de la matriz extracelular como la laminina, participan en las interacciones inductivas que se originan en la retina neural y en el EP durante el desarrollo embrionario de diferentes vertebrados (Coulombre, 1979; Reh et al, 1987).

#### d. Cultivo.

El cultivo de células del EP constituye un modelo para el estudio de sus propiedades (Albert y Buyukmihci, 1979).

Las ventajas del cultivo de tejidos son, entre otras, que se puede tener un ambiente controlado; se puede estudiar la respuesta a diversas condiciones; es valiosa para efectuar estudios bioquímicos sin la participación de otras células, y eliminar la interferencia por la protección del huésped. Las desventajas son que pueden ocurrir respuestas al ambiente artificial diferentes a las que ocurren in vivo debido a la carencia de otros tejidos oculares con los que el epitelio pigmentario está normalmente en contacto; la exclusión de respuestas inmunológicas, hormonales, nerviosas y otras que pueden influenciar al EP, y originar conclusiones erróneas, ya que estos mecanismos modifican la respuesta de dicho epitelio in vivo y no se pueden controlar in vitro (Albert y Buyukmihci, 1979; Clark, 1986).

Se han obtenido cultivos primarios de células de EP de aves (Chader et al, 1975; Tsunematsu et al, 1981; Koh y Chader, 1983, 1984; Clark, 1986; Vielkind y Crawford 1988a, 1988b), de rata (Edwards, 1981; Heth et al, 1987), de gato (Stramm et al, 1983; Clark, 1986), de porcino (Clark, 1986), de bovino (Heller y Jones, 1980; Basu et al, 1983; Clark, 1986), de primates (Clark, 1986) y de humano (Albert y Buyukmihci, 1979; Flood et al, 1984; Oka et al, 1984; Boulton y Marshall, 1985, 1986; Clark, 1986); así como cultivos secundarios de células de humano y de bovino (Basu et al, 1983; Boulton y Marshall, 1985). Lo más importante es que las células del EP presentan in vitro la misma morfología

y expresan algunas actividades enzimáticas. Se ha reportado la presencia de microvellosidades y plegamientos basales (Tsunematsu et al, 1981; Stramm et al, 1983; Heth et al, 1987); uniones intercelulares (Meller, 1979); gránulos de pigmento (Chader et al, 1975; Basu et al, 1983; Boulton y Marshall, 1985; Heth et al, 1987); síntesis de fibronectina, vinculina y otras sustancias que participan en la adhesión de las células (Opas, 1985; Opas et al, 1985; Turkser et al, 1987; Yamakawa et al, 1987).

Asimismo, se ha podido estudiar en células aisladas de diferentes especies, tanto en condiciones normales como patológicas, el metabolismo de las células, que incluye la migración de las glucoproteínas de la membrana plasmática del EP de pollo (Entani et al, 1986); el transporte de glucosa (Masterson y Chader, 1981); la actividad fagocítica (Hall, 1978; Tripathi y Tripathi, 1981; Tsunematsu et al, 1981; Basu et al, 1983; Boulton y Marshall, 1986); sus características de crecimiento, proliferación, diferenciación y envejecimiento celular, así como su transdiferenciación a neuronas (Chader et al, 1975; Albert y Buyukmihci, 1979; Basu et al, 1983; Flood et al, 1984; Boulton y Marshall, 1986; Reh et al, 1987; Vielkind y Crawford, 1988b); las actividades de varias enzimas como la tirosinasa, la fosfatasa ácida (Basu et al, 1983; Seyfried-Williams y McLaughlin, 1984); la presencia de receptores a histamina, así como los  $\beta$ -adrenérgicos, los muscarínicos (Koh y Chader, 1983, 1984; Friedman et al, 1988) y la síntesis del factor de crecimiento fibroblástico (Schweigerer et al, 1987).

Por otro lado se han hecho co-cultivos de células de EP de pollo con diferentes tipos celulares homólogos. En los co-

cultivos con células de la coroides se mantiene una estrecha relación entre ambas capas celulares y una mayor sobrevivencia de ellas (Albert y Buyukmihci, 1979). La especificidad de reconocimiento y organización celular se ha demostrado en cocultivos de células de EP con neuronas provenientes del tectum, en los que se forman agregados celulares sin organización aparente (Vollmer y Layer, 1987), mientras que con neuronas de la retina se induce la formación de agregados celulares con estratificación muy similar a la observada en la retina in vivo (Vollmer et al, 1984; Vollmer y Layer, 1986a, 1986b, 1987; Liu et al, 1988).

## II. Las Colinesterasas.

Las colinesterasas pueden ser definidas como un grupo de esterasas de serina capaces de hidrolizar ésteres de colina, tales como la acetilcolina (Augustinsson, 1957; Nachmansonn y Wilson, 1955; Brzin et al, 1983). La característica más importante para distinguir las colinesterasas de las esterasas "simples", es la inhibición de las primeras por concentraciones micromolares de eserina (fisostigmina) (Brzin et al, 1983).

Existen dos clases de colinesterasas, la Acetilcolinesterasa (AChE E.C. 3.1.1.7., acetilcolin-hidrolasa, acetilcolin acetilhidrolasa) y la Butirilcolinesterasa o pseudocolinesterasa (BChE E.C. 3.1.1.8. acilcolin acilhidrolasa). Estas difieren en cuanto a su especificidad al sustrato, cinética y sensibilidad a ciertos inhibidores. (Brzin et al, 1983).

## a. Formas Moleculares.

La AChE y la BChE son familias de glucoproteínas que pueden estar unidas a la membrana o ser secretadas (Rotundo, 1983). Esta heterogeneidad está dada por varias formas moleculares de cada enzima que pueden distinguirse por la composición de sus subunidades catalíticas, características de solubilidad y propiedades hidrodinámicas; lo que permite separarlas y analizarlas por cromatografía de filtración en gel o por centrifugación diferencial en gradientes continuos de sacarosa (Massoulié, 1980; Massoulié y Bon, 1982; Rotundo, 1983).

Los primeros estudios en cuanto a esto se refiere, fueron realizados en el órgano eléctrico de la anguila eléctrica y se obtuvieron tres formas mayores de la AChE (Massoulié y Bon, 1982). Estas moléculas altamente asimétricas tienen subunidades catalíticas globulares asociadas con un elemento en forma de bastón o cola de aproximadamente 50 nm de largo (Massoulié y Bon, 1982). Contienen uno, dos o tres grupos tetraméricos de subunidades, que corresponden a cuatro, ocho y doce sitios activos respectivamente y son llamadas  $A_4$ , ( $9S$ ; PM 410,000),  $A_8$ , ( $14S$ ; PM 796,000),  $A_{12}$  ( $19S$ ; PM 1,150,000) respectivamente (Villafraña et al, 1981; Massoulié, 1980; Massoulié y Bon, 1982; Brzin et al, 1983). El PM de cada subunidad catalítica es de aproximadamente 80,000 daltones y están asociadas en dímeros de dímeros por enlaces disulfuro que a su vez unen el tetrámero a la cola (Massoulié, 1980; Massoulié y Bon, 1982). Esta cola con naturaleza similar a la colágena forma una triple hélice de 100,000 daltones, cuyos péptidos están unidos covalentemente. Estas formas asimétricas se agregan reversiblemente en



concentraciones elevadas de sales a través de las colas de colágena, lo que podría explicar su anclaje a la membrana extracelular (Massoulié, 1980; Massoulié y Bon, 1982; Rotundo, 1983) (Figura 5).

Las formas moleculares que son solubles en soluciones de baja fuerza iónica están representadas por monómeros, dímeros y tetrameros de la subunidad catalítica (Massoulié, 1980; Massoulié y Bon, 1982; Brzin et al, 1983). Estas formas globulares son llamadas  $G_1$  (4S; PM 70,000),  $G_2$  (6S; PM 165,000) y  $G_4$  (11S; PM 331,000) y son homólogas a las formas asimétricas pero con coeficientes de sedimentación diferentes (Massoulié, 1980; Massoulié y Bon, 1982; Brzin et al, 1983) (Figura 5).

Las formas asimétricas de AChE como ya se dijo, se encuentran localizadas en el músculo esquelético de vertebrados y en los órganos eléctricos de la anguila y de la raya eléctrica, así como en diferentes regiones del sistema nervioso central; y constituyen la porción dominante en peces, en anfibios y en reptiles (Massoulié y Bon, 1982). La forma  $A_{1,2}$  es la que se encuentra en mayor proporción (10% de la enzima total) y junto con la  $A_3$  son formas asociadas a membranas, ambas formas están relacionadas con la neurotransmisión colinérgica, y son características de las placas terminales motoras. (Rieger et al, 1976; Vigny et al, 1976; Scarsella et al, 1978; Bon et al, 1979; Massoulié, 1980; Villafruela et al, 1980, 1981; Allemand et al, 1981; Ramirez et al, 1981; Massoulié y Bon, 1982; Brzin et al, 1983; Koelle et al, 1987a; Khaskiye y Renaud, 1988).

En el músculo pectoral de pollo se reportó la presencia de tres formas asimétricas de BChE, con coeficientes de

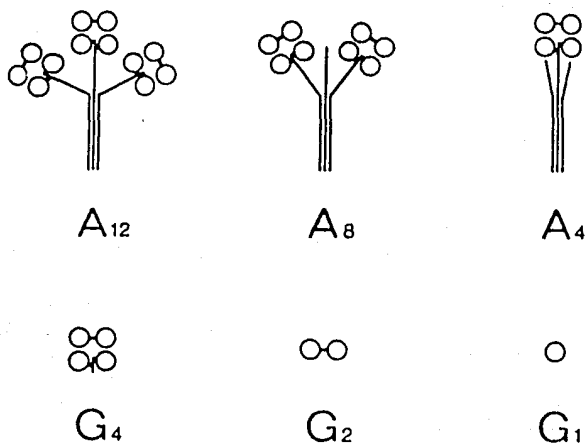
sedimentación menores que los de la AChE (Allemand et al, 1981; Massoulié y Bon, 1982; Tsim et al, 1988).

La mayor proporción de AChE y BChE en aves y en mamíferos corresponde a las formas globulares, que pueden encontrarse en el citoplasma, unidas a la membrana o secretadas en el espacio extracelular (Massoulié y Bon, 1982). Las tres formas globulares también están presentes en diferente proporción en diferentes regiones del sistema nervioso, en los órganos eléctricos de la anguila y de la raya eléctrica (Massoulié, 1980; Massoulié y Bon, 1982), así como en el músculo esquelético de vertebrados (Vigny et al, 1976; Scarsella et al, 1978; Bon et al, 1979; Villafruela et al, 1980; Allemand et al, 1981; Massoulié y Bon, 1982; Koelle et al, 1987a; Layer et al, 1987a; Khaskiye y Renaud, 1988; Martelly y Gautron, 1988), en eritrocitos de humano y de bovino (Massoulié y Bon, 1982; Rotundo, 1983), en suero de rata (Massoulié y Bon, 1982), en hígado (Massoulié y Bon, 1982; Perelman y Brandman, 1989) y en placenta (Massoulié y Bon, 1982).

Las tres formas globulares de BChE se han encontrado en el sistema nervioso del gato y del pollo, y en el músculo pectoral del pollo (Allemand et al, 1981; Koelle et al, 1987a; Layer et al, 1987a).

En diferentes células en cultivo, se han encontrado tanto las formas asimétricas como las globulares de ambas enzimas (Rieger et al, 1976; Kimhi et al, 1980; Rotundo, 1983; Melone et al, 1987; Vollmer y Layer, 1987).

La fraccionación subcelular de neuronas en cultivo, indica que la forma G<sub>4</sub> está asociada con la membrana plasmática, con sus sitios activos orientados hacia el espacio extracelular, también



**Figura 5.** Representación esquemática mostrando la estructura cuaternaria de las formas asimétricas y globulares de Acetilcolinesterasa. El subíndice indica el número de subunidades catalíticas en cada forma molecular. Las uniones disulfuro entre las subunidades están representadas por líneas y las colas por líneas triples (Basado en Massoulié y Bon, 1982).

está contenida dentro del retículo endoplásmico; mientras que las formas G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> están en su totalidad localizadas intracelularmente (Brzin et al, 1983). En el cerebro de conejo, la AChE está localizada en las fracciones mitocondrial y microsomal (Rodríguez de Lores Arnaiz, 1964). En el EP de pollo, 30% de la AChE es soluble y un 70% se localiza en la fracción particulada (Martínez et al, 1988).

#### **b. Biosíntesis y Secreción.**

La AChE como ya se ha dicho, comprende una familia de formas moleculares que pueden estar unidas a la membrana o ser secretadas (Rotundo, 1983). En el músculo y en los nervios de vertebrados, la AChE constituye del 0.001% al 0.01% de la proteína total, de la cual una tercera parte es catalíticamente activa y el resto se degrada (Rotundo y Fambrough, 1980a, 1980b; Rotundo, 1983, 1988). Las evidencias experimentales indican que las múltiples formas de AChE son codificadas por un solo gen, y que sufren modificaciones post-traduccionales en diferente grado (Doctor et al, 1983; Brockman et al, 1986; Gibney et al, 1988; Small, 1989).

Los polipéptidos de AChE son sintetizados en el retículo endoplásmico rugoso, donde son glucosilados probablemente de una manera co-traduccional (Rotundo, 1988). Pocos minutos después de la síntesis, se pueden detectar formas diméricas y tetraméricas de AChE en la luz del retículo endoplásmico rugoso (Rotundo, 1988). Una vez ensambladas, las formas oligoméricas son estables. Del 70 al 80% de las moléculas de AChE recién sintetizadas que consisten en monómeros y dímeros, son degradadas rápidamente en

una etapa temprana durante su tránsito intracelular; el destino de las moléculas degradadas y el mecanismo de degradación se desconocen (Rotundo, 1988). El resto de las moléculas ensambladas de AChE pasan por el aparato de Golgi, donde adquieren residuos de oligosacaridos adicionales como N-acetilglucosamina y galactosa (Rotundo, 1988). Las moléculas destinadas a permanecer unidas a la membrana son modificadas por la adición covalente de glucofosfolípidos o por asociación con otra cadena polipeptídica hidrofóbica. Posteriormente las moléculas de AChE son conducidas vía microtúbulos a la superficie celular o son secretadas al medio (Oh et al, 1977; Rotundo y Fambrough, 1980a, 1980b; Massoulié y Bon, 1982; Rotundo, 1988).

El recambio de AChE en la membrana se ha podido estudiar con el uso de inhibidores irreversibles liposolubles como el diisopropil-fluorofosfato (DFP), y dejando que se recupere la poza de AChE, con esto se demostró que el tiempo medio de la síntesis de AChE es de 2.5 horas (Rotundo y Fambrough, 1980a, 1980b; Massoulié y Bon, 1982; Rotundo, 1983, 1988).

Los monómeros de AChE son precursores de formas moleculares más complejas; sin embargo, los dímeros no son precursores de los tetrameros, cada forma molecular es ensamblada por separado durante su maduración molecular y una vez ensambladas son estables y no se interconvierten (Brockman et al, 1986; Rotundo, 1988), de modo que las moléculas unidas a la membrana celular no son precursoras de las secretadas (Rotundo y Fambrough, 1980b; Massoulié y Bon, 1982; Rotundo, 1988).

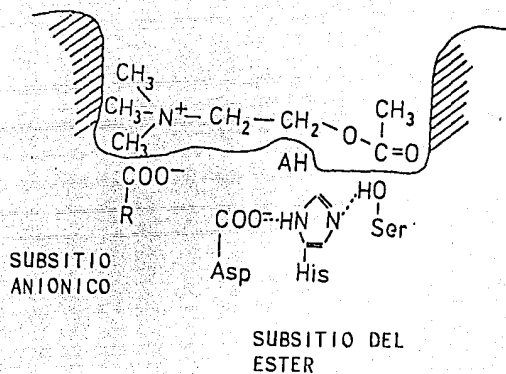
### c. Sitios Activos.

