

Ficha técnica

Nuevo método para obtener cultivos primarios altamente enriquecidos en poblaciones particulares de células de la retina de pollo. *(Novel method to obtain highly enriched primary cultures of retinal horizontal cells).*

Por Luis Pedro Morera. Lic. en Biología Molecular. CIQUIBIC (CONICET).

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

lmorera@fcq.unc.edu.ar

Resumen:

La Melanopsina (OPN4) es un fotopigmento no visual descrito en la última década que se expresa en las células ganglionares de la retina (CGR) y que le confiere fotosensibilidad intrínseca a estas células, denominadas intrínsecamente fotosensibles (GCRif). En el pollo se encuentran presentes dos genes de OPN4, *Opn4x* y *Opn4m*, de los cuales, el producto proteico OPN4m se encuentra restringido exclusivamente a la capa de CGR, mientras que OPN4x se encuentra en las CGRs a estadios tempranos del desarrollo, pero para el día de desarrollo 15 (E15) aparece fuertemente expresada en la capa plexiforme externa, colocalizando con células Horizontales (CHs), positivas para el marcador universal de estas células, Prox-1. El objetivo de este trabajo fue lograr cultivos primarios enriquecidos en CHs a partir de la retina de pollo. Para esto se disgregaron retinas de pollos embrionarios a E15 y se sometieron las células de este disgregado a un gradiente discontinuo de albumina sérica bovina (BSA) que comprendió fases con una concentración de 1 a 4 %. Las células recuperadas de las distintas fases fueron cultivadas y caracterizadas por inmunoquímica y morfología. Los resultados muestran que la fracción correspondiente al 2,5 % de BSA contiene el mayor porcentaje de CHs, positivas para Prox-1 e Islet-1, presentando además la morfología típica de estas células retinales. Es de destacar además que con este método se logró un enriquecimiento de hasta el 80 % contra un 30 % de CHs presentes en el disgregado de partida. Con respecto a OPN4x, encontramos expresión de este fotopigmento, en células presentes en las distintas fases del gradiente (2.5, 3 y 4%). Las células de la fase 3 % presentaban procesos más largos e inmunoreactividad positiva para el neurofilamento de alto peso molecular, NF200, indicando que podrían ser CGRs. En conclusión, por medio

de esta metodología logramos aislar y cultivar las CHs de la retina, así como también caracterizar por diversas técnicas a estas interneuronas en cultivo.

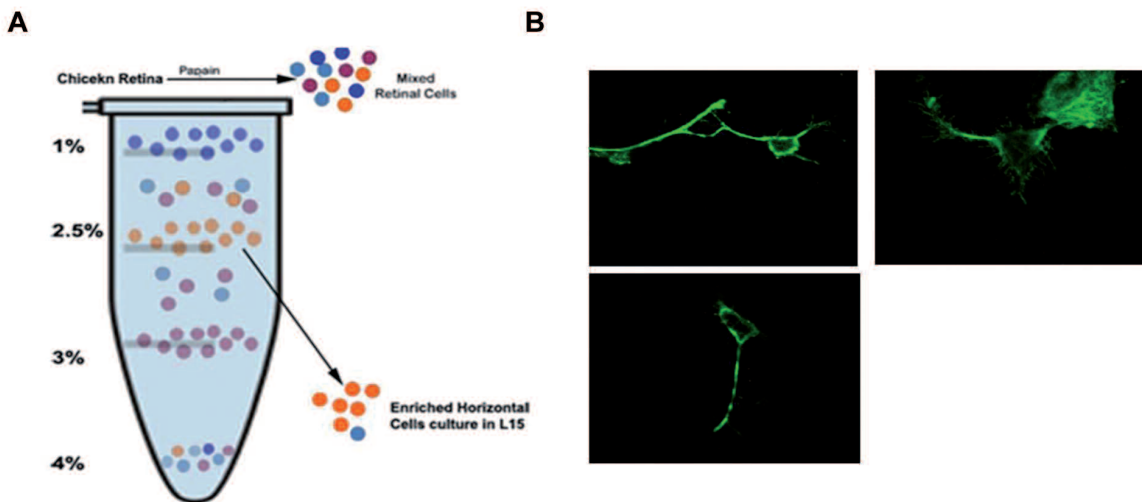
Abstract:

Retinal ganglion cells (RGCs) expressing the photopigment melanopsin (Opn4) display intrinsic photosensitivity. In the chicken retina, two Opn4 genes, Opn4x and Opn4m have been described of which, Opn4m was restricted to the GC layer whereas Opn4x was limited to the forming GC layer and optic nerve at early embryonic days (E), but by E15 its expression was mostly in Prox1 (+) horizontal cells (HCs) (Verra et al., 2011). The aim of this work was to purify HCs from the chicken retina to obtain primary cultures enriched in these cells. Disaggregated chicken embryonic retinas at E15 were subjected to a discontinuous 1 to 4% bovine serum albumin (BSA) gradient [1]. Cells from the different phases were cultured and characterized by immunocytochemistry and morphology. The results show that only the fraction corresponding to 2.5% BSA contained most cells displaying PROX-1 and Islet-1 (+) immunoreactivities with a typical HC morphology resembling typical HCs. 30% of cells from the whole disaggregated retina and 80% from the 2.5% BSA gradient phase were Prox-1 (+). Strikingly, Opn4x-immunoreactivity was observed in cultures from both the 2.5 and 3% BSA gradient phases. Cells from the 3% phase express the neuronal filament of 200 KDa (NF200) and display longer processes resembling RGCs. In conclusion, by means of this method we selectively separated specific retinal cell types and obtained primary cultures highly enriched in HCs expressing the non-visual opsin Opn4x.

Palabras claves:

Retina, Células Ganglionares, Células Horizontales, Melanopsina, Cultivos primarios.

Resumen gráfico:



Esquema del gradiente de BSA, fases que van desde 1 a 4 %, la fase 2,5 % contiene el mayor número de células horizontales de la retina de pollo. **B.** Inmunocitoquímica para OPN4X en Células Horizontales de la retina de pollo, luego de 4 días de cultivo.

La retina es un tejido sensorial especializado, que pertenece al sistema nervioso central (SNC), por lo tanto, la organización sináptica de la retina es similar a la de otras estructuras neurales. Podemos distinguir en la retina 5 capas (capa plexiforme externa, OPL, capa nuclear externa, ONL, capa plexiforme interna, IPL, capa nuclear interna, INL y la capa de células ganglionares) y 5 tipos de células (fotorreceptores, células amácrinas, células horizontales, células bipolares y células ganglionares). Las células no neuronales presentes son las células gliales de Muller y las células del epitelio pigmentario (RPE).

Ya que la retina es un tejido muy heterogéneo y complejo, que comprende células neuronales y gliales especializadas en una variedad de tareas relacionadas con funciones visuales y no visuales, es esencial poder aislar diferentes poblaciones de células con el fin de caracterizarlas bioquímica y molecularmente. Muchas de las técnicas disponibles actualmente implican la obtención de cultivos con poblaciones celulares heterogéneas, en lugar de células individuales lo cual constituye una gran limitación [2]. Este y otros laboratorios han desarrollado diversos procedimientos para aislar y cultivar células embrionarias de la retina como: el cultivo de células ganglionares de la retina (CGR) inmunopurificación contra Thy-1 [3-6] Las CHs son interneuronas de la retina adyacentes a la OPL, que modulan la señalización entre fotorreceptores y células bipolares.

Gradientes de composición química diferente (Percoll, Ficoll, etc) ya han sido utilizados con éxito para separar las CHs de teleosteos [7]. Sin embargo, puesto que la retina de pollo es morfológicamente muy diferente a las ensayadas, los gradientes químicos reportados anteriormente resultaron inadecuados para la separación de células de la retina aviar.

En este trabajo, se presenta un nuevo método para aislar CHs de la retina de pollo, mediante una técnica sencilla, un gradiente discontinuo de BSA [1].

Materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Los anticuerpos secundarios utilizados para inmunocitoquímica (ICQ) e inmunohistoquímica (IHC) fueron Alexa Fluor 488 cabra anti-conejo y Alexa Fluor 546 cabra anti-ratón IgG (dilution 1: 1000; Invitrogen-MolecularProbes, Eugene, OR). Prox-1 anticuerpo policlonal, conejo (dilución 1/2500, Millipore, Temecula, CA), Islet-1 (1/50, del Banco hibridoma de la Universidad de Iowa, Iowa City), calretinina anticuerpo policlonal, Conejo (1/2500, Swant, Suiza, donados por el Dr. Hugo Ríos, UBA, Argentina), RetP1 anticuerpo monoclonal de ratón (1/2000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), neurofilamentos de 200 kDa (NF-200) anticuerpo monoclonal de ratón (1/100, Millipore, Temecula, CA) o Brn-3 anticuerpo monoclonal (1/100, Millipore, Temecula, CA), glutamina sintetasa (GS) anticuerpo

monoclonal, ratón (1/500, Millipore, Temecula, CA). Los siguientes reactivos fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO): Ioduro de propidio (IP), DAPI, inhibidor de proteasas, papaína en suspensión de acetato sódico 0,05 M y Laminina.

