



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

EFECTO DEL GLUTAMATO SOBRE LA
FISIOPATOGENIA DE LA
VITREORRETINOPATÍA PROLIFERATIVA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
M A E S T R A E N C I E N C I A S
P R E S E N T A :
REYNA LIZETTE PACHECO DOMÍNGUEZ



DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA MARÍA LÓPEZ COLOMÉ

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Esta tesis se llevó a cabo en el departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Ana María López Colomé.

Este trabajo fue parcialmente financiado por los donativos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, proyecto 42640-Q), y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT, proyecto IN-228203).

Agradecimientos

A la Dra. Ana María López Colomé por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su tiempo dedicado en mi formación profesional.

Al Dr. Luís Felipe Abreu Hernández (Coordinador del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas Odontológicas y de la Salud, en representación de todos los que ahí laboran) por creer en mí, apoyarme y seguir mi trayectoria en este programa que cambió mi vida: Licenciatura y Maestría simultáneas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Julio Moran, al Dr. Hector Zenteno, al Dr. Jonathan Garfias y al Dr. Hugo Mercado por sus valiosas sugerencias y comentarios a este trabajo.

Al M. en C. José Prisco Palma Nicolás por su excelente apoyo técnico.

A la Q. F. B. Edith Catalina López Hernández por su excelente apoyo técnico.

A la Dra. Irene Lee Rivera por su excelente apoyo técnico.

A todos mis compañeros del laboratorio por compartir conmigo esos momentos inolvidables de amistad, convivencia y trabajo...¡Muchas, muchas GRACIAS!

Dedicatorias

Esta tesis se la dedico a las personas que han hecho de mi lo que soy en este momento, a las que me dieron la vida y la han compartido conmigo, a las personas con las que hemos estado en las buenas y en las malas, con las que he compartido todos mis triunfos, con las que me han hecho crecer, con las que me quieren por sobre todas las cosas... Si, se las dedico a ustedes: MIS PADRES, **María Reyna Domínguez Silva** y **Guillermo Pacheco Rangel**. Porque esta tesis no es mía, es de nosotros tres, porque los tres nos esforzamos por lograrla como siempre lo hemos hecho con todo. Saben...no sé a quién le tengo que dar las gracias...pero doy las gracias porque ustedes son mis padres en toda la extensión de la palabra y más. Y creo que ya lo saben pero se los digo de nuevo: **¡LOS QUIERO MUCHO! ... En conclusión, todo se los debo a ustedes, Gracias.**

Y si tuviera que mencionar a todas las personas que me apoyaron en la realización de este trabajo aumentaría al doble mi tesis sino es que más... Por lo que muchas gracias a todos por sus enseñanzas, apoyo y comprensión porque sin ellas no lo hubiera logrado. ¡GRACIAS!

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Vitreorretinopatía Proliferativa	3
2.2. Epitelio pigmentado de la retina	10
2.3. Receptores de glutamato	12
2.4. Cinasas de proteína activadas por mitógenos	14
3. Planteamiento del problema	18
4. Hipótesis	19
5. Objetivos	19
6. Metodología	21
6.1. Cultivo primario de células de EPR	21
6.2. Subcultivo de células de EPR	21
6.3. Determinación de la expresión de la proteína RPE65 por inmunocitoquímica	22
6.4. Evaluación de la dinámica del citoesqueleto con α -sma por inmunocitoquímica	22
6.5. Evaluación de la proliferación de las células de EPR estimulada por glutamato	23
6.6. Cuantificación de los receptores de glutamato por la técnica de unión de radiologando empleando Glutamato- H^3	23
6.7. Análisis de inmunodetección para Erk1/2 y α -sma en células de EPR de rata	24
7. Resultados	26
7.1. Las células de EPR en cultivo son un modelo experimental para estudiar la VRP	26
7.2. Caracterización bioquímica de los receptores de glutamato en células del EPR de rata	28
7.3. El glutamato estimula la proliferación de las células del EPR a través de la activación de receptores específicos	29
7.4. El glutamato activa la vía de MEK/ ERK 1/2 las células de EPR de rata	31
7.5. La activación de la vía de MEK-ERK1/2 media la proliferación celular estimulada por glutamato	33
7.6. La activación de la vía ERK1/2 promueve la desorganización de la α -sma	34
8. Discusión	37
9. Conclusiones	46
10. Bibliografía	47

1. Resumen

Introducción: La vitreorretinopatía proliferativa (VRP) se caracteriza por la formación de membranas superficiales en el segmento posterior del ojo y se define como el crecimiento y contracción de las membranas celulares dentro de la cavidad vítrea, en ambas superficies de la retina. En diferentes estudios se ha demostrado que las principales células involucradas en esta enfermedad son las del epitelio pigmentado de la retina (EPR). La VRP se caracteriza por la migración, proliferación y transición epitelio-mesénquima (TEM) indeseada de células, por lo que el proceso comprende la estimulación de las células del EPR por factores tróficos. El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en la vía directa radial de la retina que incluye fotorreceptores, células bipolares y células ganglionares. Estudios recientes han demostrado que la concentración de glutamato se eleva en el vítreo de pacientes con daño regmatógeno; además, se ha observado que el glutamato se libera en exceso de la retina cuando hay isquemia. En estudios previos se ha demostrado que el glutamato induce proliferación en las células del EPR y se sabe que la vía de las cinasas de proteína activadas por mitógeno (MAP cinasas) participa en la inducción de la proliferación estimulada por suero en estas mismas células.

Objetivo: Los objetivos de este trabajo son 1) caracterizar bioquímica y farmacológicamente los receptores de glutamato en las células del EPR de rata; 2) identificar el efecto del glutamato sobre la proliferación y sobre la TEM en las células del EPR; 3) dilucidar la participación de la vía de señalamiento intracelular MAPK/ERK en estos fenómenos.

Metodología: Se realizaron cultivos primarios de células de EPR de ratas Long Evans. La caracterización de las células de EPR se realizó por inmunocitoquímica. Se utilizó la técnica de unión de radioligando para caracterizar los subtipos de receptores de glutamato en células de EPR de rata. El efecto del glutamato sobre la proliferación, la activación de ERK1/2 y la transición epitelio-mesénquima de las

células del EPR se analizó en ausencia de suero. La proliferación celular se midió utilizando un método colorimétrico basado en la reducción de una sal de tetrazolio. La fosforilación de ERK 1/2 se analizó por Western blot. La TEM de las células de EPR se evaluó por medio de microscopía óptica para α -sma (α -smooth muscle actin) y por Western blot.

Resultados: Se demostró que las células de EPR de rata expresan tanto receptores ionotrópicos como metabotrópicos de glutamato, predominando los de tipo NMDA. El glutamato incrementó de manera dosis-dependiente la proliferación y la activación de ERK1/2 en las células de EPR. Se demostró así mismo que, si bien el glutamato no interviene en la TEM del EPR, la activación de la vía de señalamiento de MAPK-ERK1/2 claramente interviene en dicha transición.