El centro activo de la AChE consiste en dos subsitios: uno aniónico que une por fuerzas electrostáticas al grupo amonio de la acetilcolina e interacciones hidrofóbicas con los grupos metilo del nitrógeno cuaternario; y un subsitio para el grupo éster que es en donde el proceso catalítico realmente tiene lugar (Brzin et al, 1983) (Figura 6). La reacción es básicamente una sustitución nucleofílica, y desplaza colina de la acetilcolina, el grupo hidroxilo de la serina es finalmente acetilado (Brzin et al, 1983; Whittaker, 1984). El mecanismo catalítico es de tipo ácido-base y se basa en la desprotonación del grupo hidroxilo de la serina, que incrementa la nucleofilicidad y de esta manera se acelera la acilación de la enzima.

Los ésteres de colina y los ésteres de ticolina, son los mejores sustratos para la AChE, aunque el fenil acetato y los ésteres aromáticos como los ésteres de indoxil o de naftil también son hidrolizados por dicha enzima (Augustinsson, 1957; Brzin et al, 1983).

### d. Inhibidores.

Existen diferentes compuestos que pueden unirse a cualquiera de los subsitios del centro activo de la AChE o de la BChE e inhibir su actividad de hidrólisis. Existen muchos inhibidores de AChE y de BChE, pero los más comunes son: el 1,5-bis(4-alil-dimetil-amonio-fenil)pentan-3-uno-dibromuro (BW 284C51) inhibidor reversible hidrosoluble del subsitio aniónico de la AChE (Froede y Wilson, 1971; Brzin et al, 1983; Rotundo, 1983; Rakonczay, 1986); el di-isopropil-fluorofosfato (DFP) que inhibe a la AChE



**Figura 6.** Sitio activo de la Acetilcolinesterasa. El nitrógeno cuaternario de la acetilcolina se une al subsitio aniónico. El grupo hidroxilo de serina, desplaza a la colina del sustrato durante la acetilación. El grupo ácido AH también participa en la catálisis. Las áreas sombreadas representan las regiones hidrofóbicas del sitio activo (Basado en Brzin et-al, 1983).

en el subsitio del éster, es un inhibidor liposoluble irreversible (Augustinsson, 1957; Froede y Wilson, 1971; Rotundo y Fambrough, 1980a, 1980b; Rotundo, 1983, 1988; Whittaker, 1984; Rakonczay, 1986); el tetra-isopropil-pirofosforamida (iso-OMPA), que inhibe irreversiblemente a la BChE (Augustinsson, 1957; Rotundo, 1983; Whittaker, 1984); y la fisostigmina o eserina, inhibidor liposoluble irreversible del subsitio del éster, actúa preferentemente sobre la AChE, aunque también inhibe a la BChE (Augustinsson, 1957; Froede y Wilson, 1971; Brzin et al, 1983; Rakonczay, 1986; Patocka, 1987; Yu et al, 1988).

#### **e. Distribución de las Colinesterasas.**

Ambas colinesterasas están ampliamente distribuidas en diferentes tejidos de invertebrados y de vertebrados, y son más abundantes en el sistema nervioso. Ya que la AChE hidroliza a la acetilcolina en acetato y colina, durante mucho tiempo se consideró como un marcador de la sinápsis colinérgica (Hutchins y Hollyfield, 1985; Osman y Pourcho, 1985; Millar et al, 1985; Sofroniew et al, 1985; Hutchins, 1987; Ciani et al, 1988; Hiramatsu et al, 1988). En invertebrados se han encontrado ambas colinesterasas en neuronas tanto colinérgicas como no colinérgicas, así como en la pared ventral del cuerpo de las sanguijuelas Hirudo medicinalis y Helobdella triserialis (Fitzpatrick-McElligott y Stent, 1981; Wallace, 1981; Wallace y Gillon, 1982). En la retina de varios vertebrados la AChE se ha localizado histoquímicamente, y ésta tiene una distribución diferente según la especie, pero en general está presente en los somas de las células amacrinas y en la capa plexiforme interna



(en las sinapsis entre células bipolares y células ganglionares, y también en las sinapsis de células amacrinas) (Francis, 1953; Shen et al, 1956; Nichols y Koelle, 1967, 1968; Nichols et al, 1972; Spira, 1976; Hutchins y Hollyfield, 1985, 1987; Millar et al, 1985; Pourcho y Osman, 1986; Hutchins, 1987; Millar y Chubb, 1987).

Recientemente se ha encontrado en el sistema nervioso central de diferentes vertebrados a la AChE asociada a sinápsis no colinérgicas, como son neuronas GABAérgicas, catecolaminérgicas y noradrenérgicas (Greenfield, 1984). Así mismo, la AChE se encuentra en músculo liso y estriado de diferentes vertebrados, en músculos esqueléticos modificados como los órganos eléctricos de ciertos peces, como la anguila eléctrica Electrophorus electricus y la raya eléctrica Torpedo marmorata (Nachmansonn y Wilson, 1955; Massoulié, 1980; Gautron, 1982; Massoulié y Bon, 1982); en células cromafines de las glándulas suprarrenales de bovino (Rotundo, 1983); en células cultivadas del cuerpo carotideo de rata (Nurse, 1987); y en líneas celulares de neuroblastomas de ratón (Rieger et al, 1976; Kimhi et al, 1980; Lucas y Kreutzberg, 1985; Melone et al, 1987).

Por otro lado, se ha encontrado en tejidos no excitables como eritrocitos (Nachmansonn y Wilson, 1955; Rotundo, 1983; Korpela y Tähti, 1988), hígado (Massoulié y Bon, 1982; Brzin et al, 1983; Perelman y Brandman, 1989), riñones (Brzin et al, 1983), placenta (Massoulié y Bon, 1982; Brzin et al, 1983) y suero de algunos vertebrados (Nachmansonn y Wilson, 1955; Massoulié y Bon, 1982; Brzin et al, 1983; Super, 1988).

La BChE se encuentra en casi todos los tejidos mencionados y

puede estar co-existiendo con la AChE o tener una distribución espacial y/o temporal diferente, de esta colinesterasa se desconoce su función, aunque se sugiere que puede estar relacionada con procesos de proliferación celular (Layer, 1983; Layer et al, 1987a, 1987b, 1988a, 1988b),

#### **f. Otras Propiedades.**

Paralelamente a su capacidad de hidrolizar a la acetilcolina, recientemente se ha mostrado que la AChE tiene otras funciones no relacionadas con la transmisión colinérgica. Se ha reportado que la AChE tiene actividad tanto de carboxipeptidasa como de aminopeptidasa, parecida a la de la tripsina (Greenfield, 1984; Small, 1989), por lo que se considera que pudiera participar en el procesamiento de neuropéptidos, y de hecho se ha reportado que hidroliza neuropéptidos in vitro como la sustancia P y las encefalinas (Chubb et al, 1980, 1983a, 1983b; Salipan et al, 1983; Greenfield, 1984; Millar y Chubb, 1984; Small, 1989).

En diferentes regiones del sistema nervioso de mamíferos, la AChE se ha colocalizado en neuronas noradrenérgicas, catecolaminérgicas, GABAérgicas y somatostatinérgicas que no presentan actividad colinérgica (Morgan et al, 1981; Chubb, 1983a; Greenfield, 1984; Robertson et al, 1988a; Small, 1989). La expresión de su actividad puede ser transitoria en varias regiones del cerebro de los vertebrados durante el desarrollo del sistema nervioso central (anterior a la sináptogénesis), lo que sugiere que puede jugar un papel morfogénético en el desarrollo de ciertas conexiones nerviosas (Drews, 1975; Gindi y

Knowland, 1979; Laasberg y Neuman, 1985; Fiedler et al, 1987; Robertson, 1987; Martins-Green y Erickson, 1988; Moody y Stein, 1988; Prusky et al, 1988; Robertson et al, 1988b).

Asimismo, se ha demostrado la actividad de AChE, tanto por métodos histoquímicos como bioquímicos en huevos de erizo de mar y de ascidias antes de la blástula (Drews, 1975), y durante la embriogénesis temprana y tardía de la sanguijuela (Fitzpatrick-McElligott y Stent, 1981); lo que sugiere que la AChE puede ser un marcador de la diferenciación celular y/o jugar un papel importante en la polarización del huevo durante la embriogénesis (Drews, 1975; Fitzpatrick-McElligott y Stent, 1981; Wallace, 1981; Wallace y Gillon, 1982).

Durante la morfogénesis del cerebro y de la retina neural, ambas colinesterasas tienen una distribución espacio-temporal diferente; esto es, pueden localizarse en diferentes regiones, y cuando es en la misma zona la BChE aparece primero que la AChE. De igual manera durante la miogénesis en embriones de pollo, se relaciona a la AChE con la diferenciación de la unidad motora y a la BChE con la dirección de fibras nerviosas (Layer, 1983; Layer et al, 1987a, 1988a, 1988b).

Recientemente, la presencia de AChE se reportó en el EP de pollo durante el desarrollo embrionario (a partir de los 7 días hasta el nacimiento) (Martelly y Gautron, 1988). Asimismo, en cultivos de neuronas de retina de dicho animal con células de EP homólogas, se observó que la BChE se incrementa durante la proliferación celular y su actividad decrece al cesar la mitosis y comenzar la diferenciación, mientras que la AChE incrementa su actividad al iniciarse la diferenciación celular (Vollmer y Layer

1986a, 1986b, 1987). En estos co-cultivos se observó que el EP tiene un efecto inductor en la estratificación de las neuronas de la retina en un arreglo muy similar al que tiene la retina in vivo (Vollmer et al, 1984; Vollmer y Layer, 1986a, 1986b, 1987; Liu et al, 1988). Con base en lo anterior, varios autores han tratado de relacionar la presencia de colinesterasas con la proliferación y diferenciación celular (Vollmer et al, 1984; Vollmer y Layer, 1986a, 1986b, 1987; Liu et al, 1988).

## OBJETIVO

Con base en lo anteriormente expuesto, el presente trabajo pretende determinar histoquímica y bioquímicamente, la presencia de AChE y BChE en las células del epitelio pigmentario de la retina del pollo en cultivo, y a su vez identificar las formas moleculares de dichas enzimas con el uso de gradientes continuos de sacarosa; así como su posible relación con los procesos de proliferación y diferenciación celular.

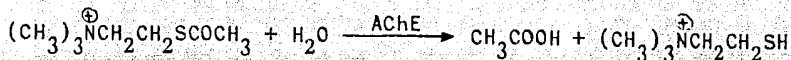
## MATERIALES Y METODOS

**Animales.-** Se utilizaron embriones de pollo White Leghorn de 7 días.

**Aislamiento y Cultivo de las Células.-** Todos los experimentos se realizaron en condiciones de esterilidad. Se sacrificaron por decapitación 25 embriones, se disecaron los ojos, y éstos se colocaron en Ringer Krebs-Bicarbonato (RKB) (Apéndice A). Los ojos se seccionaron ecuatorialmente y se desechó la parte anterior, incluyendo a la retina neural. El EP se desprendió de la copa óptica por medio de unas pinzas de punta fina. Los epitelios así disecados se lavaron cinco veces con RKB, se centrifugaron durante cinco minutos a 25 °C a 500 rpm en una centrífuga CRU 5000 (International Equipment Co., Needham Heights, MA). Después del quinto lavado, se desechó el sobrenadante y se incubó el sedimento a temperatura ambiente durante cinco minutos en tripsina pancreática de bovino (Sigma) al 0.1375% (Apéndice B). Después de la incubación se centrifugó durante cinco minutos a 25 °C a 500 rpm para eliminar el exceso de la proteasa. La tripsina se inactivó al agregar 4 ml de Medio TC-199 (GIBCO) (Apéndice C), que contenía 10% de suero fetal bovino (Sigma) inactivado; L-glutamina (Sigma), 2 mM; penicilina (Sigma) 100 U/ml; estreptomycin (Sigma), 100 mg/ml; NaHCO<sub>3</sub>, 15mM. Los epitelios se pasaron cuatro o cinco veces a través de una aguja espinal a una jeringa de 1 ml, para disociar a las células mecánicamente. Las piezas grandes de tejido se dejaron sedimentar y se obtuvo una suspensión homogénea de células en una

concentración aproximada de 1,200,000 células/ml. La viabilidad de las células se determinó con la prueba del azul tripano y se cuantificó la pureza de la preparación por medio de un hemocítometro, dado que las células del EP se pueden distinguir por la presencia de los gránulos de melanina y por su forma. Las células se sembraron en una densidad de 60,000 células/pocillo (se diluyó en el mismo medio TC-199 completo) en una placa de 96 pozos y se incubaron a 37 °C en una estufa bacteriológica durante diferentes periodos de tiempo ( desde uno hasta 16 días). Para el estudio histoquímico las células se sembraron en placas multipozos que contenian un cubreobjetos de 0.4 x 0.4 cm. La caracterización morfológica del cultivo observada en el presente trabajo se estudió de acuerdo con las observaciones realizadas previamente en el laboratorio (Salceda, datos no publicados), y cada vez que se sacaban las células, se revisaba su estado de diferenciación bajo el microscopio invertido.

**Histoquímica de Acetilcolinesterasa y de Butirilcolinesterasa.**- Los cubreobjetos que contenian a las células cultivadas se sacaron a diferentes días (1, 2, 4, 5 y 7 días) y fueron procesadas por duplicado para la técnica histoquímica de colinesterasas de Karnovsky y Roots, 1964, la cual es una modificación al método de Koelle y Friedenwald (1949), y que utiliza como sustrato a la acetiltiocolina, que es hidrolizada por la AChE en ácido acético y tiocolina (Reacción 1).



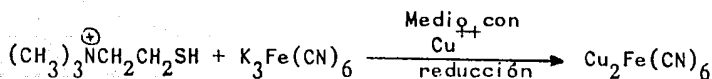
Acetiltiocolina  
(se reduce)

Acido  
Acético

Tiocolina  
(reducida)

Reacción 1

La tiocolina reducida se oxida al reducir el ferricianuro a ferrocianuro, éste último se combina con iones de cobre para formar ferrocianuro de cobre, de color pardo rojizo e insoluble denominado Hatchett's Brown (pardo de Hatchett). El cobre actúa como agente quelante y por ello se compleja con citrato para evitar la formación de ferricianuro de cobre (Karnovsky y Roots, 1964; Bancroft, 1975; Lewis y Knight, 1982) (Reacción 2).