El medio de montaje acuoso (FluorSave) fue adquirido a Calbiochem (San Diego, CA). Los anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot (WB) fueron policlonales hechos en cabra anti-conejo (IR Dye, dilución 1:25.000) de Li-COR (Lincoln, NB). El suplemento B-27 fue comprado a Invitrogen-Gibco (Grand Island, NY). Tubulina fue detectada con el anticuerpo monoclonal de ratón DM1A (1:1000 para WB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y el medio de cultivo Leibovitz (L-15) fue comprado a Life Technologies, GIBCO Invitrogen (Carlsbad, CA).

Métodos

Se disgregaron retinas de embriones de pollo de E15 mediante un tratamiento con papaína y se cultivaron en medio Leibovitz modificado suplementado con suero fetal bovino al 10%, ATB y B27. Mediante estas condiciones de disgregado y cultivo se lograron una mejor adhesión de las células a la placa y una mayor diferenciación morfológica.

-El disgregado enzimático puede ser complementado con el disgregado mecánico, utilizando pipetas Pasteur.

-El tratamiento con DNasa evita la formación de agregados celulares por la liberación de ADN.

-La edad de los embriones es importante debido a que el grado de desarrollo de la retina es un factor muy influyente en lo que refiere a los marcadores expresados en las distintas neuronas, así como también, al desarrollo morfológico y posicional de las mismas.

-Preparación del gradiente: el gradiente discontinuo de BSA se preparó en un tubo de 15 ml, agregando por separado las fases de BSA 1%, 2,5%, 3% y 4%, las fases fueron colocadas cuidadosamente para evitar la mezcla (Fig. 1 A). Con el fin de lograr una mejor resolución en el gradiente, se debe prestar especial atención a la velocidad de centrifugación, la concentración de las fases y la cantidad de tejido a ser separado. Estas 3 variables se ajustaron durante el curso de varios ensayos para lograr una óptima separación. Se centrifugó a 300 rpm, 4 °C y durante 10 min.

-Se resuspendieron 5 retinas como máximo en 2 ml de CMF (Buffer libre de calcio y magnesio).

Aislamiento de las HC:

Después de recuperar las células de cada fase del gradiente y cultivarlas por 4 días se realizó una inmunocitoquímica (Fig. 1 B) con marcación de núcleos con ioduro de propidio (IP) y con marcadores específicos de las HC así como también para otros tipos neuronales de la retina. Encontramos que sólo la fracción correspondiente al 2,5%

de BSA estaba altamente enriquecida en células Prox-1 positivas. Por otra parte, una alta proporción de estas células fueron además positivas para Islet-1.

-Los cubreobjetos tratados con polilisina/ laminina mejoran la adhesión celular.

-Cotejando el control de disgregado total de retina con las células halladas en la fase 2,5% de BSA encontramos una gran eficacia de enriquecimiento, 30% de células Prox-1 (+) en el control contra ($\geq 75\%$) de células Prox-1 (+) en la fase 2,5%.

En conclusión, se informa aquí un nuevo método efectivo para el enriquecimiento y cultivo de células horizontales de la retina de pollo.

Bibliografía

1. Morera, L.P., N.M. Diaz, and M.E. Guido, A novel method to prepare highly enriched primary cultures of chicken retinal horizontal cells. *Exp Eye Res*, 2012. 101: p. 44-8.
2. Adler, R., A Model of Retinal Cell Differentiation in the Chick Embryo. *Progress in Retinal and Eye Research*, 2000. Vol. 19(No. 5): p. pp. 529 to 557.
3. Brocco, M.A. and P. Panzetta, Survival and process re-growth of purified chick retinal ganglion cells cultured in a growth factor lacking medium at low density. Modulation by extracellular matrix proteins. *Brain Res Dev Brain Res*, 1999. 118(1-2): p. 23-32.
4. Contin, M.A., D.M. Verra, and M.E. Guido, An invertebrate-like phototransduction cascade mediates light detection in the chicken retinal ganglion cells. *FASEB J*, 2006. 20(14): p. 2648-50.
5. Garbarino-Pico, E., Retinal Ganglion Cells Are Autonomous Circadian Oscillators Synthesizing N-Acetylserotonin during the Day. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004. Vol. 279 No. 49(Issue of December 3): p. pp. 51172-51181.
6. Verra, D.M., et al., Early onset and differential temporospatial expression of melanopsin isoforms in the developing chicken retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. 52(8): p. 5111-20.
7. Lasater, E.M. and J.E. Dowling, Carp horizontal cells in culture respond selectively to L-glutamate and its agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. 79(3): p. 936-40.