Conclusiones: Este estudio sugiere que 1) el glutamato podría intervenir en la inducción de la VRP, dado que activa la proliferación de las células del EPR a través de la activación de los receptores de NMDA y la estimulación subsecuente de ERK 1/2. 2) La activación de la vía de señalamiento MAPK/ERK interviene en la EMT, pero la estimulación por glutamato la inhibe.

2. Introducción

2.1. Vitreorretinopatía Proliferativa

La vitreorretinopatía proliferativa (VRP) es un proceso de cicatrización que se desarrolla con algunos desprendimientos de retina. La VRP se define como el crecimiento y contracción de membranas celulares dentro de la cavidad vítrea y en ambas superficies de la retina, y en muchos casos un proceso fibrótico de la retina misma.^{1 2}

La VRP es la causa mas frecuente de fracaso de la cirugía de desprendimiento de retina de tipo regmatógeno, con una incidencia de 7-10% en casos de desprendimiento de retina primario.³ En esta entidad clínica, las células del epitelio pigmentado de la retina se dispersan y emigran a través de la ruptura retiniana hacia la cavidad vítrea donde proliferan y sufren cambios metaplásicos que les confieren características de fibroblastos, macrófagos y miofibroblastos, formando membranas celulares no vasculares que se contraen sobre y debajo de la superficie retiniana. El resultado final es la aparición de un desprendimiento de retina traccional y/o mixto.⁴

El análisis de los datos en la literatura indica que la VRP no es una entidad clínica específica, pero es el final de la cadena de una serie de enfermedades intraoculares derivadas de varios estímulos. El desprendimiento de retina y las alteraciones vítreas asociadas son importantes pero no son los únicos factores en el desarrollo de la VRP.⁵ La VRP se puede presentar antes de la cirugía (referida por algunos como VRP primaria o preoperatoria), pero su incidencia se incrementa después de la cirugía (VRP postoperatoria), y por lo tanto puede resultar por efectos quirúrgicos intraoculares.² Los resultados quirúrgicos de esta complicación son extraordinariamente variables. Esta variación se debe a múltiples factores, principalmente a la heterogeneidad inherente de la enfermedad pero también a los diferentes criterios para establecer el grado de severidad. Las clasificaciones de la VRP (Comité de terminología de la sociedad de retina)⁶ no son herramientas útiles en la toma de decisiones quirúrgicas, y la mayoría de los cirujanos prefieren clasificar a la VRP como leve, moderada y severa.¹ No existen divisiones claras entre las tres formas, aunque representan una impresión preoperatoria del grado

de dificultad para reaplicar la retina y por lo tanto una pista para realizar cirugía extraescleral o vitrectomía. La VRP se asocia con inflamación, la cirugía puede estimularla y consecuentemente incrementar la VRP. La VRP es un proceso dinámico, pero hay poca información acerca de su cronobiología. Este conocimiento es crucial para mejorar los resultados quirúrgicos, y algunos autores que consideran que si hay signos clínicos de actividad, pueden ser útiles para retrasar la intervención quirúrgica por algunas semanas.⁷ El éxito anatómico está reportado del 60-80% de los casos, dependiendo de la severidad de la enfermedad.^{1,2} Entre más avanzada la enfermedad, menor la probabilidad de reaplicación de la retina. La intervención quirúrgica es el tratamiento estándar. Casos severos y moderados de VRP se pueden tratar con cirugía convencional para desprendimiento de retina (producir una depresión en la esclera que acerque el lecho coriorretiniano al EPR), pero la vitrectomía de la pars plana está indicada en la mayoría de los casos. El tratamiento de los casos complicados involucra procedimientos que son técnicamente complejos, como retinotomías y/o retinectomías, y el uso de sustancias para reemplazar el vítreo, todas ellas aún controversiales.¹ A pesar del mejoramiento del número de reaplicaciones quirúrgicas con la vitrectomía, el éxito anatómico no asegura la mejoría visual. Solo 40-80% de los pacientes que tuvieron éxito anatómico recobraron mínimamente la función visual. El éxito funcional puede ser pobre por los cambios maculares, pero está relacionado con el número de procedimientos realizados.¹ En resumen, la prevención o la profilaxis con tratamiento médico deben ser consideradas un reto de la investigación para mejorar el resultado final.

La incidencia de la VRP primaria o preoperatoria se incrementa en situaciones clínicas como: la extensión del desprendimiento, rompimientos de retina profundos, largos, múltiples o indetectados, afaquia, hemorragia vítrea, desprendimiento coroidal preoperatorio, falla en la aplicación previa de la retina, y la presencia de signos de uveítis.^{1 8 9} Por lo que, la incidencia de la VRP incrementa postoperatoriamente y está fuertemente asociada con factores adicionales: presencia de VRP grados A y B preoperatoria, hemorragia intraocular durante o después de la cirugía, desprendimiento coroidal, el uso de aire,

crioterapia excesiva, diatermia o fotocoagulación, procedimientos quirúrgicos previos, pérdida de humor vítreo durante el drenaje de líquido subretiniano y el uso de vitrectomía.^{1 8 10 11 12} Algunos de estos hallazgos son contradictorios y es difícil evaluar al papel actual de cada factor en el desarrollo de la VRP. Para dilucidar estas preguntas, Girard y cols.⁹ en una de las series de pacientes con desprendimiento de retina prospectivas más largas, confirmaron el efecto de algunos factores, pero sus resultados añadieron más controversia a este respecto. De acuerdo a estos autores solo la VRP preoperatoria de bajo grado (grado A) es un predictor fuerte de VRP postoperatoria mientras que la VRP grado C1 no. Además, solo las hemorragias menores durante o después de la cirugía están asociadas con una alta prevalencia de VRP postoperatoria. Por otro lado, otros autores, encontraron como variables predictivas la perforación escleral, rompimientos sin sellar o agudeza visual preoperatoria pobre.^{13,14} Kon y cols.¹⁵ consideraron la vitrectomía primaria en casos selectos de desprendimiento de retina, que incluían desgarres de retina gigantes, rompimiento de retina posterior y la presencia de VRP preoperatorio y opacidades medias, y observaron que del 39% de los pacientes con VRP preoperatorio, 29.4% desarrollaron VRP postoperatoria.

Asumiendo que la VRP resulta de la interacción de múltiples factores, recientemente se sugirió una clasificación de los pacientes con desprendimiento de retina en diferentes grupos de riesgo de acuerdo a la razón de verosimilitud de desarrollar VRP.¹⁶ Se identificaron cinco factores de riesgo: VRP prequirúrgica grados A y B, desprendimiento de retina que afecten los cuatro cuadrantes, aplicación por endolaser, uso de gas intraocular, y cirugías intraoculares previas; así mismo se establecieron tres niveles de riesgo para el desarrollo de VRP: bajo, medio y alto. La distribución de los pacientes con desprendimiento de retina siguiendo este criterio mostró una clara correlación positiva con la incidencia de VRP postoperatoria.