Tiocolina  
(reducida)

Ferricianuro  
de Potasio  
(se reduce)

Ferrocianuro  
de Cobre  
(Precipitado color  
café)

"Hatchett's Brown"

Reacción 2

Para realizar esto, se utilizó la siguiente metodología: Se fijaron las células a 4 °C en formol 10% con 1% CaCl<sub>2</sub> durante catorce horas. Se lavaron con sacarosa 0.88 M en buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 6.0; posteriormente se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución que contenía: yoduro de



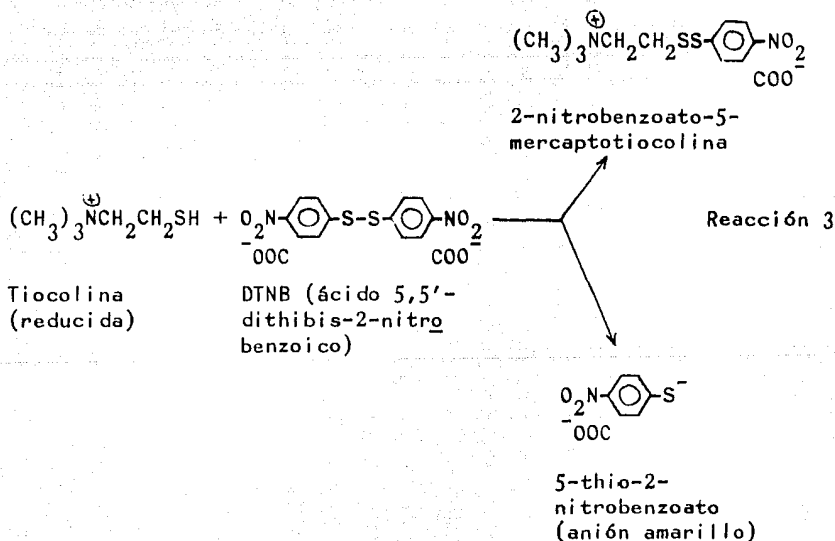
acetiltiocolina, 1.728 mM o butiriltiocolina, 1.576 mM; citrato de sodio, 5 mM; sulfato de cobre, 3 mM; ferricianuro de potasio, 0.5 mM en buffer fosfato de sodio 65 mM pH 6.0. La especificidad de la actividad de AChE se identificó al adicionar al medio de incubación 0.1 mM de iso-OMPA que inhiben a la BChE. La actividad de BChE se identificó al incubar a las células en presencia del sustrato específico (yoduro de butiriltiocolina). Al finalizar la incubación, las muestras se lavaron durante tres minutos con buffer fosfato-sacarosa y se montaron en portaobjetos que se sellaron con gelatina glicerinada. Además se realizaron experimentos controles para AChE y para BChE, al incubar en presencia de 0.1 mM de sulfato de eserina o de iso-OMPA que inhiben respectivamente a la AChE y a la BChE. Otro experimento control fué utilizar cortes de retina de pollo de 8 días de edad, los cuales se incubaron para AChE en presencia de iso-OMPA.

Se eligió éste método por que el precipitado es fino y se produce directamente en el sitio de la actividad enzimática además de ser un método bastante sencillo y fácil de realizar en cortes de tejido o en células cultivadas.

**Determinación Bioquímica de Acetilcolinesterasa y de Butirilcolinesterasa.**- A los diferentes días (1, 2, 4, 5, 7, 10, 12, 13 y 16 días) se eliminó el medio de cultivo, las células de 25 pocillos se lavaron dos veces con RKB, se resuspendieron con un gendarme y se homogenizaron en 0.6 ml de buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 8.0. Se tomó una alícuota de 0.05 ml para cuantificación de proteínas y al resto se le agregó Tritón X-100 a una concentración final de 0.05%. Las actividades de AChE y de

BChE se determinaron en muestras independientes por el método de Ellman et al, 1961.

La reacción se lleva a cabo en dos pasos: el primer paso es la reacción 1, anteriormente descrita. Posteriormente, la tiocolina reducida reacciona con el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y se produce por oxidación el 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina que se reduce al 5-tio-2-nitrobenzoato, anión amarillo cuya absorbencia se puede medir a 412 nm (Reacción 3).



Para determinar esto, se utilizó la siguiente metodología: El medio de incubación consiste en: 2.9 ml de buffer fosfato de

sodio 0.1 M pH 8.0; 0.1 ml de una solución que contiene DTNB 0.01 M en buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 7.0, bicarbonato de sodio 15 mg/ml y 0.1 ml de la muestra. La reacción se inició con 0.02 ml de una solución de yoduro de acetiltiocolina o de butiriltiocolina en agua, a una concentración final de 0.48 mM La reacción se siguió a 412 nm durante 10 minutos en un espectrofotómetro Carl Zeiss. La concentración de AChE se determinó mediante el coeficiente de extinción molar del compuesto coloreado formado que es  $1.36 \times 10^4$  (Ellman, 1959; Ellman et al, 1961). La actividad de AChE o BChE específica se obtuvo de la diferencia en densidad óptica observada en determinaciones paralelas en presencia de 0.1 mM de sulfato de eserina o de 0.1 mM iso-OMPA respectivamente.

**Determinación de proteínas.-** La concentración de proteína en las muestras se determinó de acuerdo al método de Lowry et al, 1951, que utiliza albúmina de suero bovino como estándar.

**Análisis de las Formas Moleculares de Acetilcolinesterasa y de Butirilcolinesterasa.-** El análisis se realizó en células del EP de 1 y 4 días de cultivo de acuerdo al método de Villafruela et al, 1980, 1981. El medio de cultivo se centrifugó a 4,500 rpm durante cinco minutos y se congeló el sobrenadante. Las células de 84 pocillos se homogenizaron en buffer Tris-HCl 0.01 M pH 7.0 que contenía NaCl, 1 M; MgCl<sub>2</sub>, 50 mM y 1% de Tritón X-100, y se centrifugaron a 4,500 rpm durante diez minutos y se congeló el sobrenadante. Una alícuota de los sobrenadantes (medio de cultivo

o de células) (0.5 ml) se agregó sobre un gradiente continuo de sacarosa de 5 a 20% en buffer Tris-HCl pH 7.0; NaCl, 1M y MgCl<sub>2</sub>, 50 mM. Se centrifugó a 40,000 rpm en un rotor SW40 (Beckmann) durante 20 horas a 4 °C. Fracciones de 0.75 ml cada una (16 fracciones) se obtuvieron con la ayuda de una bomba polistáltica. La actividad de AChE y BChE se determinó en dos experimentos independientes por 30 minutos de incubación a temperatura ambiente en presencia del sustrato como se describió anteriormente (Ellman et al, 1961). Las enzimas marcadoras, catalasa 0.75 mg/ml (11.3 S) (Villafruela et al, 1981) y deshidrogenasa alcohólica 2.2 mg/ml (4.8 S) (Martelly y Gautron, 1988) se sometieron (en tubos separados) a las mismas condiciones experimentales de las células y los medios, la cantidad de enzima en las fracciones se determinó por separado por su absorbencia a 280 nm. La actividad de cada enzima se expresó en unidades arbitrarias de densidad óptica relativa, se consideró en cada caso el valor del pico más alto como 1.0 y los demás valores se refirieron a ese pico.

**Características del Epitelio Pigmentario en Cultivo.-** La morfología de las células del EP se estudió durante todos los días del cultivo bajo un microscopio invertido. Las células recién aisladas del EP de embrión de pollo de 7 días, son esféricas, pigmentadas o no pigmentadas. Practicamente todas las células se adherieren al fondo de la placa multipozos después de 2 horas de sembradas. A las 24 horas de cultivo (Figura 7a), las células aplanadas, alargadas y fusiformes, presentan procesos, los cuales desaparecen durante la división celular. Tienen uno o dos núcleos visibles y casi no contienen gránulos de melanina. Entre el segundo y el tercer día (Figura 7b), las células están en proliferación activa, lo que resulta en un aumento en la cantidad de proteína (Gráfica 1). Posteriormente las células alcanzan la confluencia, dada por la migración de las células, lo que da como resultado la formación de una monocapa. Entre el cuarto y quinto día (Figura 7c), las células dejan de dividirse y empieza la diferenciación, adquieren forma poligonal y comienzan a sintetizar gránulos de pigmento. A partir del séptimo día (Figura 7d y 7e), la monocapa está constituida por células diferenciadas, es decir, por células poligonales con gránulos de pigmento, que tienen una morfología muy similar al EP in vivo.

**Histoquímica de Colinesterasas.-** La actividad de colinesterasas en las células del EP se estudió histoquímicamente durante diferentes días del cultivo (1, 2, 4, 5 y 7 días). La estimación de la intensidad de coloración dada por el producto de

reacción se hizo de acuerdo con el siguiente criterio: (+) intensidad de coloración muy baja y presente en muy pocas células; (++) intensidad de coloración baja y presente en la mayoría de las células; (+++) intensidad de coloración media y presente en la mayoría de las células. Del primer al tercer día (Figuras 8a y 8b), las actividades de AChE y de BChE, estimadas por la intensidad de coloración dada por el producto de reacción, son muy bajas (+) y sólo algunas células presentan reacción positiva. Al cuarto día, la actividad de AChE (Figura 9a) aumenta ligeramente en la mayoría de las células (++) con respecto a los días anteriores, mientras que la BChE (Figura 9b) está presente en un número reducido de células (+). Al quinto día, las células que están morfológicamente diferenciadas, presentan una notable reacción positiva de la actividad de AChE (+++) (Figura 10a), mientras que la BChE (++) (Figura 10b) está presente sólo en las células que continúan alargadas y no se han diferenciado. Al incubar las muestras (homogenados de células de EP o medios de cultivo) en presencia del yoduro de acetiltiocolina más iso-OMPA, el producto de reacción formado se debe sólo a la actividad de la AChE, dado que la BChE, que también puede hidrolizar dicho sustrato, se inhibe con el iso-OMPA. En cambio, al incubar las muestras en presencia únicamente de yoduro de butiriltiocolina, el producto de reacción formado se debe sólo a la actividad de la BChE, ya que dicho sustrato sólo lo puede hidrolizar la BChE. Las muestras incubadas sin el sustrato, al igual que aquellas incubadas en presencia del sustrato y de su respectivo inhibidor; 0.1 mM de sulfato de eserina para la AChE y 0.1 mM de iso-OMPA para la BChE; no presentan reacción positiva (resultados no

mostrados). Asimismo, en la retina de pollo de 8 días de nacido, utilizada como control positivo (Figura 11), la actividad de AChE se observó en la capa de células ganglionares y sus fibras, en la capa plexiforme interna en la que la reacción se presenta en forma estratificada, y en la capa de células amacrinas y horizontales, lo que coincide con las observaciones hechas por Francis (1953) y Shen et al (1956).

**Determinación Bioquímica de la Actividad de Colinesterasas en Células del Epitelio Pigmentario.**- La actividad de AChE en las células del EP no presenta variaciones significativas durante los días del cultivo (Gráfica 2). Al tiempo cero del cultivo, la actividad de AChE es de  $9.5 \pm 1.4$  nmoles/min/mg de proteína, disminuye a las 24 horas de cultivo con una actividad de  $6.9 \pm 1.7$  nmoles/min/mg de proteína, la cual permanece constante durante los siguientes días del cultivo. La actividad de BChE en las células (Gráfica 3) al tiempo cero del cultivo es de  $4.4 \pm 1.0$  nmoles/min/mg de proteína, y se mantiene constante durante todos los días del cultivo. Paralelamente se estudió la actividad de AChE y de BChE presente en el medio de cultivo. La AChE en dichos medios (Gráfica 4) aumenta continuamente del primer día ( $18.3 \pm 5.9$  nmoles/min/ml) hasta el séptimo día en el que presenta una actividad de  $60.4 \pm 14.2$  nmoles/min/ml. La actividad se incrementa notablemente en el décimo día ( $119.8 \pm 28$  nmoles/min/ml) y posteriormente no presenta variaciones significativas. La actividad de BChE presente en el medio al primer día de cultivo ( $2.8 \pm 1.4$  nmoles/min/ml) (Gráfica 5) fue

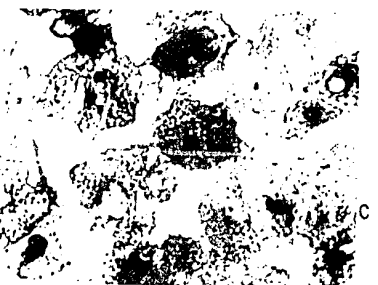
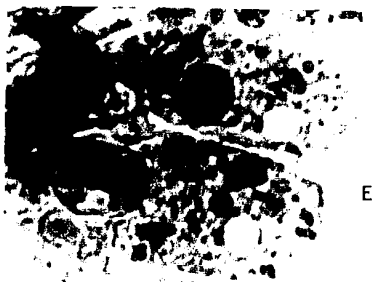
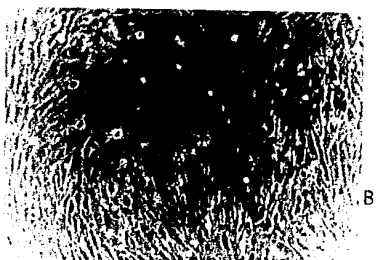
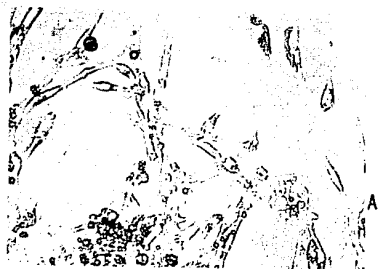
seis veces menor a la observada para la AChE, disminuye al segundo día ( $0.6 \pm 0.3$  nmoles/min/ml), al cuarto día aumenta ( $1.5 \pm 0.6$  nmoles/min/ml) y posteriormente no presenta cambios significativos. La actividad de AChE se inhibió un 98% con sulfato de eserina y la actividad de BChE del 86% al 91% con el iso-OMPA, durante todos los días del cultivo.

**Formas Moleculares de Acetilcolinesterasa y de Butirilcolinesterasa.**- Las formas moleculares de AChE y BChE de células del EP se estudiaron a uno y cuatro días de cultivo. En la caracterización de estas formas moleculares se utilizaron como enzimas marcadoras a la catalasa y a la deshidrogenasa alcohólica (Gráfica 6) que tienen coeficientes de sedimentación de 11.3s (Villafruela et al, 1981) y 4.8s (Martelly y Gautron, 1988) respectivamente. Al primer día de cultivo, las formas de AChE asociadas a las células (Gráfica 7), parecen corresponder a la  $A_{12}$  (19S), y en dos veces menor proporción están la  $G_4$  (10.3S), la  $G_2$  (6.5S), y la  $G_1$  (4.5S). A los cuatro días de cultivo se presentan las mismas formas moleculares; sin embargo la  $G_1$  (4.5S) se encuentra en menor proporción con respecto a la  $A_{12}$  (19S), la  $G_4$  (10.3s) y la  $G_2$  (6.5s), que se presentan en proporciones semejantes. La BChE presenta como forma dominante al primer día de cultivo a la  $A_6$  (16.1S) y como picos menores a la  $G_4$  (10.3S) (tres veces menos),  $G_2$  (6.5s) (siete veces menos) y  $G_1$  (4.5S) (dos veces menos). Al cuarto día de cultivo, la forma  $A_6$  (16.1S) desaparece y la  $G_4$  (10.3S), se convierte en la forma dominante, se observan como picos menores las formas  $G_2$  (6.5s) (siete veces menos) y  $G_1$  (4.5S) (tres veces

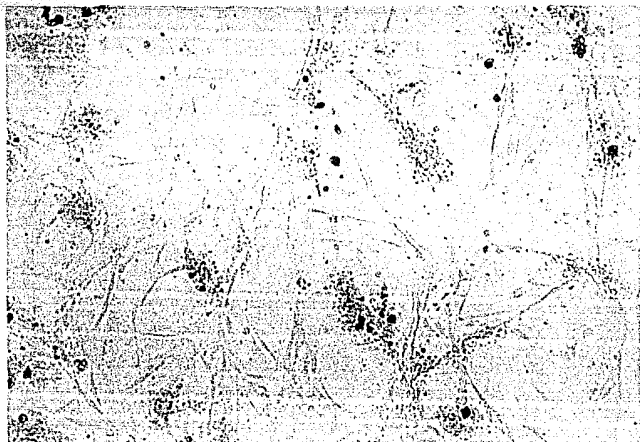


menos) recorrida un poco a la izquierda (con respecto a la posición de la  $G_1$  al primer día).

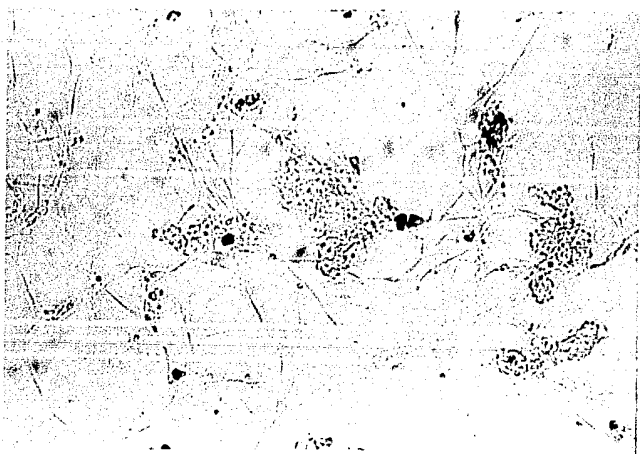
Asimismo se estudiaron las formas moleculares de AChE y de BChE presentes en los medios de cultivo de las células del EP. Al primer día de cultivo (Gráfica 9), se observa la presencia de dos formas moleculares de AChE, la forma principal es la  $G_4$  (10.3S) y en una proporción tres veces menor a la  $G_2$  (6.5s). Al cuarto día de cultivo únicamente se observa la forma  $G_4$  (10.3S). La BChE al primer día de cultivo (Gráfica 10) presenta como forma dominante a la  $G_4$  (10.3S) y en una proporción cuatro veces menor a la  $G_2$  (6.5s) y a la  $G_1$  (4.5S), mientras que la  $A_{12}$  (19S) se presenta en una relación diez veces menor que la  $G_4$ . A los cuatro días de cultivo se presenta la  $G_4$  (10.3S) como forma principal y la  $G_1$  (4.5S) en una proporción diecisiete veces menor que a  $G_4$ .



**Figura 7.** Cultivos primarios de células del epitelio pigmentario de la retina de embrión de pollo de 7 días. A, células aplanadas, alargadas y fusiformes después de 24 horas de sembradas. B, células en confluencia entre el segundo y tercer día. C, células en monocapa durante el proceso de diferenciación y síntesis de melanina entre el cuarto y quinto día de cultivo. D, monocapa con células diferenciadas al séptimo día. E, células diferenciadas al séptimo día a un mayor aumento, notese su forma poligonal, su núcleo, sus gránulos de melanina y su gota de lípido transparente. Todas las fotos están tomadas en campo claro, A 320x, B 200x, C 400x, D 400x, E 720x.

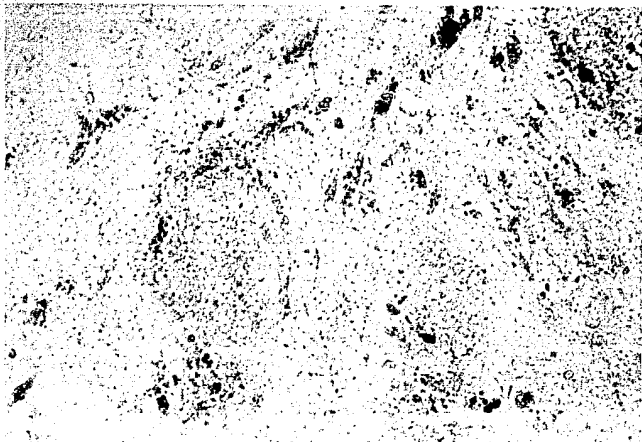


A



B

**Figura 8.** Actividad de colinesterasas en células del epitelio pigmentario de la retina de pollo después de un día de cultivo (muestra representativa). A, Acetilcolinesterasa, las células se incubaron en presencia de yoduro de acetiltiocolina y de iso-OMPA. B, Butirilcolinesterasa, las células se incubaron en presencia de yoduro de butiriltiocolina y en ausencia de inhibidores. Las actividades de ambas enzimas, estimadas por la intensidad de coloración dada por el producto de reacción es muy baja. Campo claro, 150x.

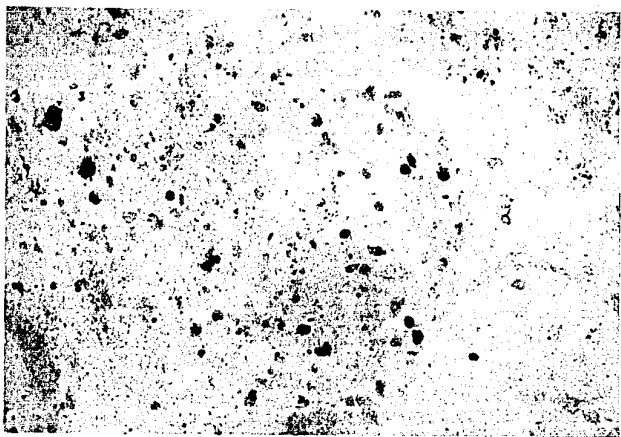


A

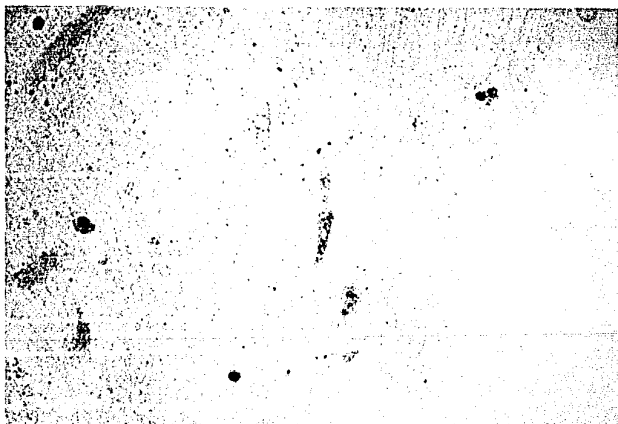


B

**Figura 9.** Actividad de colinesterasas en células del epitelio pigmentario de la retina de pollo después de 4 días de cultivo (muestra representativa). A, Acetilcolinesterasa, las células se incubaron en presencia de yoduro de acetiltiocolina y de iso-OMPA. La actividad aumenta con respecto a los días anteriores en la mayoría de las células. B, Butirilcolinesterasa, las células se incubaron en presencia de yoduro de butiriltiocolina y en ausencia de inhibidores. La actividad está presente en un número reducido de células. Campo claro, A 150x, B 480x.



A

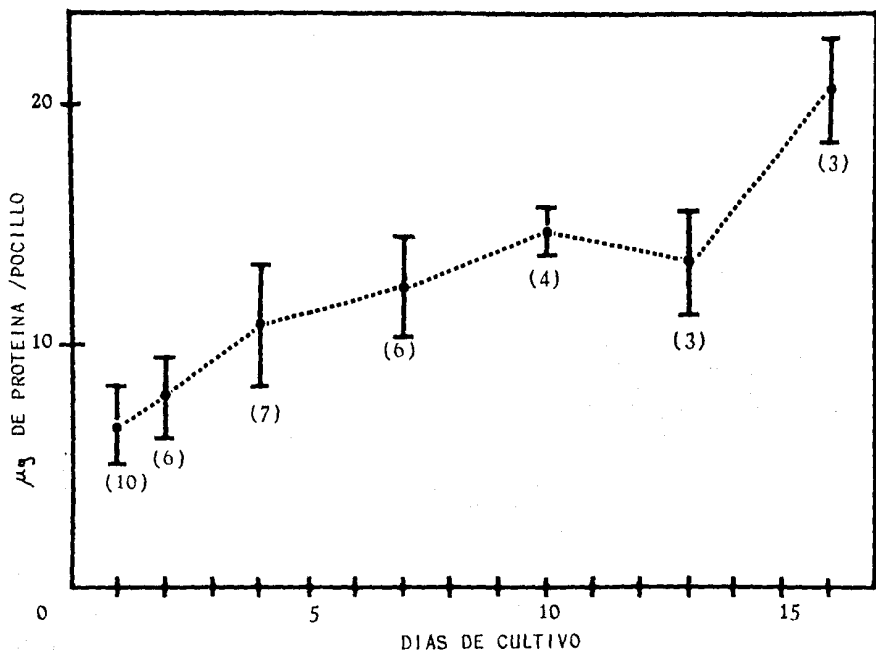


B

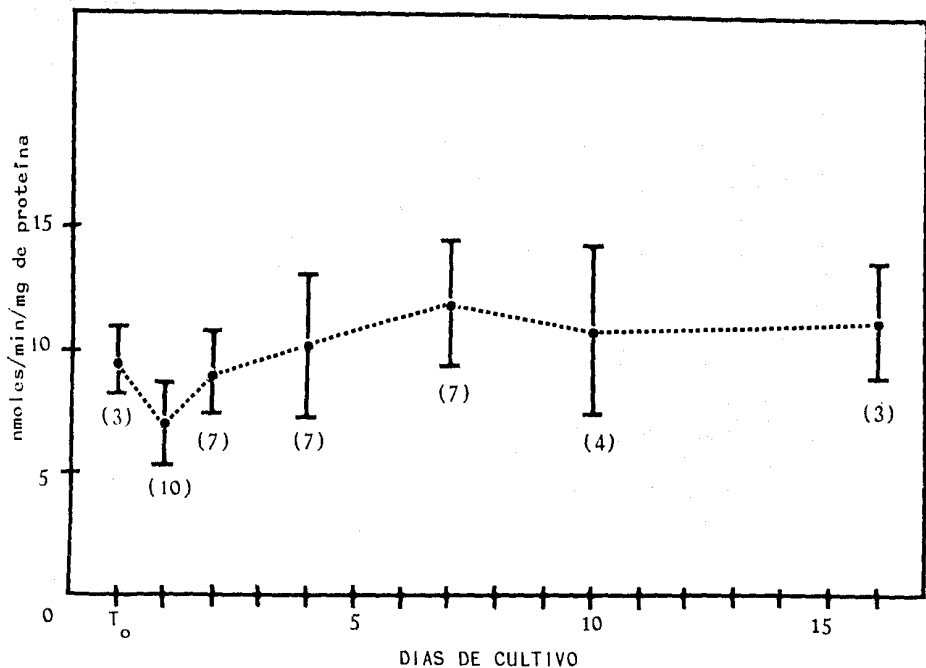
**Figura 10.** Actividad de colinesterasas en células del epitelio pigmentario de la retina de pollo después de 5 días de cultivo (muestra representativa). A, Acetilcolinesterasa, las células se incubaron en presencia de yoduro de acetiltiocolina y de iso-OMPA. La actividad se localiza principalmente en las células diferenciadas (redondas). B, Butirilcolinesterasa, las células se incubaron en presencia de yoduro de butiriltiocolina y en ausencia de inhibidores. La actividad se presenta en las células que continúan alargadas y no se han diferenciado. Campo claro, 480x.



**Figura 11.** Corte transversal de la retina de pollo de 8 días de nacido que muestra la distribución de la actividad de Acetilcolinesterasa de acuerdo al método de Karnovsky y Roots (control positivo). El tejido se fijó durante 14 horas en formol 10%-CaCl<sub>2</sub> 1%, se cortó por congelación y se incubó en presencia de yoduro de acetiltiocolina y de iso-OMPA durante 2 horas. El producto de la reacción de color café rojizo se localiza en la capa de células ganglionares y sus figuras (CCG), en la capa plexiforme interna (CPI) (distribución del producto de reacción en bandas) y en la capa nuclear interna (CNI) (células amacrinas y horizontales). Campo claro, 375x.

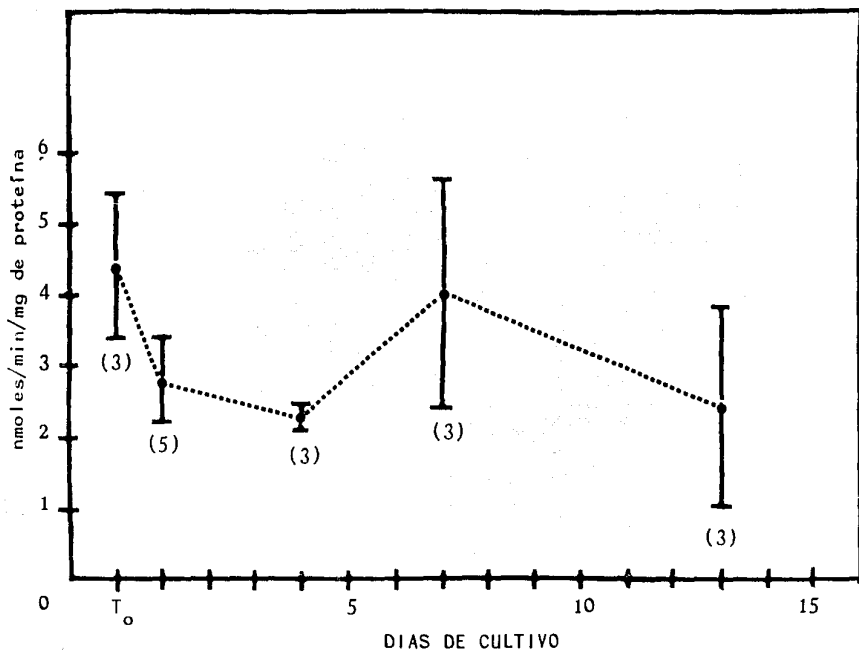


**GRAFICA # 1.-** Curso temporal de la concentración de proteína de células del epitelio pigmentario de retina de pollo. Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar del número de experimentos independientes indicados en el paréntesis.

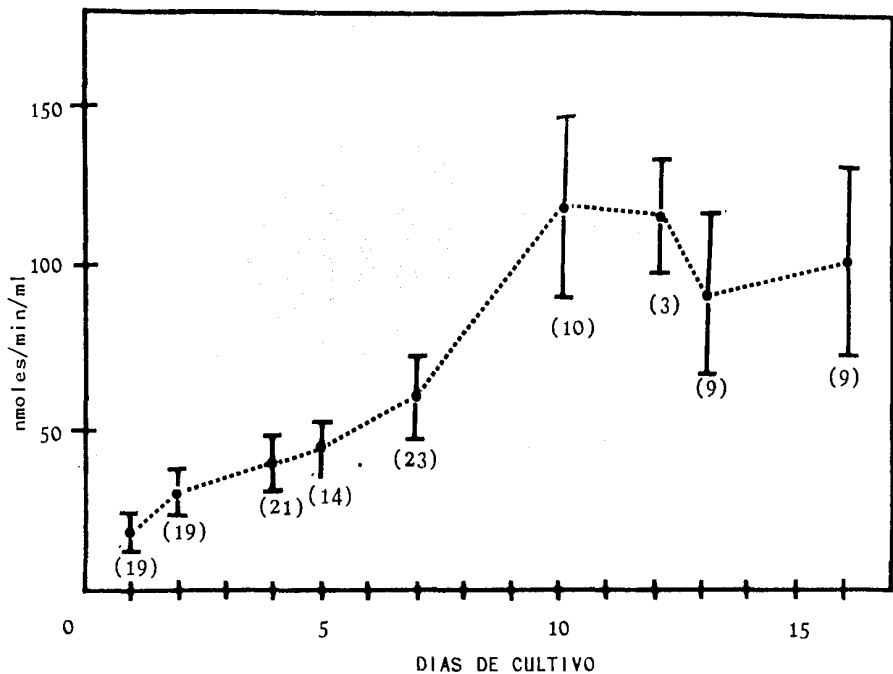


**GRAFICA # 2.-** Curso temporal de la actividad de Acetilcolinesterasa en células del epitelio pigmentario de retina de pollo. Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar del número de experimentos independientes indicados en el paréntesis. La significancia entre el 1° y 7° día de cultivo dada por la prueba de "t" es menor de 0.5.