En los años 90, los estudios se enfocaron en los factores clínicos, como afaquia o pseudoafaquia,¹⁷ desgarres gigantes,¹⁸ desprendimiento coroidal,¹⁹ hemorragia vítrea,²⁰ criopexia²¹ y desprendimiento posterior de vítreo incompleto.²² Estos

estudios proveyeron información clínica muy valiosa, pero no consideraron el origen multifactorial de la VRP, y aunque la mayoría de los estudios fueron prospectivos no se aseguró la similitud de sus muestras en cuanto a los factores que intervienen en el desprendimiento de retina que pueden influir en el desarrollo de la VRP.

Con la idea de utilizar parámetros más objetivos que la evaluación de los factores de riesgo establecidos, algunos autores han medido los niveles de varias sustancias en el humor vítreo. Las proteínas del humor vítreo han sido propuestas como marcadores del estado de inflamación, del rompimiento de la barrera hematorretiniana y de la severidad del proceso de cicatrización.¹⁵ Altas concentraciones de proteínas en el humor vítreo se observan en pacientes que desarrollan VRP postoperatoria en comparación con aquellos que no.¹⁵ Por ejemplo, el nivel de la molécula de adhesión intracelular – 1 (ICAM-1) se ha propuesto como un indicador de riesgo para VRP.²³ Estos autores reconocieron que las citocinas y varios factores inflamatorios se encuentran en el humor vítreo de los pacientes con VRP, pero no se ha probado que ninguno sea un indicador de riesgo para el desarrollo de esta complicación. La citometría de flujo es útil en la medición de la proliferación de las células que se recobran de la cavidad vítrea en un modelo experimental de desprendimiento de retina por tracción.²⁴ Los resultados mostraron que la citometría de flujo cuantifica la concentración total de las células en proliferación, pero la precisión para predecir el éxito anatómico no muestra diferencias.²⁵ En síntesis, identificar los factores clínicos para VRP parece crucial para establecer profilaxis farmacológica que todavía no es aceptable en este momento para pacientes con desprendimiento de retina.

Como se mencionó anteriormente, la VRP se considera un proceso de cicatrización amplificado por varios factores, algunos de ellos relacionados con niveles de inflamación intraocular elevados. La VRP también se considera un proceso de cicatrización que se produce después del desprendimiento de la retina.¹ Por lo tanto, parece que el factor crítico es la falta de continuidad de la retina. El proceso de cicatrización, con algunas modificaciones, puede ser el fenómeno que dispara el inicio de la VRP. Después de cualquier daño tisular, un

mecanismo en cascada repara la herida en tres fases: inflamación, proliferación y remodelación del tejido. Estas fases están reconocidas en la VRP con algunas modificaciones por las características del tejido ocular.²⁶ Nagasaki y cols.⁸ han asentado la importancia del rompimiento de la barrera hematorretiniana como el primer paso en la patogénesis de la VRP. Parece obvio que la alteración de esta barrera modifique el ambiente intraocular que permita las condiciones intraoculares necesarias para el desarrollo de la VRP. Por otro lado, este rompimiento de la barrera hematorretiniana es una constante en todos los desprendimientos de retina y solo una pequeña proporción desarrolla VRP. Además, la barrera hematorretiniana se lesiona en muchas otras condiciones (uveítis, afaquia, retinopatía diabética), y no se ha reportado la VRP como complicación de estas enfermedades. Por lo tanto, se debe dilucidar el papel real que juega el rompimiento de la barrera hematorretiniana en esta enfermedad.

Las bases celulares de la VRP fueron identificadas por Laqua y Machemer en 1975. Los macrófagos y los fibroblastos juegan un papel esencial en la cicatrización ocular. En estudios inmunohistoquímicos se han identificado células del epitelio pigmentado de retina (EPR) y células gliales como los principales componentes celulares en las membranas de la VRP.^{27,28} Algunos autores han identificado además macrófagos y linfocitos T.²⁹ El EPR y las células gliales muestran cambios morfológicos, migración y proliferación en respuesta a la lesión de la retina.³⁰ Aunque es difícil precisar el origen de cada célula observada en las membranas epirretinales, Vinos y cols.³¹ sugieren que se trata de células similares a fibroblastos derivadas del EPR; y probablemente un pequeño componente de macrófagos derivados de la sangre.

Las células del EPR son multifuncionales y pluripotenciales, características conferidas por su origen embriológico. El EPR se sitúa en una membrana basal prominente que contiene ácido hialurónico, condroitin sulfato y proteínas de la matriz extracelular típicas de cualquier membrana basal: colágenas tipo I, III, VI y VIII, y elastina.³² Las células del EPR son consideradas clave en el desarrollo de VRP, y hoy todavía parecen cruciales en su inicio. Los cambios que resultan después de que estas células pierden contacto con los fotorreceptores pueden

desencadenar mecanismos para el inicio de la VRP.³³ Las células del EPR están presentes en casi el 100% de las membranas epirretiniales,^{34,35,36} y tienen características morfológicas diferentes (como fibroblastos o como macrófagos).³⁶ Experimentos con células del EPR en cultivo han demostrado que el factor transformante del crecimiento β 2 (TGF β 2) puede cambiar su fenotipo y estimular la síntesis de colágena. Las células del EPR en la VRP toman la apariencia de fibroblastos y participan en la fibrosis, transformándose por lo tanto de su origen de células epiteliales.³⁷ Además, el TGF β 1 puede modificar el fenotipo de las células del EPR con cambios en la expresión de actina de músculo liso- alfa (α -sma) y la síntesis de fibronectina,³⁸ confiriéndoles características de miofibroblastos. En gatos, estas células proliferan en 48 h después del desprendimiento de retina y presentan mitosis.³³ Cuando éstas se transdiferencian, liberan factores que reemplazan las actividades de las células gliales y promueven la contracción de la matriz extracelular.³⁹ Varios experimentos han tratado de implicar a las células del EPR como la parte angular en el desarrollo de la VRP. Wu y cols.⁴⁰ sustrajeron las células de las membranas de VRP y demostraron que las complicaciones clínicas de los pacientes después de la cirugía se relaciona con la presencia de células del EPR activas o viables. Hay una gran cantidad de evidencia respecto a la función de mediadores solubles (factores de crecimiento y citocinas) en la patogénesis de la VRP.⁴¹ El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es un mitógeno y quimioatrayente de fibroblastos y células de la glía.⁴¹ Las células que secretan PDGF son las células de la glía y del EPR.⁴² Este factor ha sido implicado en retinopatías proliferativas, como la retinopatía diabética, y en retinopatías no vasculares, como en la vitreorretinopatía proliferativa.⁴³ El daño por retracción es la característica central de estas entidades patológicas,⁴⁴ y se ha demostrado que es un estimulador de crecimiento autócrino para las células de EPR ya que la creación de un defecto en una monocapa de EPR resulta en un incremento de PDGF y del receptor para PDGF en las células adyacentes al daño.⁴³ Se ha demostrado que 7 de 8 pacientes con daño de retina y vitreorretinopatía tienen concentraciones elevadas de PDGF en el humor vítreo.⁴⁵ Los resultados de Liang Y y cols.⁴³ indican que el