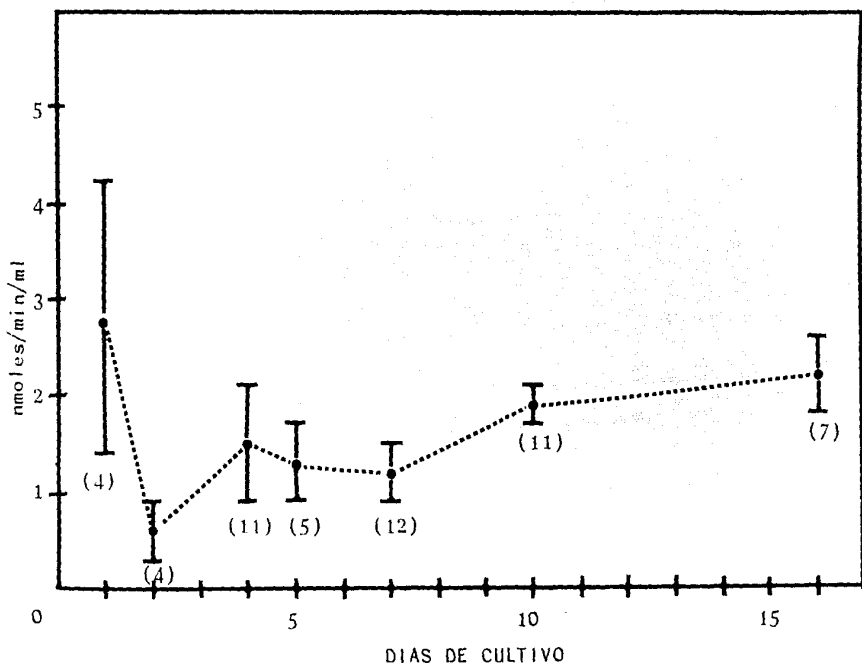




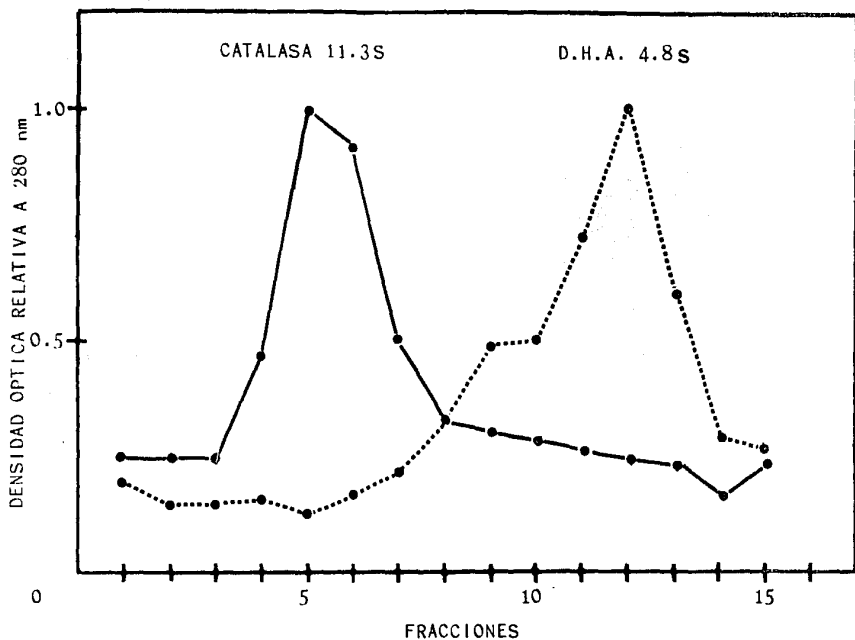
GRAFICA # 3.- Curso temporal de la actividad de Butirilcolinesterasa en células del epitelio pigmentario de retina de pollo. Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar del número de experimentos independientes indicados en el paréntesis.



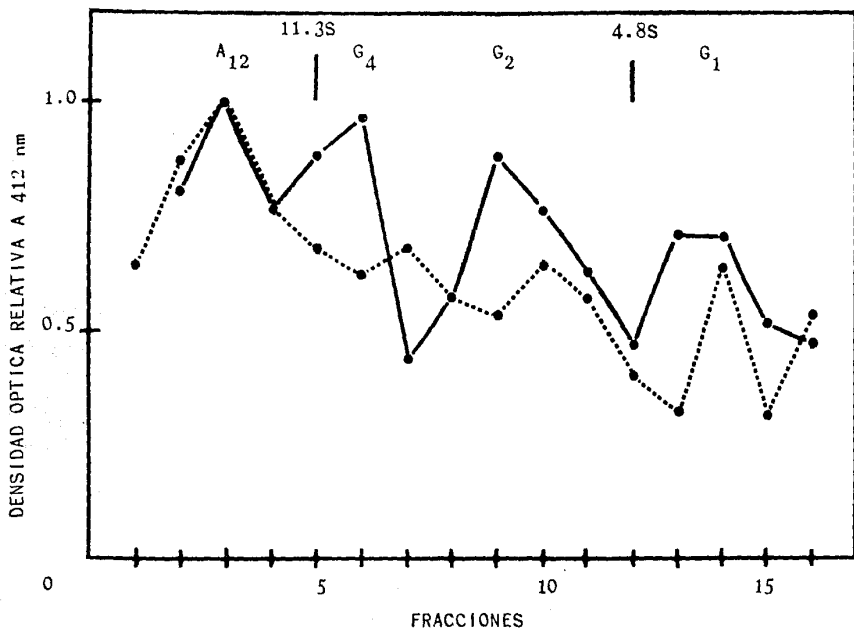
**GRAFICA # 4.-** Curso temporal de la actividad de Acetilcolinesterasa en los medios de cultivo de células del epitelio pigmentario de retina de pollo. Los valores son el promedio  $\pm$  error estándar del número de experimentos independientes indicados en el paréntesis. La significancia entre el 1° y 7° día de cultivo dada por la prueba de "t" es menor de 0.02; y entre el 7° y 10° día de cultivo es menor de 0.05



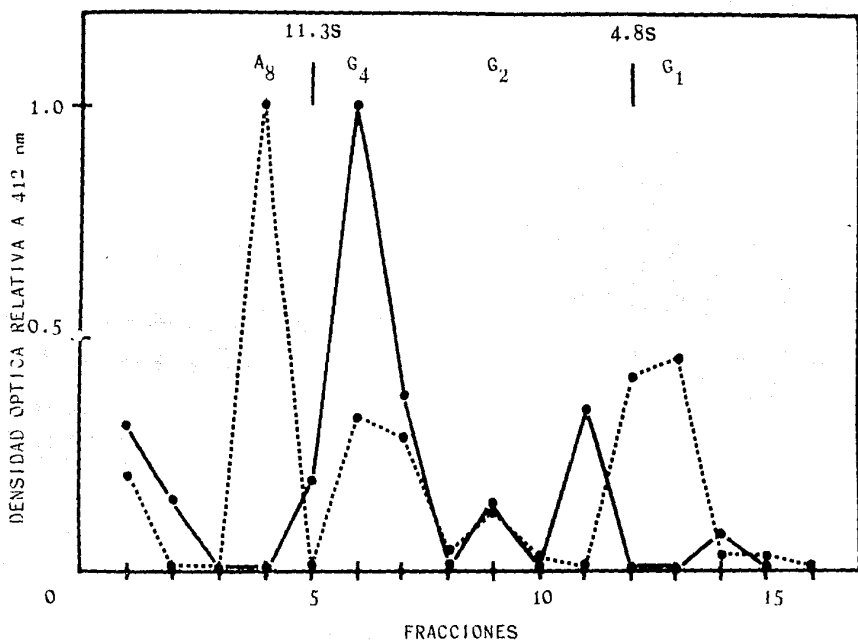
GRAFICA # 5.- Curso temporal de la actividad de Butirilcolinesterasa en los medios de cultivo de células del epitelio pigmentario de retina de pollo. Los valores son el promedio  $\pm$  el error estándar del número de experimentos independientes indicados en el paréntesis.



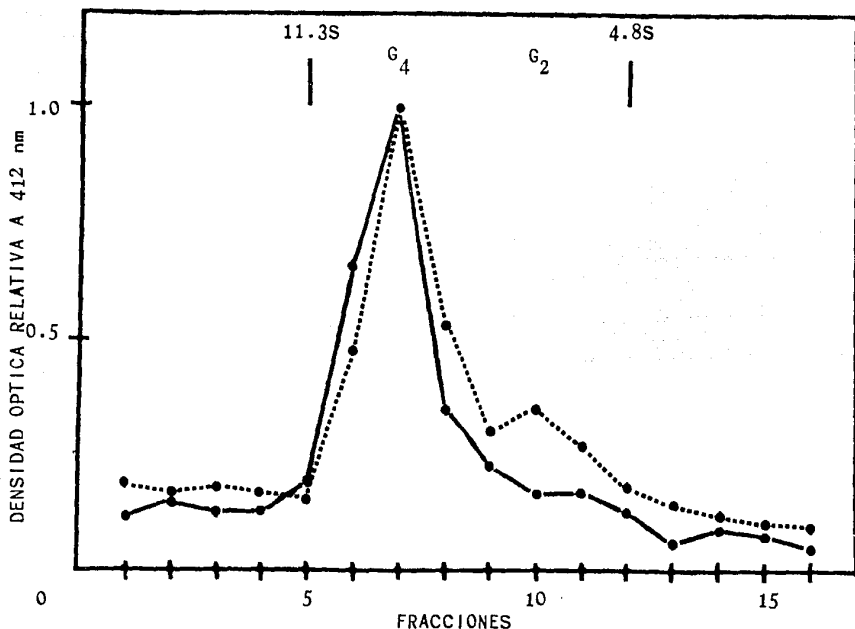
**GRAFICA # 6.-** Coeficientes de sedimentación en gradientes continuos de sacarosa de 5 a 20%, de las enzimas marcadoras: catalasa (11.3S) y deshidrogenasa alcohólica (4.8S), colectados en 15 fracciones de 0.75 ml cada una. Las actividades representadas son los promedios de dos experimentos independientes y están expresadas en unidades arbitrarias de densidad óptica relativa a 280 nm; se consideró en cada caso el valor del pico más alto como 1.0 y los demás valores se refieren a ese pico.



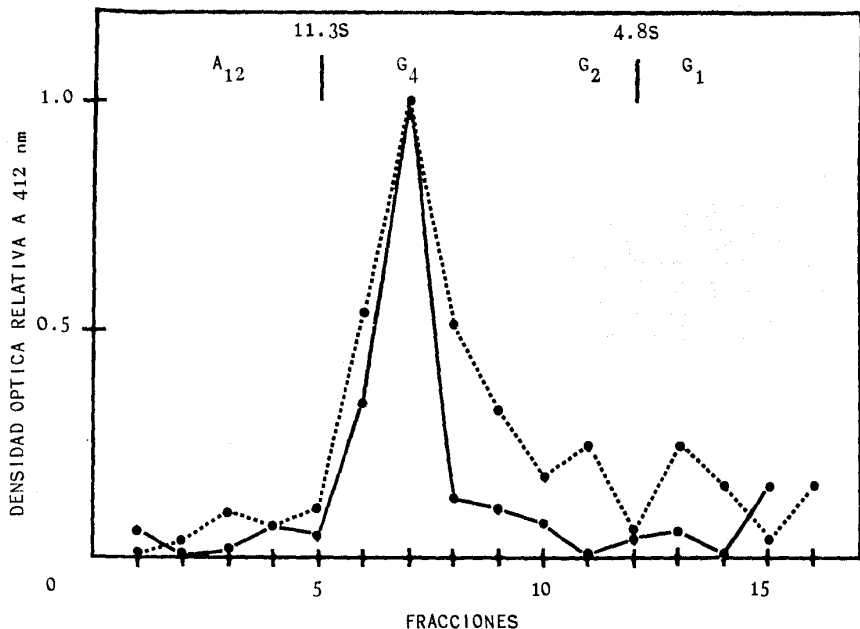
GRAFICA # 7.- Coeficientes de sedimentación en gradientes continuos de sacarosa de 5 a 20%, de las formas moleculares de Acetilcolinesterasa en células del epitelio pigmentario de retina de pollo en cultivo, colectados en 16 fracciones de 0.75 ml cada una. La línea punteada representa las formas moleculares a un día de cultivo y la línea continua las formas moleculares a los cuatro días de cultivo. Los coeficientes de sedimentación de las enzimas marcadoras están indicados por barras. Las actividades representadas son los promedios de dos experimentos independientes y están expresadas en unidades arbitrarias de densidad óptica relativa a 412 nm; se consideró en cada caso el valor del pico más alto como 1.0 y los demás valores se refieren a ese pico.



**GRAFICA # 8.-** Coeficientes de sedimentación en gradientes continuos de sacarosa de 5 a 20%, de las formas moleculares de Butirilcolinesterasa en células del epitelio pigmentario de retina de pollo en cultivo, colectados en 16 fracciones de 0.75 ml cada una. La línea punteada representa las formas moleculares a un día de cultivo y la línea continua las formas moleculares a los cuatro días de cultivo. Los coeficientes de sedimentación de las enzimas marcadoras están indicados por barras. Las actividades representadas son los promedios de dos experimentos independientes y están expresadas en unidades arbitrarias de densidad óptica relativa a 412 nm; se consideró en cada caso el valor del pico más alto como 1.0 y los demás valores se refieren a ese pico.



**GRAFICA # 9.-** Coeficientes de sedimentación en gradientes continuos de sacarosa de 5 a 20%, de las formas moleculares de Acetilcolinesterasa en los medios de cultivo de células del epitelio pigmentario de retina de pollo, colectados en 16 fracciones de 0.75 ml cada una. La línea punteada representa las formas moleculares a un día de cultivo y la línea continua las formas moleculares a cuatro días de cultivo. Los coeficientes de sedimentación de las enzimas marcadoras están indicados por barras. Las actividades representadas son los promedios de dos experimentos independientes y están expresadas en unidades arbitrarias de densidad óptica relativa a 412 nm; se consideró en cada caso el valor del pico más alto como 1.0 y los demás valores se refieren a ese pico.



GRAFICA # 10.- Coeficientes de sedimentación en gradientes continuos de sacarosa de 5 a 20%, de las formas moleculares de Butirilcolinesterasa en los medios de cultivo de células del epitelio pigmentario de retina de pollo, colectados en 16 fracciones de 0.75 ml cada una. Lá línea punteada representa las formas moleculares a un día de cultivo y la línea continua las formas moleculares a cuatro días de cultivo. Los coeficientes de sedimentación de las enzimas marcadoras están indicados por barras. Las actividades representadas son los promedios de dos experimentos independientes y están expresadas en unidades arbitrarias de densidad óptica relativa a 412 nm; se consideró en cada caso el valor del pico más alto como 1.0 y los demás valores se refieren a ese pico.



## DISCUSION

La participación de la BChE y de la AChE en los procesos de proliferación y diferenciación de las células, se estudió en cultivos primarios de células de EP. Al estudiar las características de estos cultivos, se observó que las células del EP en cultivo presentan inicialmente un periodo de proliferación y posteriormente se diferencian. Durante los primeros dos días las células se encuentran en periodo de proliferación; entre el segundo y tercer día de cultivo las células alcanzan la confluencia; resultados previos en el laboratorio demostraron que las células incorporan timidina tritiada hasta las 42 horas (Salceda, datos no publicados), de modo que el aumento observado en la cantidad de proteína, puede indicar el crecimiento de las células. El periodo de diferenciación comienza entre el cuarto y quinto día de cultivo y se caracteriza porque las células dejan de dividirse, adoptan una forma poligonal y aumenta la síntesis de melanina. A partir del séptimo día de cultivo, la monocapa está constituida por células diferenciadas. La caracterización morfológica de las células del EP en el presente trabajo es muy similar a la descrita para el EP de rata, de gato, y de bovino (Chader et al. 1975; Albert y Buyukmihci, 1979; Tsunematsu et al. 1981; Basu et al. 1983; Stramm et al. 1983; Heth et al. 1987).

Los estudios histoquímicos, con base en la intensidad de coloración del producto de reacción, muestran que la AChE y BChE están presentes en las células del EP durante todas las etapas del cultivo. El hecho de que la BChE se presente preferentemente

en las células en etapa de proliferación, mientras que la AChE se localice en células diferenciadas sugiere que estas enzimas pueden ser utilizadas como marcadoras de la proliferación y diferenciación celular respectivamente, como lo han postulado Layer (1983) durante la morfogénesis del cerebro del pollo y Vollmer y Layer (1986a, 1987) en neuronas de retina de pollo en cultivo y co-cultivo con células del EP homólogas.