PDGF afecta la conducta celular del EPR por mecanismos autócrinos o parácrinos en la formación de VRP. Andrews y cols.⁴⁶ mostraron que el PDGF contribuye de manera importante al desarrollo de la VRP en un modelo animal de conejo, en el que demostraron la existencia de dos tipos de receptores de PDGF, el PDGF-A y el PDGF-B, con una marcada diferencia entre ellos; siendo el receptor PDGF-A capaz de desencadenar los eventos que llevan a la VRP.⁴⁴

El TGF- β es un potente quimioatrayente de monocitos y fibroblastos además de participar en todas las etapas de la cicatrización.⁴⁷ Las células del EPR, fibroblastos, plaquetas y macrófagos son capaces de secretar TGF β .^{41,48} El TGF β 2 es la isoforma predominante en el segmento posterior del ojo en los primates.⁴⁹ La contracción de los fibroblastos y el resultado de la fuerza de tracción es un factor que contribuye a las enfermedades fibróticas del ojo como la vitreorretinopatía proliferativa. Estudios llevados a cabo *in vitro* muestran que el TGF β estimula la síntesis y secreción de fibronectina y la contracción de geles de colágena por las células del EPR.^{38,50} Se sugiere que la estimulación de la contracción por el EPR de los geles de colágena por TGF β es mediada por otros factores de crecimiento, tal vez el PDGF.⁵¹ Ikuno y cols.⁵² demostraron que las células del EPR que migran al vítreo promueven la contracción celular mediante el TGF β y en menor proporción a través del PDGF-A. Carrington y cols.⁵³ confirman este postulado, y además observaron que la contracción de la retina se puede inhibir al utilizar anticuerpos en contra del PDGF y del TGF- β . Estudios realizados en humanos confirman este posible efecto del TGF β 2 en la VRP. Los niveles de TGF β en el humor vítreo de ojos de pacientes con VRP se encontraron tres veces más elevados en comparación con los de pacientes con desprendimiento de retina no complicado.⁵⁴ Kon y cols.¹⁵ confirmaron este hallazgo, pero encontraron las concentraciones de TGF β en el humor vítreo en pacientes con VRP solo 1.5 veces mayores.

Se ha investigado el posible papel de otros factores de crecimiento con respecto a la VRP. El estudio prospectivo realizado por Kon y cols.¹⁵ también mostró niveles del factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) elevados, así como de interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) en el humor vítreo de pacientes con

VRP. Por otro lado, ellos encontraron que solo la IL-6 y las proteínas totales elevadas fueron factores predictivos significativos para el desarrollo de VRP postoperatoria. Heuber y cols.⁵⁵ encontraron el bFGF y su RNAm, así como el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGFR-1) en la membranas epirretinales de los pacientes con VRP y concluyeron que el bFGF puede estar involucrado en el control de la proliferación celular en la interfase vitreoretiniana. El-Ghrably y cols.⁵⁶ detectaron concentraciones de IL-6, IL-1b, IL-8 y TNF- α en muestras de humor vítreo y en el líquido subretiniano por RT-PCR mayores en pacientes con VRP que en los controles. Además, los niveles del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) se han encontrado también elevados en pacientes con VRP.⁵⁷

Más recientemente también se han encontrado concentraciones elevadas de las quimiocinas MCP-1 y SDF-1 en pacientes con VRP.⁵⁸ Aunque muchos estudios sugieren la función de múltiples citocinas en la patogénesis de la VRP, la significancia relativa de cada factor y los mecanismos por los que interactúan para inducir la proliferación y contracción perirretiniales aún se tienen que dilucidar.

2.2. Epitelio pigmentado de la retina

El EPR es una monocapa de células cuboidales localizadas subyacentes a la retina neural.^{59 60} Las células del EPR tienen microvellosidades apicales y membranas paralelas laterales unidas cerca de los ápices por complejos de uniones ocludens y adherentes. Las células del EPR reciben su nombre de los melanosomas localizados en el citoplasma apical. Las células del EPR también contienen gránulos de lipofuscina, material autofluorescente que se incrementan a través de la vida en este tejido no-mitótico. La membrana basal del EPR está en contacto con la membrana de Bruch, una matriz de varias capas que separa el EPR del endotelio de los coriocapilares. A diferencia de la mayoría de las monocapas de células epiteliales, que tienen un dominio apical que se dirige al lumen, los ápices de las células del EPR están asociados con los segmentos externos de los fotorreceptores de la retina (conos y bastones).

La estrecha asociación estructural de las células del EPR con la retina externa provee un indicio de las principales funciones de este tejido, las cuales son ayudar a la sobrevivencia y al funcionamiento normal de los fotorreceptores. La capa de EPR actúa como la barrera hematorretiniana externa y opera como un epitelio transportador que mueve nutrientes, productos de desecho, iones, y gases entre los vasos sanguíneos de la coroides y los fotorreceptores adyacentes.⁶¹ El EPR participa en el ciclo visual en donde los retinoides, utilizados por los fotorreceptores para sintetizar los pigmentos visuales, son reciclados entre el EPR y la retina neural. Los fotorreceptores no son capaces de reisomerizar el *all-trans*-retinal, que se forma después de la absorción de los fotones, a *11-cis*-retinal. Para mantener la excitabilidad de los fotorreceptores, el *trans*-retinal se transporta al EPR para convertirlo a *11-cis*-retinal y se transporte de nuevo a los fotorreceptores.⁶² La conductancia iónica dependiente de voltaje de la membrana apical permite al EPR estabilizar la composición iónica en el espacio subretiano, que es esencial en el mantenimiento de la excitabilidad de los fotorreceptores.⁶³ El EPR es esencial para el recambio de los fotorreceptores, un proceso en donde los segmentos externos de los discos se mudan, fagocitan y digieren por el EPR,⁵⁹ y las sustancias esenciales como el retinal se reciclan y regresan a los fotorreceptores. Las células del EPR también producen factores de crecimiento así como factores que son esenciales para mantener la integridad estructural de la retina y los coriocapilares.⁶⁴ El EPR secreta factores de crecimiento fibroblásticos (FGF-1, FGF-2, and FGF-5), TGF- β , factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado del epitelio del cristalino (LEDGF), miembros de la familia de interleucinas y factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF).⁶⁵ Además, la actividad secretora del EPR es muy importante para establecer la respuesta inmune privilegiada del ojo al secretar factores inmunosupresores.⁶⁶

El epitelio pigmentado de la retina es una monocapa de células que parece fenotípicamente regular, pero tiene una gran variabilidad de célula a célula en el contenido de gránulos de melanina y lipofuscina, y en la expresión de muchas

proteínas. Esta heterogeneidad se da naturalmente por mecanismos de regulación durante el desarrollo embrionario y postnatal. La consecuencia es un tejido en donde las células individuales pueden diferir en su capacidad para mantener los fotorreceptores adyacentes, así como para responder diferencialmente al estrés oxidativo y otras influencias del medio ambiente que contribuyen a la disfunción celular durante la vejez. La variabilidad inherente de las células del EPR es probablemente uno de los factores que contribuyen a las características de las enfermedades de la retina como la degeneración macular relacionada con la edad. Las interacciones entre los tejidos (EPR y retina) son críticos, ya que el daño al EPR, o la separación de éste de los fotorreceptores como sucede con el desprendimiento de retina, puede llevar a la degeneración de los fotorreceptores.