De acuerdo con los resultados histoquímicos ya discutidos, la determinación bioquímica de ambas colinesterasas por el método colorimétrico de Ellman et al, 1961, indican que dichas enzimas se encuentran en las células del EP durante todas las etapas del cultivo. Las actividades reportadas corresponden efectivamente a las células del EP, ya que no existe contaminación de otros tipos celulares. Aunque al principio del cultivo existen algunos eritrocitos, los que pudieran contribuir en la actividad de la AChE, la contaminación es muy baja (menor del 2%) y durante el primer día del cultivo son fagocitados por las células del EP (Nachmansonn y Wilson, 1955; Korpela y Tähti, 1988). La actividad de la AChE y de la BChE en las células del EP tienden a mantenerse constantes durante todo el cultivo, aunque los niveles de la AChE son tres veces mayores que los de la BChE. Los valores obtenidos de la actividad de AChE en las células concuerdan con los niveles reportados en los co-cultivos de neuronas de retina de pollo con células del EP del mismo animal (Vollmer y Layer, 1987). Al analizar las formas moleculares, se observó que la molécula  $A_{12}$  (19S) es la forma principal de AChE en las células del EP al primer día de cultivo, mientras que al cuarto día las formas  $A_{12}$  (19S),  $G_4$  (10.3S) y  $G_2$  (6.5S) son las moléculas de

ACHe que se encuentran en mayor proporción. Las formas moleculares de AChE obtenidas en el presente trabajo, concuerdan muy bien con aquellas encontradas por Martelly y Gautron, 1988 en homogenados de células del EP de embrión de pollo de 7 días, por lo que se tomó los coeficientes de sedimentación reportados por estos autores como referencia para asignar los valores de las formas moleculares encontradas en las células del EP en cultivo. Resulta interesante que al cuarto día esté presente la forma molecular  $G_4$  (10.3s), ya que se ha visto que ésta forma es predominante en cultivos de células diferenciadas de neuroblastoma, y que las formas ligeras son dominantes en cultivos con células en división o en confluencia (Kimhi et al, 1980). Asimismo se ha observado que la forma  $G_4$  (10.3S) se incrementa en el cerebro de rata a partir del nacimiento, mientras que las formas globulares ligeras son dominantes durante la embriogénesis y maduración del cerebro (Rieger et al, 1976). Por otro lado, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la forma principal de BChE al primer día de cultivo es la  $A_6$  (16.1S), y que se presentan en menor proporción las formas  $G_4$  (10.3S),  $G_2$  (6.5S) y  $G_1$  (4.5S); en cambio, al cuarto día de cultivo, la forma dominante de BChE es la  $G_4$  (10.3S) y la  $A_6$  (16.1S) desaparece, debido posiblemente a que fue utilizada o degradada por las mismas células del EP, dado que las formas moleculares de AChE o de BChE una vez ensambladas son estables y no se interconvierten (Rotundo, 1988); las formas  $G_2$  (6.5S) y  $G_1$  (4.5S) permanecen sin cambios significativos.

Por otro lado, la actividad de la AChE en el medio de cultivo, aumenta durante los primeros siete días y se incrementa

significativamente al décimo día. La AChE liberada al medio de cultivo representa a la enzima secretada, dado que su actividad es nueve veces mayor que la actividad de AChE localizada en las células, por lo que no es factible que dicha actividad se deba a la ruptura de las células durante el cultivo, pues el incremento no sería el mismo. Asimismo, la actividad de AChE presente en el medio de cultivo, es cuarenta veces superior a la actividad de BChE secretada y veinticinco veces más grande que la actividad de BChE presente en las células. Estos resultados sugieren que la mayor parte de la AChE sintetizada por las células del EP, es liberada al medio extracelular, mientras que la mayor proporción de BChE permanece dentro de las células (el doble de la enzima secretada). En este trabajo se aportan evidencias de que la forma globular G<sub>4</sub> (10.3S), tanto de AChE como de BChE, es la molécula secretada en mayor proporción por las células del EP, como ocurre con otros tipos celulares en cultivo, tales como las células musculares de pollo, las líneas celulares de neuroblastoma de ratón, co-cultivos de neuronas de retina de pollo con células de EP homólogas (Kimhi et al, 1980; Rotundo, 1983; Melone et al, 1987; Vollmer y Layer, 1987). Cabe hacer notar que la forma A<sub>4</sub> (8.5S), no se encontró ni en las células del EP, ni en el medio de cultivo.

La liberación de AChE in vitro probablemente refleja un proceso que ocurre in vivo, y nuestros resultados están de acuerdo con aquellos reportados por Kimhi et al, 1980 en los que se observó que cantidades pequeñas pero constantes de AChE se liberan de células nerviosas en organismos vivos. La secreción de AChE parece estar modulada por varios factores, así, los péptidos

neurotróficos como el factor de crecimiento nervioso aumentan dicha secreción a través de incrementar la síntesis de ARN mensajero en líneas celulares de feocromocitoma (tumor de la glándula suprarrenal) (Greene y Rukenstein, 1981; Lucas y Kreutzberg, 1985) al igual que ciertos dipéptidos como la glicil-L-glutamina, que puede regular la transcripción de ADN específico para AChE y BChE en neuronas del ganglio cervical superior del gato (Koelle et al, 1987a, 1987b, 1988a, 1988b; Haynes, 1989).

Se ha especulado mucho acerca del papel que pudiera desempeñar la AChE y la BChE. Se sabe que ambas enzimas están ampliamente distribuidas en diferentes tejidos en los que parecen jugar diferentes papeles (Greenfield, 1984). La existencia de varias formas moleculares de AChE y BChE sugiere la posibilidad de que las distintas formas posean diferentes actividades fisiológicas. La hipótesis de que los neurotransmisores y las enzimas relacionadas con su síntesis y/o degradación estén relacionados en los procesos de maduración durante la morfogénesis, ha sido postulada por varios autores (Drews, 1975; Laasberg y Neuman, 1985; Layer, 1983; Layer et al, 1987a, 1987b, 1988a, 1988b; Vollmer y Layer, 1987). Así, se ha sugerido que la AChE está relacionada con los movimientos morfogenéticos, ya que está presente en etapas de desarrollo muy tempranas precedentes a la sináptogénesis y por lo tanto su acción no parece ser la hidrólisis de la acetilcolina (Drews, 1975; Fitzpatrick-McElligott y Stent, 1981).

También se ha postulado que la AChE puede tener una función trófica. Vollmer y Layer (1987) observaron que el EP juega un papel importante en la inducción de la estratificación de las

neuronas de la retina de pollo. Paralelamente se observó que los niveles de AChE aumentan conforme se establece la estratificación de las neuronas de la retina y la incorporación de timidina tritiada disminuye, estos autores sugieren que la AChE sintetizada por el EP posiblemente sea el modulador que induce dicha organización celular (Vollmer et al, 1984; Vollmer y Layer, 1986a, 1986b, 1987; Liu et al, 1988). De manera semejante se ha observado que factores tróficos sintetizados por el EP, pueden modular la proliferación de otros tejidos oculares, tal como el factor de crecimiento fibroblástico estimula la proliferación de las células endoteliales de los capilares de la coroides (Schweigerer et al, 1987).

El mecanismo por el cual la AChE pudiera regular la proliferación y diferenciación celular no se conoce. Se ha reportado que la acetilcolina induce la proliferación de las células de neuroblastoma y de astrocitos a través de incrementar la síntesis de ADN, efecto que puede estar mediado por receptores muscarínicos (Ashkenazi et al, 1989), los cuales están asociados a la movilización de calcio; un aumento en la concentración intracelular de calcio, induce a su vez un incremento de la proliferación celular (Friedman et al, 1988; Martelly y Gautron, 1988; Osborne et al, 1988). Por lo que estos autores sugieren que la forma  $G_{\alpha}$  (10.3S) de AChE hidroliza a la acetilcolina reduciendo así la proliferación e induciendo la diferenciación celular. Por otro lado se ha reportado que la AChE tiene funciones de peptidasa (Chubb et al, 1980, 1983a, 1983b; Greenfield, 1984; Millar y Chubb, 1984), por lo que se sugiere que la AChE al hidrolizar algún péptido lo active y éste a su vez

desencadene una serie de reacciones cuyo producto final module la proliferación y diferenciación celular.

Por otro lado se sabe que el EP funciona como barrera hematorretiniana, protegiendo a la retina neural del paso de algunas moléculas que circulan en la sangre (Zinn y Benjamin-Henkind, 1979; Clark, 1986). De acuerdo con estos autores, la AChE presente en el EP podría funcionar como un filtro hidrolítico para impedir el paso de acetilcolina del flujo sanguíneo a la retina neural, como se ha sugerido en los hepatocitos (Perelman y Brandman, 1989).

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se obtuvieron cultivos primarios de células del EP de embrión de pollo, en los cuales se les determinó la actividad enzimática de AChE y de BChE, así como sus formas moleculares. Los resultados obtenidos sugieren que la BChE y la AChE están asociadas con los mecanismos de proliferación y diferenciación celular, sin embargo se requieren un mayor número de experimentos para esclarecer esta relación, y el epitelio pigmentario en cultivo pudiera ser un buen modelo para ello.



## BIBLIOGRAFIA

Adler, A. J. and K. M. Klucznik. 1981/82. Interaction of bovine pigment epithelium cells, photoreceptor outer segments and interphotoreceptor matrix: A model for retinal adhesion. Curr. Eye Res. 1(10): 579-589.

Adler, A. J. and K. J. Martin. 1982/83. Lysosomal enzymes in the interphotoreceptor matrix: acid protease. Curr. Eye Res. 2(6): 359-366.

Albert, D. M. and N. Buyukmihci. 1979. Tissue culture of the retinal pigment epithelium. Chap. XVI In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 277-292.

Allemand, P.; S. Bon; J. Massoulié and M. Vigny. 1981. The quaternary structure of chicken acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase; effect of collagenase and trypsin. J. Neurochem. 36: 860-867.

Ashkenazi, A.; J. Ramachandran and D. J. Capon. 1989. Acetylcholine analogue stimulates DNA synthesis in brain-derived cells via specific muscarinic receptors subtypes. Nature. 340(6229): 146-150.

Augustinsson, K. B. 1957. Assay methods for cholinesterases. In: Glick, D. (ed.). Methods of Biochemical Analysis. Vol. 5. Interscience Publ. Inc. New York, pp: 1-64.

Bancroft, J. D. 1975. Histochemical Techniques. 2nd. ed. Butterworths. London. pp: 252-268.

Basu, P. K. ; P. Sarkar; I. Menon; F. Carré and S. Persad. 1983. Bovine retinal pigment epithelial cells cultured in vitro: Growth characteristics, morphology, chromosomes, phagocytosis ability, tyrosinase activity and effect of freezing. Exp. Eye Res. 36(5): 671-683.

Berman, E. R. 1979. Biochemistry of the retinal pigment epithelium. Chap. VI In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 83-102.

Berman, E. R.; H. Schwell and L. Feeney. 1974. The retinal pigment epithelium. Chemical composition and structure. Invest. Ophthalmol. 13(9): 675-687.

Bok, D. and R. W. Young. 1979. Phagocytic properties of the retinal pigment epithelium. Chap. IX In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 148-174.

Bon, S.; M. Vigny and J. Massoulié. 1979. Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 76(6): 2546-2550.

Boulton, M. and J. Marshall. 1985. Repigmentation of human retinal pigment epithelial cells in vitro. Exp. Eye Res. 41; 209-218.

Boulton, M. and J. Marsall. 1986. Effects of increasing numbers of phagocytic inclusions on human retinal pigment epithelial cells in culture: A model for aging. Brit. J. Ophthalmol. 70: 808-815.

Brockman, S. K.; M. F. Usiak and S. G. Younkin. 1986. Assembly of monomeric acetylcholinesterase into tetrameric and asymmetric forms. J. Biol. Chem. 261(3): 1201-1207.

Brzin, M.; J. Sketelj and B. Klinar. 1983. Cholinesterases. In: Lajtha, A. (ed.). Handbook of Neurochemistry. Vol. 4. Enzymes in the Nervous System. 2nd. ed. Plenum Press. New York, pp: 251-292.

Burnside, B. and A. M. Laties. 1979. Pigment movement and cellular contractility in the retinal pigment epithelium. Chap. X In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 175-191.

Caldwell, R. B.; S. M. Slapnick and B. J. McLaughlin. 1987. Quantitative freeze-fracture and filipin-binding study of retinal pigment epithelial-cell basal membranes in diabetic rats. Exp. Eye Res. 44: 245-259.

Carr, R. E. and I. M. Siegel. 1979. The retinal pigment epithelium in ocular albinism. Chap. XXIII In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 413-423.

Chader, G. J.; D. A. Newsome; R. E. Bensinger and R. Th. Fletcher. 1975. Studies on the differentiation of retinal pigmented epithelium cells in culture. Invest. Ophthalmol. 14(2): 108-113.

Chihara, E.; T. Tsukada-Fujioka and I. Tsukahara. 1984. Synthesis of glycosaminoglycans by chick retinal pigment epithelium in vitro. Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 222: 45-50.

Chubb, I. W.; A. J. Hodgson and G. W. White. 1980. Acetylcholinesterase hydrolyses substance P. Neuroscience. 5(12): 2065-2072.

Chubb, I. W.; S. A. Greenfield and A. J. Hodgson. 1983a. Is acetylcholinesterase the biggest "neuropeptide" of them all? Neurosci. Lett. suppl. 11: s6-s7.

Chubb, I. W.; E. Ranieri; G. H. White and A. J. Hodgson. 1983b. The enkephalins are amongst the peptides hydrolyzed by purified acetylcholinesterase. Neuroscience. 10(4): 1369-1377.

Ciani, F.; V. Franceschini and P. del Grande. 1988. Histochemical and biochemical study on the acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the brain and spinal cord of frog Rana esculenta. J. Hirnforsch. 29(2): 157-163.

Clark, V. M. 1986. The cell biology of the retinal pigment epithelium. In: Adler R. and D. Faber (eds.). The Retina. Part II. Academic Press. Florida, pp: 129-168.

Clark, V. M. and M. O. Hall. 1986. Retinal pigment epithelial cell surface proteins in normal and dystrophic rats. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 27(2): 136-144.

Cooper, N. G. F.; B. I. Tarnowski and B. J. McLaughlin. 1987. Lectin-affinity isolation of microvillous membranes from the pigmented epithelium of rat retina. Curr. Eye Res. 6(8): 969-979.

Coulombre, A. J. 1979. Roles of the retinal pigment epithelium in the development of ocular tissues. Chap. IV In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 53-57.

Crawford, B. J. and T. J. Crawford. 1984. Type, location and role of glycosaminoglycans in cloned differentiated chick retinal pigmented epithelium. Tissue Cell. 16(6): 885-908.

Davson, H. 1980 Physiology of the Eye. Academic Press. New York, pp: 1-30.

Docherty, R. J.; J. V. Forrester and J. M. Lackie. 1987. Type I collagen permits invasive behavior by retinal pigmented epithelial cells in vitro. J. Cell Sci. 87: 399-409.

Doctor, B. P.; S. Camp; M. K. Gentry; S. S. Taylor and P. Taylor. 1983. Antigenic and structural differences in the catalytic subunits of the molecular forms of acetylcholinesterase. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 80(18): 5767-5771.

Drews, U. 1975. Cholinesterase in embryonic development. Prog. Histochem. Cytochem. 7: 1-53.

Edwards, R. B. 1981. The isolation and culturing of retinal pigment epithelium of the rat. Vision Res. 21: 147-150.

Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82(1): 70-77.

Ellman, G. L.; K. D. Courtney; V. Andres and R. M. Featherstone. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7: 88-95.

Ennis, S. and Y. W. Kunz. 1984. Ageing of the collagenous layer in Bruch's membrane of the teleost. Cell Biol. Int. Rep. 8(11): 902.

Entani, S.; N. Yoshimura; E. Chihara and I. Tsukahara. 1986. Metabolism of glycoproteins in cultured retinal pigment epithelium. Ophthalmic Res. 18: 104-111.

Essner, E.; R. M. Pino and R. A. Griewski. 1981. Distribution of anionic sites on the surface of retinal pigment epithelial and rod photoreceptor cells. Curr. Eye Res. 1(7): 381-389.

Farber, D. and R. Adler. 1986. Issues and questions in cell biology of the retina. In: Adler, R. and D. Farber (eds.). The Retina. Part I. Academic Press. Florida, pp: 2-16.

Feeney-Burns, L.; Ch. Gao and M. Tidwell. 1987. Lysosomal enzyme cytochemistry of human RPE, Bruch's membrane & drusen. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 28:1138-1147.

Fiedler, E. P.; M. J. Marks and A. C. Collins. 1987. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. J. Neurochem. 49(3): 983-989.

Fitzpatrick-McElligott, S. and G. S. Stent. 1981. Appearance and localization of acetylcholinesterase in embryos of the leech Helobdella triseriatis. J. Neurosci. 1(8): 901-907.

Flood, M. T.; J. E. Haley and P. Gouras. 1984. Cellular Aging of human retinal epithelium in vivo and in vitro. Monogr. Devel. Biol. 17: 80-93.

Francis, C. M. 1953. Cholinesterase in the retina. J. Physiol. 120(3): 435-439.

Friedman, Z.; S. F. Hackett and P. A. Campochiaro. 1988. Human retinal pigment epithelial cells possess muscarinic receptors coupled to calcium mobilization. Brain Res. 446(1): 11-16.

Froede, H. C. y I. B. Wilson. 1971. Acetylcholinesterase. In: Boyer, D. P. (ed.). The Enzymes. Vol. V. Academic Press. New York, pp: 102-111.

Garcia, R. J.; G. Szbo and T. B. Fitzpatrick. 1979. Molecular and cell biology of melanin. Chap. VIII In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 124-147.

Gautron, J. 1982. Ultrastructural localization of acetylcholinesterase. A direct method for light and electron microscopy. Histochemistry. 76: 469-478.

Gibney, G.; K. MacPhee-Quigley; B. Thompson; T. Vedvick; M. G. Low; S. S. Taylor and P. Taylor. 1988. Divergence in primary structure between the molecular forms of acetylcholinesterase. J. Biol. Chem. 263(3): 1140-1145.

Gindi, T. and J. Knowland. 1979. The activity of cholinesterases during the development of Xenopus laevis. J. Embryol. Exp. Morph. 51: 209-215.

Gordon, S. R. and E. Essner. 1987. Investigations on circumferential microfilament bundles in rat retinal pigment epithelium. Eur. J. Cell Biol. 44: 97-104.

Greene, L. A. and A. Rukenstein. 1981. Regulation of acetylcholinesterase activity by nerve growth factor. Role of transcription and dissociation from effects on proliferation and neurite outgrowth. J. Biol. Chem. 256(12): 6363-6367.

Greenfield, S. 1984. Acetylcholinesterase may have novel functions in the brain. Trends Neurosci. 7: 364-368.

Hall, M. O. 1978. Phagocytosis of light- and dark-adapted rod outer segments by cultured pigment epithelium. Science. 202(3): 526-528.

Haynes, L. 1989. Regulation of acetylcholinesterase by a dipeptide. Trends Pharmacol. Sci. 10: 136.

Heller, J. and P. Jones. 1980. Purification of bovine retinal pigment epithelial cells by dissociation in calcium free buffers and centrifugation in Ficoll density gradients followed by "recovery" in tissue culture. Exp. Eye Res. 30: 481-487.

Herman, K. G. and R. H. Steinberg. 1982. Melanosome metabolism in the retinal pigment epithelium of the opossum. Cell Tissue Res. 227: 485-507.

Heth, C. A.; M. A. Yankanckas; M. Adamian and R. B. Edwards. 1987. Characterization of retinal pigment epithelial cells cultures on microporous filters. Curr. Eye Res. 6(8): 1007-1019.

Hiramatsu, K.; T. Watanabe and T. Fujioka. 1988. The distribution of acetylcholinesterase (AChE)-positive nerves in chicken pancreas demonstrated by light and electron microscopy. Arch. Histol. Cytol. 51(2): 159-168.

Hutchins, J. B. 1987. Review: Acetylcholine as a neurotransmitter in the vertebrate retina. Exp. Eye Res. 45: 1-38.

Hutchins, J. B. and J. G. Hollyfield. 1985. Evidence for cholinergic neurotransmission in the human retina. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. ARVO 26 (suppl. 3) 96.

Hutchins, J. B. and J. G. Hollyfield. 1987. Acetylcholinesterase in the human retina. Brain Res. 400(2): 300-311.

Karnovsky, M. J. and L. Roots. 1964. A "direct coloring" thiocholine method for cholinesterases. J. Histochem. Cytochem. 12(3): 219-221.

Katz, M. L. and W. G. Robinson. 1985. Senescence and the retinal pigment epithelium: Alterations in basal plasma membrane morphology. Mech. Age. Dev. 30: 99-105.

Khaskiye, A. and D. Renaud. 1988. Posthatching changes in levels and molecular forms of Ache in slow and fast muscles of the chicken: Effects of denervation and direct electrical stimulation. Differentiation. 39: 28-33.

Kimhi, Y.; A. Mahler and D. Saya. 1980. Acetylcholinesterase in mouse neuroblastoma cells: Intracellular and released enzyme. J. Neurochem. 34(3): 554-559.

Koelle, G. B. and J. S. Friedenwald. 1949. A histochemical method for localizing cholinesterase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70: 617.

Koelle, G. B.; J. Massoulié; D. Eugène; M. A. B. Melone and G. Boula. 1987a. Distributions of molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in nervous tissue of the cat. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 84: 7749-7752.

Koelle, G. B.; U. J. Sanville and N. S. Thampi. 1987b. Direct neurotrophic action of glycyl-L-glutamine in the maintenance of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the preganglionically denervated superior cervical ganglion of the cat. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 84: 6944-6947.

Koelle, G. B.; J. Massoulié; D. Eugène and M. A. B. Melone. 1988a. Effects of glycyl-L-glutamine in vitro on the molecular forms of acetylcholinesterase in the preganglionically denervated superior cervical ganglion of the cat. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85: 1686-1690.

Koelle, G. B.; K. A. Skau; N. S. Thampi; D. M. Hymel and M. S. Hau. 1988b. Maintenance by glycyl-L-glutamine in vivo of molecular forms of acetylcholinesterase in the preganglionically denervated superior cervical ganglion of the cat. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85: 6215-6217.

Koh, S. M. and G. J. Chader. 1983. Chick retinal pigment epithelium. A new culture system for studying H<sub>2</sub>-histamine receptors. FEBS Lett. 164(2): 277-280.

Koh, S. M. and G. J. Chader. 1984. Retinal pigment epithelium in culture demonstrates a distinct  $\beta$ -adrenergic receptor. Exp. Eye Res. 38: 7-13.

Kornzweig, A. L. 1979. Aging of the retinal pigment epithelium. Chap. XXVI In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 478-495.

Korpela, M. and H. Tähti. 1988. Human and rat erythrocyte membranes as a model for studying the effects of organic solvents on membrane-bound acetylcholinesterase *in vitro*. Toxicol. Vitro. 2(2): 135-139.

Kuwabara, T. 1979a. Species differences in the retinal pigment epithelium. Chap. V In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 58-82.

Laasberg, T. and T. Neuman. 1985. Changes in the acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activities in the early development of the chick embryo. Roux Arch. Devel. Biol. 194: 306-310.

LaVail, M. M. and G. M. Gorrin. 1987. Protection from light damage by ocular pigmentation: Analysis using experimental chimeras and translocation mice. Exp. Eye Res. 44(6): 877-889.

Layer, P. G. 1983. Comparative localization of acetylcholinesterase & pseudocholinesterase during morphogenesis of the chicken brain. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 80: 6413-6417.

Layer, P. G.; R. Alber and O. Sporns. 1987a. Quantitative development and molecular forms of acetyl- & butyrylcholinesterase during morphogenesis and synaptogenesis of chick brain and retina. J. Neurochem. 49(1): 175-182.

Layer, P. G. and O. Sporns. 1987b. Spatiotemporal relationship of embryonic cholinesterases with cell proliferation in chicken brain and eye. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 84(1): 284-288.

Layer, P. G.; R. Alber and F. G. Rathjen. 1988a. Sequential activation of butyrylcholinesterase in rostral half somites and acetylcholinesterase in motoneurons and myotomes preceding growth of motor axons. Development. 102: 387-396.

Layer, P. G.; S. Rommel; H. Bülthoff and R. Hengstenberg. 1988b. Independent spatial waves of biochemical differentiation along the surface of chicken brain as revealed by the sequential expression of acetylcholinesterase. Cell Tissue Res. 251: 587-595.

Lewis, P. R. and D. P. Knight. 1982. Staining methods for sectioned material. In: Glauert, A. M. (ed.). Practical Methods in Electron Microscopy. Vol. 5 part I. North-Holland Publ. Co. Amsterdam, pp: 188-223.

Liu, L. S. Cheng; L. Jiang; G. Hansmann and P. G. Layer. 1988. The pigmented epithelium sustains cell growth and tissue differentiation of chicken retinal explants in vitro. Exp. Eye Res. 46(5): 801-812.

Lo, W. K. and M. H. Bernstein. 1981. Daily patterns of the retinal pigment epithelium. Microperoxisomes and phagosomes. Exp. Eye Res. 32: 1-10.

Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough; A. L. Farr and R. J. Randal. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Lucas, C. A. and G. W. Kreutzberg. 1985. Regulation of acetylcholinesterase secretion from neuronal cell cultures - 1. Actions of nerve growth factor, cytoskeletal inhibitors and tunicamycin. Neurosci. 14(1): 349-360.

Martelly, I. and J. Gautron. 1988. Differential expression of acetylcholinesterase molecular forms in neural retina and retinal pigmented epithelium during chick development. Brain Res. 460(2): 205-213.

Martinez, M. T.; G. Sánchez; C. San Román y R. Salceda. 1988. Presencia y distribución subcelular de acetilcolinesterasa en el epitelio pigmentario de la retina. XVII Congreso Nacional. Sociedad de Bioquímica. M-105 pág: 128.

Martins-Green, M. and C. A. Erickson. 1988. Patterns of cholinesterase staining during neural crest cell morphogenesis in mouse and chick embryos. J. Exp. Zool. 247: 62-68.

Massoulié, J. 1980. The polymorphism of cholinesterase and its physiological significance. Trends Biochem. Sci. 5: 160-164.

Massoulié, J. and S. Bon. 1982. The molecular forms of cholinesterases and acetylcholinesterase in vertebrates. Ann. Rev. Neurosci. 5: 57-106.

Masterson, E. and G. J. Chader. 1981. Characterization of glucose transport by cultured pigmented epithelium. Exp. Eye Res. 32: 279-289.

Matsumoto, B.; D. M. Defoe and J. C. Besharse. 1987. Membrane turnover in rod photoreceptors: Ensheathment and phagocytosis of outer segment distal tips by pseudopodia of the retinal pigment epithelium. Proc. Roy. Soc. London Ser. B 230: 339-354.



Matsumura, M.; N. Ogino; H. Shirakawa; R. Yamakawa and I. Tsukahara. 1985. Exocytosis by retinal pigment epithelial cells. Ophthalmic Res. 17(3): 148-153.

Matthes, M. T. and S. F. Basinger. 1980. Myeloid body associations in the frog pigmented epithelium. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 19(3): 298-302.

McLaughlin, B. J.; B. I. Tarnowski and V. L. Shepherd. 1987. Identification of mannose 6-phosphate and mannose receptors in dystrophic and normal retinal pigment epithelium. In: Hollyfield, J. G.; R. E. Anderson and M. M. LaVail (eds.). Degenerative Retinal Disorders: Clinical & Laboratory Investigations. Alan R. Liss. U. S. A., pp: 243-257.

Meller, K. 1979. The formation of gap & tight junctions between retinal pigment cells in cell cultures. J. Neurocytol. 8(2): 229-238.

Melone, M. A. R.; A. Longo; C. Tadde and G. Augusti-Tocco. 1987. Acetylcholinesterase in neuroblastoma and neuroblastoma x glioma hybrid cells: Cellular localization and molecular forms. Int. J. Dev. Neurosci. 5(5/6): 417-428.

Millar, T. J. and I. W. Chubb. 1984. Treatment of sections of chick retina with acetylcholinesterase increases the enkephalin and substance P immunoreactivity. Neuroscience. 12(2): 441-451.

Millar, T. J.; I. Ishimoto; C. D. Johnson; M. L. Epstein; I. W. Chubb and I. G. Morgan. 1985. Cholinergic and acetylcholinesterase containing neurons of the chicken retina. Neurosci. Lett. 61(3): 311-316.

Millar, T. J. and I. W. Chubb. 1987. The ultrastructural localization of acetylcholinesterase-like immunoreactivity in the chicken retina. Brain Res. 421: 297-308.

Moody, S. A. and D. B. Stein. 1988. The development of acetylcholinesterase activity in the embryonic nervous system of the frog Xenopus laevis. Develop. Brain Res. 39(2): 225-232.

Morgan, I. G.; J. Oliver and I. W. Chubb. 1981. Discrete distributions of putative cholinergic and somatostatinergic amacrine cell dendrites in chicken retina. Neurosci. Lett. 27(1): 55-60.

Mund, M. L. and M. M. Rodrigues. 1979. Embryology of the human retinal pigment epithelium. Chap. III In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 45-52.

Murray, R. L. and M. W. Dubin. 1975. The occurrence of actinlike filaments in association with migrating pigment granules in frog retinal pigment epithelium. J. Cell Biol. 64: 705-710.

Nachmannson, D. and I. B. Wilson. 1955. Acetylcholinesterase. In: Colowick, S. P. and N. O. Kaplan (eds.). Methods in Enzymology. Vol. I. Academic Press. New York, pp: 642-651.

Newsome, D. A.; A. T. Hewitt; W. Huh; P.G. Robey and J. R. Hassell. 1987. Detection of specific extracellular matrix molecules in drusen, Bruch's membrane and ciliary body. Amer. J. Ophthalmol. 104: 373-381.

Nguyen-Legros, J. 1978. Fine structure of the pigment epithelium in the vertebrate retina. Int. Rev. Cytol. Suppl. 7 pág: 287-327.

Nichols, Ch. W. and G. B. Koelle. 1967. Acetylcholinesterase method for demonstration in amacrine cells of rabbit retina. Science. 155(3761): 477-478.

Nichols, Ch. W. and G. B. Koelle. 1968. Comparison of the localization of acetylcholinesterase and non-specific cholinesterase activities in mammalian and avian retinas. J. Comp. Neurol. 133(1): 1-15.

Nichols, Ch. W.; J. Hewitt and A. M. Laties. 1972. Localization of acetylcholinesterase in the teleost retina. J. Histochem. Cytochem. 20(2): 130-136.

Nurse, C. A. 1987. Localization of acetylcholinesterase in dissociated cell cultures of the carotid body of the rat. Cell Tissue Res. 250: 21-27.

Oh, T. H.; J. Y. Chyu and S. R. Max. 1977. Release of acetylcholinesterase by cultured spinal cord cells. J. Neurobiol. 8(5): 469-476.

Oka, M. S.; R. A. Landers and C. D. B. Bridges. 1984. A serum-free defined medium for retinal pigment epithelial cells. Exp. Cell Res. 154: 537-547.