2.3. Receptores de glutamato

El glutamato constituye del 10 al 15% de la poza de aminoácidos libres en la retina de los vertebrados.⁶⁷ Los receptores de glutamato se clasifican en ionotrópicos, aquellos que están conformados por un canal iónico, y metabotrópicos, que están acoplados a proteínas G y ligados a la activación de la fosfolipasa C (PLC), o a la inhibición o activación de la adenilil ciclasa (AC). Los receptores ionotrópicos se clasifican farmacológicamente, en N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) y receptores tipo kainato (KA).⁶⁸ Los canales formados por los receptores de AMPA y KA son permeables principalmente a Na^+ y K^+ . La mayoría de los canales asociados a los receptores de AMPA no son permeables al Ca^{2+} pero algunos receptores de AMPA en neuronas de hipocampo,⁶⁹ células bipolares de la retina,⁷⁰ células no piramidales de la corteza y células de la glía en cerebelo⁷¹ forman canales iónicos que son permeables al Ca^{2+} . Una serie de quinoxalin-2,3-dionas, como la 6-ciano-7-nitro-quinoxalin-2,3-dionas (CNQX), 6-7-dinitro-quinoxalin-2,3-diona (DNQX) y 2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoiil-benzol (F) quinoxalina (NBQX), bloquean completamente tanto a los receptores de tipo AMPA como a los de KA

competitivamente así como el dietil ester del glutamato (GDEE). Los no competitivos son la toxina de la araña Joro (JSTX) y las 2-3-benzodiazepinas GYKI 52466 y GYKI 53655, siendo estos dos últimos compuestos inhibidores específicos de los receptores de AMPA.⁶⁸

Los receptores de tipo NMDA tienen alta conductancia y permeabilidad al Ca^{2+} , y se desensibilizan relativamente lento. La respuesta lenta de estos receptores se debe a que están inhibidos tónicamente por el Mg^{2+} presente en el ambiente extracelular, aunque hay evidencia clara de que estos receptores están activos tónicamente a bajo nivel en el hipocampo y otras regiones del cerebro. La activación total de los receptores de NMDA requiere de la liberación del bloqueo por Mg^{2+} . Ya que la inhibición de los receptores de NMDA por Mg^{2+} es un fenómeno dependiente de voltaje, la activación de los receptores de AMPA/KA por glutamato dentro de la hendidura sináptica y la despolarización subsecuente de la membrana postsináptica disminuye la inhibición de los receptores de NMDA por Mg^{2+} activándose consecutivamente. Además del glutamato y del NMDA, los ácidos iboténico, L-homocisteico y quinolínico pueden activar los receptores de tipo NMDA. Los antagonistas de los receptores de NMDA se dividen en 4 categorías: los fosfoaminoácidos que compiten por los sitios de reconocimiento del L-glutamato y NMDA (2-AP5, 2-AP, CPP, CPP-ene), aquellos que bloquean el sitio de unión para los coagonistas de la glicina (ácido 5,7-diCl-quinurenico, HA-966), aquellos que inhiben el aumento alostérico de la activación del agonista por las poliaminas (ifenprodil), y aquellos que inhiben el canal iónico asociado al receptor (MK-801, PCP, ketamina). Todos los antagonistas mencionados anteriormente inhiben selectivamente a los receptores de tipo NMDA.⁶⁸

Los receptores metabotrópicos (mGlu) poseen siete segmentos transmembranales y están acoplados a proteínas unidas a GTP. Forman una familia de ocho subtipos, que se han subdividido en tres grupos. El grupo I se conforma por los receptores mGlu1 y -5, los cuales están acoplados a proteínas G_q , que activan la PLC, con la subsecuente hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato, que genera inositol trifosfato (IP_3) y diacil glicerol (DAG). Los grupos II (mGlu2 y 3) y III (mGlu4, -6, -7, -8) están acoplados a proteínas G_i , y su activación inhibe la

actividad de la AC en sistemas heterólogos de expresión.⁶⁸ Algunos de los agonistas, además del L-glutamato, que actúan sobre los receptores metabotrópicos de glutamato son también agonistas de los receptores ionotrópicos (ácidos quisqualico e iboténico). Para aquellos receptores que están acoplados a la PLC el quisqualato es el agonista mas potente seguido por el glutamato y los ácidos iboténico y 1-aminacidopentano-1S,3R-dicarboxílico (1S, 3R-ACPD). Estos receptores están acoplados a proteínas G (Gi/Go ó Gq) sensibles o insensibles a la toxina pertusis (PTX) (Grupo I). La activación de estos receptores lleva a la conversión catalizada de la PLC del L-3-fosfatidilmioinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) a inositol-4,5-bifosfato y DAG. El último está involucrado en la activación de la proteína cinasa C (PKC), mientras que el IP₃ potencia la liberación intracelular de Ca²⁺ del retículo endoplásmico. Los receptores del segundo grupo inhiben a la AC y por lo tanto disminuyen la síntesis de 3,5-adenosin monofosfato cíclico (cAMP) con la consiguiente inactivación de la proteína cinasa A (PKA). El grupo III de receptores metabotrópicos dispara un mecanismo similar al descrito anteriormente, ya que inhibe la AC a través de la interacción directa con proteínas Gi sensibles a PTX. Algunos receptores metabotrópicos se activan directamente a través de proteínas G acopladas a receptores o indirectamente a través de la estimulación de la PKC que inhibe los canales de Ca²⁺ L y N y los canales de K⁺ activados por Ca²⁺. Estos también se activan directamente a través de la despolarización y la entrada de Ca²⁺ que induce la liberación de ácido araquidónico.⁶⁸

Los receptores NMDA y metabotrópicos se han identificado farmacológicamente con ensayos de unión de radioligando en células de EPR de pollo y humano.^{72 73}
⁷⁴ También se demostró que los receptores mGlu que están en las células del EPR de pollo son mGlu1 y -5, así como los receptores ionotrópicos NMDA y AMPA/kainato.⁷²

2.4. Cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAP cinasas)

Las MAP cinasas son cinasas de proteína serina/treonina, que juegan un papel crucial en una variedad de funciones en muchos tipos celulares.⁷⁵ Se han descrito

principalmente tres subfamilias de MAP cinasas: ERK 1 y 2, las cinasas MH2-terminal c-Jun (JNK), y las cinasas p38. De entre estas cinasas, la activación de ERK está típicamente asociada con la sobrevivencia, proliferación y desdiferenciación celular, activación inducida por mitógenos y algunos factores de sobrevivencia celular.^{76 77}

Ras es una proteína G que se activa por su unión con GTP, común en el inicio de varias vías de señalamiento incluyendo Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/AKT y RalEGF/Ra1.⁷⁸ Se han identificado tres isoformas de la proteína Ras: Ha-Ras, Ki-Ras y N-Ras. Ki-Ras es la isoforma que se ha asociado con la vía de Raf/MEK/ERK⁷⁹ y su mutación se asocia con cáncer. Para que se pueda activar Ras en la membrana celular, tiene que ser farnesilada por la farnesil transferasa (Ha-, Ki, y N-Ras) o geranilgeranilada por la geranilgeranil transferasa (N- y Ki-Ras). Ha-Ras y N-Ras también presentan palmitoilación, no así Ki-Ras.⁸⁰ Después de que citocinas, factores de crecimiento o mitógenos se unen a sus receptores apropiados, se activa el complejo asociado Shc/Geb2/SOS. Después de la estimulación por Shc/Geb2/SOS, Ras inactiva intercambia GDP por GTP y sufre un cambio conformacional y se activa. Ras puede entonces reclutar a Raf a la membrana celular.

La familia de genes Raf en mamíferos comprende A-Raf, B-Raf y Raf-1 (C-Raf). Raf es una cinasa de serina/treonina (S/T) y se activa normalmente por una serie de eventos complejos que incluyen: 1) reclutamiento a la membrana celular mediado por la interacción con Ras;⁷⁹ 2) dimerización de las proteínas Raf;⁸¹ 3) fosforilación/desfosforilación sobre los diferentes dominios;⁸² 4) desasociación de la proteína inhibidora de la cinasa Raf (RKIP);^{83 84} y 5) asociación con complejos de andamiaje como la cinasa supresora de Ras (KSR).^{85 86 87}

La actividad de Raf está modulada por proteínas chaperonas como Bag1, 14-3-3⁸⁸ y la proteína de choque térmico 90 (Hsp90).⁸⁹ Raf-1 tiene por lo menos 13 sitios de fosforilación.^{90 91} Algunos de estos sitios (S43, S259 y S621) están fosforilados cuando Raf-1 está inactiva. Inmediato a la estimulación celular, el sitio S621 se desfosforila transitoriamente por una fosfatasa aun no identificada. Las fosfatasas como la proteína fosfatasa 2A (PP2A), desfosforilan el sitio S259.⁸⁴ Entonces la

proteína 14-3-3 se desliga de Raf-1, permitiendo que Raf-1 sea fosforilada en S338, Y340 y Y341, y en consecuencia se activa. La familia de cinasas Src es responsable de la fosforilación en los sitios Y340 y Y341.⁹²

Las fosfatasas que desfosforilan en el sitio S261 y otros sitios de fosforilación de Raf, a excepción del sitio S259, no se conocen. Los sitios Y340 y Y341, sitios blanco para las cinasas de la familia Src, están conservados en A-Raf (Y299 y Y300), pero están reemplazados con ácido aspártico (D) en la posición correspondiente en B-Raf (D492 y D493).^{82 92}

Los residuos de ácido aspártico cargados negativamente semejan residuos activados, lo que hace a B-Raf altamente activo. La máxima activación de Raf-1 y A-Raf requiere tanto de la actividad de Ras como de Src, mientras que la activación de B-Raf es independiente de Src.⁹² El residuo S388 presente en Raf-1 está conservado entre las tres isoformas de Raf; aunque en B-Raf (S445), el sitio correspondiente está fosforilado constitutivamente.⁹³

La fosforilación de Raf-1 en el sitio S388 se estimula por Ras y es dependiente de la cinasa de proteína activada-p21 (PAK).⁹⁴ Otros sitios de fosforilación de Raf-1 que pueden modular su actividad son: S43, S339, T491, S494, S497, S499, S619 y S621. Se ha observado que la PKC activa a Raf e induce un entrecruzamiento entre la vía de señalamiento de la PKC y de Ras/Raf/MEK/ERK.⁹⁵ Se ha identificado que la PKC fosforila a Raf-1 en los sitios S497 y S499; aunque otros estudios sugieren que estos sitios no son necesarios para activar a Raf-1.⁹⁶ La actividad de Raf está regulada negativamente por la fosforilación del dominio de regulación CR2. Las proteínas PKA y Akt fosforilan a Raf-1 en el sitio S259 e inhiben su actividad. Además, la proteína Akt o la cinasa regulada por suero/glucocorticoides fosforila a B-Raf en los sitios S364 y S428 e inactiva su actividad de cinasa. Estas fosforilaciones en serina de Raf se asocian con la proteína 14-3-3 e inactivan a Raf.⁸⁰ Recientemente, se ha demostrado que la proteína de andamiaje RKIP inhibe la actividad de Raf-1.⁸³ RKIP es un miembro de la familia de proteínas de unión a la fosfatidiletanolamina. Esta familia multigénica está conservada evolutivamente en bacterias, plantas y animales.⁹⁷ Interesantemente, RKIP se puede unir a Raf o al módulo MEK/ERK pero no a Raf,

MEK y ERK juntas. Se sabe que varias isoformas de la PKC fosforilan RKIP en el sitio S153, lo que lleva a la disociación de Raf y RKIP. La proteína Hsp90 puede ayudar a estabilizar a Raf una vez activada. Raf también es blanco de caspasas. La importancia de Raf-1 en la vía de transducción de señales Ras/Raf/MEK/ERK se ha puesto en entredicho ya que se describió que B-Raf es un activador mucho más potente de MEK en comparación con Raf-1 y A-Raf.⁸⁰

MEK1 es una cinasa de proteína dual de tirosina y serina/treonina.⁹⁸ Su actividad está regulada positivamente por la fosforilación de Ras en los residuos de S en el dominio catalítico. Los tres miembros de la familia Raf son capaces de fosforilar y activar MEK pero se ha observado que en diferente grado (B-Raf>Raf-1>A-Raf).⁹⁸ El blanco predominante de MEK1 es ERK, en contraste con Raf y ERK que tienen múltiples blancos.⁸⁰

Las cinasas reguladas por señales extracelulares 1, 2 (ERK) son cinasas S/T y cuya actividad está regulada positivamente por fosforilación mediada por MEK1 y MEK2. Las cinasas ERK pueden fosforilar directamente muchos factores de transcripción incluyendo Ets-1, c-Jun y c-Myc. ERK también puede fosforilar y activar la cinasa S6 ribosomal de 90kDa (p90^{Rsk}), que activa consecutivamente al factor de transcripción CREB.⁸⁷ ERK1 y ERK2 son reguladas diferencialmente. ERK2 ha sido asociada positivamente con proliferación mientras que ERK1 puede inhibir los efectos de ERK2 en ciertas células.⁹⁹