Opas, M. 1985. The focal adhesions of chick retinal pigmented epithelial cells. Can. J. Biochem. Biol. 63(6): 553-563.

Opas, M.; K. Turksen and V. I. Kalnins. 1985. Adhesiveness and distribution of vinculin and spectrin in retinal pigmented epithelial cells during growth and differentiation in vitro. Develop. Biol. 107: 269-280.

Organisciak, D. T.; E. R. Berman; H. Wang and L. Feeney-Burns. 1987. Vitamin E in human neural retina and retinal pigment epithelium: effect of age. Curr. Eye Res. 6(8): 1051-1055.

Osborne, N. N.; A. B. Tobin and H. Ghazi. 1988. Role of inositol triphosphate as a second messenger in signal transduction processes: An essay. Neurochem. Res. 13(3): 177-191.

Osman, K. and R. G. Pourcho. 1985. Starburst-like amacrine cells and cholinergic markers in cat retina. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. ARVO 26 (Suppl. 3) 96.

Perelman, A. and E. Brandman. 1989. Different membrane-bound forms of acetylcholinesterase are present at the cell surface of hepatocytes. Eur. J. Biochem. 182(1): 203-207.

Pourcho, R. G. and K. Osman. 1986. Acetylcholinesterase localization in cat retina: A comparison with choline acetyltransferase. Exp. Eye Res. 43: 585-594.

Prusky, G. T.; J. M. Arbuckle and M. S. Cynader. 1988. Transient concordant distributions of nicotinic receptors and acetylcholinesterase in infant rat visual cortex. Develop. Brain Res. 39: 154-159.

Rakoncay, Z. 1986. Mammalian brain acetylcholinesterase. Chap. 9 In: Boulton, A. A.; G. B. Baker and P. H. Yu (eds.). Neuromethods Series 1: Neurochemistry. Neurotransmitter Enzymes. Humana Press. Clifton, New Jersey, pp: 319-360.

Ramirez, G.; E. Escudero; M. J. Villafreuela; A. Barat; G. Gomez-Barriocanal and C. Rodriguez-Borrajo. 1981. Molecular forms of acetylcholinesterase in the developing chick retina. Neurosci. Lett. suppl. 7. s340.

Rapp, L. M. and T. P. Williams. 1980. The role of ocular pigmentation in protecting against retinal light damage. Vision Res. 20: 1127-1131.

Reh, T. A.; T. Nagy and H. Gretton. 1987. Retinal pigmented epithelial cells induced to transdifferentiate to neurons by laminin. Nature. 330: 68-71.

Rieger, F.; A. Faivre-Bauman; P. Benda and M. Vigny. 1976. Molecular forms of acetylcholinesterase: Their de novo synthesis in mouse neuroblastoma cells. J. Neurochem. 27(5): 1059-1063.

Robertson, R. T. 1987. A morphogenic role for transiently expressed acetylcholinesterase in developing thalamocortical systems? Neurosci. Lett. 75(3): 259-264.

Robertson, R. T.; M. A. Hanes and J. Yu. 1988a. Investigations of the origins of transient acetylcholinesterase activity in developing rat visual cortex. Develop. Brain Res. 41: 1-23.

Robertson, R. T.; Ch. F. Höhmann; J. L. Bruce and J. T. Coyle. 1988b. Neonatal enucleations reduce specific activity of acetylcholinesterase but not choline acetyltransferase in developing rat visual cortex. Develop. Brain Res. 39(2): 298-302.

Robison, W. G. and T. Kuwabara. 1975. Microperoxisomes in retinal pigment epithelium. Invest. Ophthalmol. 14(11): 866-872.

Rodríguez de Lores Arnaiz, G. 1964. Subcellular localization of cholinesterase in brain. J. Histochem. Cytochem. 12(9): 696-699.

Rotundo, R. L. 1983. Acetylcholinesterase biosynthesis and transport in tissue culture. In: Colowick, S. P. and N. O. Kaplan (eds.). Methods in Enzymology. Vol. 96. Part J. Academic Press. New York, pp: 353-367.

Rotundo, R. L. 1988. Biogenesis of Ache molecular forms in muscle. Evidence for a rapidly turning over, catalytically inactive precursor pool. J. Biol. Chem. 263(36): 19398-19406.

Rotundo, R. L. and D. M. Fambrough. 1980a. Synthesis, transport and fate of acetylcholinesterase in cultures chick embryo muscle cells. Cell. 22(2): 583-594.

Rotundo, R. L. and D. M. Fambrough. 1980b. Secretion of acetylcholinesterase: Relation to acetylcholine receptor metabolism. Cell. 22(2): 595-602.

Salceda, R. 1986. Isolation and biochemical characterization of frog retinal pigment epithelium cells. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 27: 1172-1176.

Salipan, N.; I. G. Morgan and I. W. Chubb. 1983. Decreased concentrations of acetylcholinesterase and leu-enkephalin in dark adapted chick retinae. Neurosci. Lett. suppl. 11. s73.

Scarsella, G.; G. Toschi; V. A. Chiappinelli and E. Giacobini. 1978. Molecular forms of acetylcholinesterase in the ciliary ganglion and iris of the chick. Developmental changes and effects of axotomy. Develop. Neurosci. 1:133-141.

Schweigerer, L.; B. Malerstein; G. Neufeld and D. Gospodarowicz. 1987. Basic fibroblast growth factor is synthesized in cultured retinal pigment epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 143(3): 934-940.

Seyfried-Williams, R. and B. J. McLaughlin. 1984. Acid phosphatase localization in normal and dystrophic retinal pigment epithelium. J. Neurocytol. 13: 201-214.

Shen, S. C.; P. Greenfield and E. J. Boell. 1956. Localization of acetylcholinesterase in chick retina during histogenesis. J. Comp. Neurol. 106(2): 433-461.

Shirakawa, H.; N. Yoshimura y N. Ogino. 1986. Growth factors induce actin disruption in cultured human retinal pigment epithelial cells. Ophthalmic Res. 18: 338-342.

Small, D. H. 1989. Acetylcholinesterase: Zymogens of neuropeptide processing enzymes? Neuroscience. 29(2): 241-249.

Sofroniew, M. V.; P. E. Campbell; A. C. Cuello and F. Eckenstein. 1985. Central cholinergic neurons visualized by immunohistochemical detection of choline acetyltransferase. In: Paxinos, G. (ed.). The Rat Nervous System. Vol. I. Academic Press. Sydney, pp: 471-485.

Spira, A. W. 1976. The localization of cholinesterase in the retina of the fetal and newborn guinea pig. J. Comp. Neurol. 169(4): 393-408.

Stanka, P.; P. Rathjen and B. Sahlmann. 1981. Evidence of membrane transformation during melanogenesis. Electron microscopic study on the retinal pigment epithelium of chick embryos. Cell Tissue Res. 214: 343-353.

Steinberg, R. H. and I. Wood. 1979a. The relationship of the retinal pigment epithelium to photoreceptor outer segments in human retina. Chap. II In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 32-44.

Steinberg, R. H. and S. S. Miller. 1979b. Transport and membrane properties of the retinal pigment epithelium. Chap. XII In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 205-225.

Stramm, L. E.; M. E. Haskins; M. M. McGovern and G. D. Aguirre. 1983. Tissue culture of cat retinal pigment epithelium. Exp. Eye Res. 36(1): 91-101.

Stroeva, O. G. and V. I. Mitashov. 1983. Retinal pigment epithelium: Proliferation and differentiation during development and regeneration. Int. Rev. Cytol. 83: 221-293.

Super, M. 1988. Determination of maternal serum acetylcholinesterase in pregnancies with fetal neural tube defects. Prenatal Diag. 8: 165-166.

Tripathi, B. J. and R. C. Tripathi. 1981. Effect of arachidonic acid on normal and dystrophic retinal pigment epithelium in tissue culture. Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 20(4): 553-557.

Tsim, K. W. K.; W. R. Randall and E. A. Barnard. 1988. Identification of a 17s asymmetric butyrylcholinesterase in chick muscle by monoclonal antibodies. Neurosci. Lett. 86: 245-249.

Tsunematsu, Y.; M. Funahashi and A. Nakajima. 1981. Electron microscopic analysis of phagocytic activity of chick embryonic retinal pigment cells in vitro. Develop. Growth Differ. 23(4): 313-319.

Turksen, K.; M. Opas and V. I. Kalnins. 1987. Preliminary characterization of cell surface-extracellular matrix linkage complexes in cultured retinal pigmented epithelial cells. Exp. Cell Res. 171: 259-264.

Vielkind, V. and B. J. Crawford. 1988a. Evaluation of different procedures for the dissociation of retinal pigmented epithelium into single cells. Pigment Cell Res. 1: 419-433.

Vielkind, V. and B. J. Crawford. 1988b. Influence of donor age on establishing well-differentiated clonal cultures from embryonic chicken retinal pigmented epithelium. Develop. Growth Differ. 30(6): 727-736.

Vigny, M.; L. Giamberardino; J. Y. Couraud; F. Rieger and J. Koenig. 1976. Molecular forms of chicken acetylcholinesterase: Effect of denervation. FEBS Lett. 69(1): 277-280.

Villafruela, M. J.; A. Barat; S. Villa and G. Ramirez. 1980. Molecular forms of acetylcholinesterase in the chick visual system. FEBS Lett. 110(1): 91-95.

Villafruela, M. J.; A. Barat; E. Manrique; S. Villa and G. Ramirez. 1981. Molecular forms of acetylcholinesterase in the developing chick visual system. Develop. Neurosci. 4: 25-36.

Vollmer, G.; P. G. Layer and A. Gierer. 1984. Reaggregation of embryonic chick retina cells: Pigment epithelial cells induce a high order of stratification. Neurosci. Lett. 48(2): 191-196.

Vollmer, G. and P. G. Layer. 1986a. An in vitro model of proliferation and differentiation of the chick retina: Coaggregates of retinal and pigment epithelial cells. J. Neurosci. 6(7): 1885-1896.

Vollmer, G. and P. G. Layer. 1986b. Reaggregation of chick retinal and mixtures of retinal and pigment epithelial cells: The degree of laminar organization is dependent on age. Neurosci. Lett. 63(1): 91-95.

Vollmer, G. and P. G. Layer. 1987. Cholinesterases and cell proliferation in "nonstratified" and "stratified" cell aggregates from chicken retina and tectum. Cell Tissue Res. 250(3): 481-487.

Wallace, B. G. 1981. Distribution of AChE in cholinergic and non-cholinergic neurons. Brain Res. 219(1): 190-195.

Wallace, B. G. and J. W. Gillon. 1982. Characterization of acetylcholinesterase in individual neurons in the leech central nervous system. J. Neurosci. 2(8): 1108-1118.

Whittaker, M. 1984. Cholinesterases. En: Bergmeyer, H. V. (ed.). Methods of Enzymatic Analysis. 3rd. ed. Vol. IV Enzymes 2: Esterases, Glycosidases, Lyases, Ligases. Verlag-Chemie. Weinheim, pp: 52-74.

Yamakawa, R.; H. Shirakawa; M. Okada; N. Yoshimura; M. Matsumura and N. Ogino. 1987. Retinal pigment epithelial cells produce fibronectin. Ophthalmic Res. 19: 338-343.

Yang, W. C.; M. J. Hollenberg and J. P. H. Wyse. 1978. Morphology of the retinal pigment epithelium in the vitamin A deficient rat. Virchow's Arch. B. Cell Path. 27: 7-21.

Young, R. W. and D. Bok. 1979. Metabolism of the retinal pigment epithelium. Chap. VII In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 103-123.

Yu, Q-S.; J. R. Atack; S. I. Rapoport and A. Brossi. 1988. Carbamate analogues of(-)-physostigmine: In vitro inhibition of acetyl- and butyrylcholinesterase. FEBS Lett. 234(1): 127-130.

Zauberman, H. 1979. Adhesive forces between the retinal pigment epithelium and sensory retinal. Chap. XI In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 192-204.

Zimmerman, W. F.; W. Godchaux and M. Belkin. 1983. The relative proportions of lysosomal enzyme activities in bovine retinal pigment epithelium. Exp. Eye Res. 36(1): 151-158.

Zinn, K. M. and J. V. Benjamin-Henkind. 1979. Anatomy of the human retinal pigment epithelium. Chap. I In: Zinn, K. M. and M. F. Marmor (eds.). The Retinal Pigment Epithelium. Harvard Univ. Press. England, pp: 3-31.

## APENDICE A

### RINGER KREBS-BICARBONATO pH 7.4

	Concentración final (mM)
Cloruro de sodio	118.0
Cloruro de potasio	4.7
Fosfato monopotásico	1.2
Cloruro de calcio	2.5
Sulfato de magnesio	1.17
Glucosa	5.6
Bicarbonato de sodio	35.0

## APENDICE B

### TRIPSINA 0.1375%

- Buffer fosfato en solución salina (PBS)
  - a) 5.36 gr de fosfato disódico, aforar a 100 ml con agua dest.
  - b) 1.38 gr de fosfato monosódico, aforar a 50 ml con agua dest.
- 84 ml de a) y 16 ml de b), añadir 0.85 gr de cloruro de sodio.
- 0.1375 gr de tripsina pancreática de bovino (Sigma) en 100 ml de PBS.
- Dejar en agitación toda la noche a 4°C.
- Ajustar pH 7.4 con NaOH 0.1 N
- Esterilizar por filtración y congelar a -70°C.



### APENDICE C

El medio TC 199 es un medio de cultivo desarrollado por Morgan, Morton y Parker (1950. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73: 1) para cultivar fibroblastos de embrión de pollo. Este medio se puede obtener comercialmente en GIBCO Life Technologies, Inc. Grand Island, N. Y. 14072 U.S.A. y su composición en mg/L de dicho medio es la siguiente:

DL-Alanina	50.00	Bicarbonato de sodio	1250.00
L-Arginina HCl	70.00	Cloruro de calcio anhidro	200.00
DL-Acido aspártico	60.00	Cloruro de potasio	400.00
L-Cisteina HCl*H <sub>2</sub> O	0.11	Cloruro de sodio	6800.00
L-Cisteina	20.00	Fosfato monosódico	125.00
DL-Acido glutámico*H <sub>2</sub> O	150.00	Nitrato férrico	0.72
L- Glutamina	100.00	Sulfato de magnesio	200.00
Glicina	50.00	Acetato de sodio	50.00
L-Histidina HCl*H <sub>2</sub> O	21.88	Acido adenilico	0.20
L-Hidroxiprolina	10.00	Adenosintrifosfato	1.00
DL-Isoleucina	40.00	Colesterol	0.20
DL-Leucina	120.00	Desoxiribosa	0.50
L- Lisina HCl	70.00	D-Glucosa	1000.00
DL-Metionina	30.00	Glutación (reducido)	0.05
DL-Fenilalanina	50.00	Guanina HCl	0.30
L-Prolina	40.00	Hipoxantina	0.30
DL-Serina	50.00	Ribosa	0.50
DL-Treonina	60.00	Rojo fenol	0.50
DL-Triptofano	20.00	Sulfato de adenina	10.00
L-Tirosina	40.00	Timina	0.30
DL-Valina	50.00	Tween 80	20.00
Acido ascórbico	0.05	Uracilo	0.30
Acido fólico	0.01	Xantina	0.30
Acido para-aminobenzoico	0.50	Dióxido de carbono para pH	7.2
δ-Biotina	0.01		
Calciferol	0.10		
D-Ca pantotenato	0.01		
Cloruro de colina	0.50		
Fosfato de α-tocoferol	0.01		
i-Inositol	0.05		
Menadiona	0.01		
Niacina	0.025		
Niacinamida	0.025		
Piridoxal HCl	0.025		
Piridoxina HCl	0.025		
Riboflavina	0.01		
Tiamina HCl	0.01		
Vitamina A (acetato)	0.14		