Ras y sus moléculas activadas modulan la expresión de muchas moléculas que regulan el ciclo celular como p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b} y p21^{Cip1}, y pueden producir la interrupción del ciclo celular en la fase G1. p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b} y p21^{Cip1} median la interrupción prematura en la fase G1 y el subsecuente envejecimiento celular es dependiente de la vía de Ras/Raf/MEK/ERK.^{85 100}

3. Planteamiento del problema

Aunque los esfuerzos se han dirigido a la identificación de los componentes que pueden inducir los cambios morfológicos y fisiológicos que se observan en la VRP, los mecanismos moleculares de estas alteraciones aun no están claros. Varios factores han sido asociados con la fisiopatogenia de la VRP, entre ellos, el PDGF,⁴⁵ bFGF, TGF- β ,⁵⁴ HGF,¹⁰¹ Il-6¹⁰¹ así como Il-1 β .¹⁵ Estudios recientes han demostrado un incremento en las concentraciones de glutamato en el vítreo de pacientes con desprendimiento de retina de tipo regmatógeno.¹⁰² Además, el glutamato se libera transitoria y excesivamente por la retina durante la isquemia,¹⁰³ ¹⁰⁴ provocando degeneración neuronal en la retina.¹⁰⁵

Además, el glutamato se libera de las neuronas de la retina en respuesta a varios tipos de estrés, como en el trauma, en la fotocoagulación, en el desprendimiento de retina y en la diabetes.¹⁰⁶ Cuando estos eventos patológicos se presentan, las células del EPR proliferan y migran a la retina.³⁰ Por lo tanto, el glutamato podría estar involucrado en los cambios proliferativos de las células del EPR después del estrés, así como durante la cicatrización. También se ha observado, que los antagonistas del glutamato inhiben la proliferación de las células tumorales.¹⁰⁷

Uchida y cols.¹⁰⁸ demostraron que al tratar células del EPR de rata con glutamato se estimula la proliferación de manera dependiente de la concentración, principalmente a través de los receptores de tipo NMDA. Por otro lado, Hecquet y cols.¹⁰⁹ así como Liou y cols.¹¹⁰ demostraron que ERK1/2 juega un papel muy importante en el control de la proliferación y migración de las células del EPR. Asimismo, se observó que en cultivos primarios de astrocitos, el glutamato induce proliferación a través de la activación de ERK1/2 y de la síntesis de DNA.¹¹¹ Por lo anterior, es posible que el glutamato pueda interactuar a través de la vía de MAP cinasas/ERK estimulando la proliferación de las células del EPR.

A este respecto, las células de EPR humano cultivadas en presencia de suero sufren una desdiferenciación morfológica y pérdida de melanosomas, paralelamente a cambios en las propiedades bioquímicas y farmacológicas de los receptores de glutamato.⁷⁴ La transformación fibroblástica del EPR en este modelo se acompaña asimismo de un incremento en la proliferación celular, semejante a

la sufrida por las células de la VRP. Este cambio morfológico de las células del EPR se conoce como transición epitelio-mesénquima. La transición epitelio-mesénquima es una variante de la transdiferenciación y de un mecanismo bien reconocido en la dispersión de las células en embriones de vertebrados,¹¹² en la formación de fibroblastos en tejidos lesionados,¹¹³ o en la iniciación de metástasis en el cáncer epitelial.¹¹⁴ Por lo tanto, el glutamato también podría inducir la transición epitelio-mesénquima de las células del EPR y en consecuencia la formación de las membranas en la VRP.

¹⁰¹ Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:463-89

¹⁰² Diederer RM, La Heij EC, Deutz NE, Kijlstra A, Kessels AG, van Eijk HM, Liem AT, Dieudonne S, Hendrikse F. Increased glutamate levels in the vitreous of patients with retinal detachment. *Exp Eye Res.* 2006;83:45-50.

¹⁰³ Neal M, Cunningham J. Modulation by endogenous ATP of the light-evoked release of ACh from retinal cholinergic neurones. *Br J Pharmacol.* 1994;113:1085-7

¹⁰⁴ Rego AC, Santos MS, Oliveira CR. Oxidative stress, hypoxia, and ischemia-like conditions increase the release of endogenous amino acids by distinct mechanisms in cultured retinal cells. *J Neurochem.* 1996;66:2506-16.

¹⁰⁵ Toti P, Morocutti A, Sforzi C, De Santi MM, Catella AM, Baiocchi S. The subretinal fluid in retinal detachment. A cytologic study. *Doc Ophthalmol.* 1991;77:39-46.

¹⁰⁶ Okisaka S, Liu GJ, Mizukawa A. Comparative histopathological study of free-running mode and continuous wave Nd:YAG laser photocoagulation of monkey retina and choroid. *Jpn J Ophthalmol.* 1991;35:233-58.

¹⁰⁷ Stepulak A, Sifringer M, Rzeski W, Endesfelder S, Gratopp A, Pohl EE, Bittigau P, Felderhoff-Mueser U, Kaindl AM, Buhner C, Hansen HH, Stryjecka-Zimmer M, Turski L, Ikonomidou C. NMDA antagonist inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and suppresses cancer growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:15605-10.

¹⁰⁸ Uchida N, Kiuchi Y, Miyamoto K, Uchida J, Tobe T, Tomita M, Shioda S, Nakai Y, Koide R, Oguchi K. Glutamate-stimulated proliferation of rat retinal pigment epithelial cells. *Eur J Pharmacol.* 1998;343:265-73.

¹⁰⁹ Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, Engelmann K, Mascarelli F. Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelial cells: ERK and RPE cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:3091-8.

¹¹⁰ Liou GI, Matragoon S, Samuel S, Behzadian MA, Tsai NT, Gu X, Roon P, Hunt DM, Hunt RC, Caldwell RB, Marcus DM. MAP kinase and beta-catenin signaling in HGF induced RPE migration. *Mol Vis.* 2002; 8:483-93.

¹¹¹ Schinkmann KA, Kim TA, Avraham S. Glutamate-stimulated activation of DNA synthesis via mitogen-activated protein kinase in primary astrocytes: involvement

of protein kinase C and related adhesion focal tyrosine kinase. *J Neurochem.* 2000; 74:1931-40

¹¹² Hay, E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformations. *Acta Anat.* 1995; 154:8–20. 18.

¹¹³ Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 2002;110:341-50.

¹¹⁴ Kiemer, A.K., Takeuchi, K., and Quinlan, M.P. Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression. *Oncogene.* 2001; 20:6679–88.

4. Hipótesis

El glutamato activa la vía de MEK/ERK en las células de EPR de rata promoviendo la proliferación y desdiferenciación de las células del EPR, que son las principales características de la VRP.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Investigar la participación del glutamato en la proliferación y en la transición epitelio-mesénquima de las células del EPR en cultivo, como un modelo para identificar los mecanismos bioquímicos que intervienen en la generación de la VRP humana.

5.2. Objetivos específicos

- 5.2.1. Desarrollar un modelo experimental de VRP en células de EPR de rata Long Evans en cultivo.
- 5.2.2. Caracterizar bioquímica y farmacológicamente los receptores de glutamato en las células del EPR de rata Long Evans.
- 5.2.3. Evaluar el efecto del glutamato sobre la proliferación celular en las células del EPR de rata Long Evans.
- 5.2.4. Evaluar el efecto del glutamato sobre la transición epitelio-mesénquima en las células del EPR de rata Long Evans.
- 5.2.5. Evaluar el efecto del glutamato sobre la activación de la vía MEK/ERK
- 5.2.6. Identificar si la vía de MEK/ERK media la proliferación y la transición epitelio-mesénquima de las células del epitelio pigmentado de retina de rata Long Evans cuando se activa por glutamato.

6. Metodología

6.1. Cultivo primario de células del EPR

Fueron extraídos los globos oculares de ratas Long Evans de 8 a 10 días de edad y fueron colocados en una solución de Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, Grand Island, NY) con antibióticos (penicilina y estreptomicina 0.0125%, neomicina 0.025% y nistatina 0.01%). Posteriormente fueron incubados en DMEM con dispasa (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) al 2% por 30 min a 37°C. Al término fueron lavados dos veces con DMEM, se retiró la coroides y la esclera dentro del medio y se extrajo el EPR colocándolo en solución Hank's libre de Ca^{2+} y Mg^{+} por 15 min. Se centrifugó por 5 min a 2000 rpm, se eliminó el sobrenadante. El EPR se incubó con 2 ml de Hank's libre de Ca^{2+} y Mg^{+} con tripsina al 0.1% (trypsin-EDTA, Gibco) por 3 minutos hasta que se disociaron las células en fragmentos de 2-10 células con ayuda de una pipeta Pasteur; se detuvo la tripsinización añadiendo exceso de DMEM con 10% SFB (suero fetal bovino, Gibco) (3ml). Se centrifugó por 5 min a 2000 rpm y se resuspendió en OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) con SFB al 4% (10 ml). Se realizó el conteo de las células y las células fueron sembradas en medio OptiMEM con SFB al 4% en cajas de cultivo en una proporción de 125, 000 células por centímetro cuadrado.

6.2. Subcultivo de células del EPR

Se extrajo el sobrenadante de las células de EPR de las cajas de cultivo, se añadió Tripsina 0.1% y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se terminó la tripsinización añadiendo exceso de OptiMEM con 4% de SFB. Se raspó la caja para coleccionar las células. Se recogió la suspensión y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en OptiMEM con 4% SFB. Se contaron las células, y fueron sembradas en proporción de 100,000 a 125,000 células por centímetro cuadrado en OPTIMEM con 4% SFB.

6.3. Determinación de la expresión de la proteína RPE65 por inmunocitoquímica

Las células del EPR en confluencia, previamente sembradas sobre cubreobjetos, fueron lavadas dos veces con PBS por 5 min, fueron fijadas con paraformaldehído al 3.75% por 15 min y a continuación fueron lavadas dos veces con PBS por 10 min. Fueron permeabilizadas con triton 0.1% por 3 min y fueron lavadas inmediatamente con PBS y dos veces más por 5 min. Las células fijadas y permeabilizadas fueron bloqueadas con PBS más Tween 0.1% y albúmina 3% por 1h a 4°C, a continuación fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-RPE65 a una dilución 1:250 toda la noche. La preparación fue lavada seis veces por 10 min con PBS más Tween 0.1% y se agregó el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína (FITC) a la misma dilución que el anticuerpo primario por 2.5 h. Fueron lavadas seis veces por 10 min y se montó la preparación. Las células fueron observadas en el microscopio confocal FV1000 Olympus Fluoview.

6.4. Evaluación de la dinámica del citoesqueleto con α -sma por inmunocitoquímica

Las células del EPR en confluencia, previamente sembradas sobre cubreobjetos, fueron lavadas dos veces con PBS por 5 min, fueron fijadas con paraformaldehído al 3.75% por 15 min y a continuación fueron lavadas dos veces con PBS por 10 min. Las células fijadas fueron bloqueadas con PBS más Tween 0.1% y albúmina 3% por 1h a 4°C, a continuación fueron incubadas con el anticuerpo primario anti- α -sma a una dilución 1:500 toda la noche. La preparación fue lavada seis veces por 10 min con PBS más Tween 0.1% y se agregó el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína (FITC) a la misma dilución que el anticuerpo primario por 3 h. Fueron lavadas seis veces por 10 min y se montó la preparación. Las células fueron observadas en el microscopio confocal FV1000 Olympus Fluoview. Para evaluar los cambios inducidos por los diferentes fármacos, 24h después de haber sembrado las células, se les retiró el suero por 24h más, y posteriormente se les agregó glutamato (1 mM) durante 48 h, PD98059 (30 μ M) durante 24 h o ambos.

6.5. Evaluación de la proliferación de las células del EPR estimulada por glutamato

24 horas después de que las células fueron sembradas, se adicionó medio sin suero por 24 h. Posteriormente fue adicionado glutamato monosódico en concentración de 0 (control), 0.25, 0.5 y 1.0 mM. Para analizar la proliferación en estas células, se utilizó la solución de proliferación celular CellTiter 96® a los 2 días del tratamiento. El ensayo de proliferación con la solución CellTiter 96® es un método colorimétrico que se utiliza para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación: utiliza la conversión celular de la sal tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal inerte; MTS) en un producto formazan, que se puede detectar con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. Para evaluar la acción de los agonistas de glutamato, a las 24 h después de que las células se cultivaron se adicionó glutamato monosódico (1mM), ACPD: agonista de los receptores de glutamato metabotrópicos (1 mM), AMPA: agonista de los receptores de glutamato ionotrópicos de tipo AMPA (1 mM), NMDA: agonista de los receptores de glutamato ionotrópicos de tipo NMDA (1 mM). Para evaluar la acción de los antagonistas, estos fueron adicionados 30 min antes de tratar a las células con glutamato a las siguientes concentraciones: MCPG 300 µM (antagonista de los receptores de glutamato de tipo metabotrópicos), CNQX 300 µM (antagonista de los receptores de glutamato de tipo AMPA) y MK-801 50 µM (antagonista de los receptores de glutamato de tipo NMDA).

6.6. Cuantificación de los receptores de glutamato por la técnica de unión de radiologando empleando glutamato- H^3

A los cultivos en confluencia (7 días) se les retiró el medio de cultivo y fueron lavadas dos veces con Tris-HCl 0.05 M (pH 7.4), las células fueron cosechadas en este buffer, posteriormente fueron transferidas a un homogenizador para romperlas, en frío, utilizando un homogenizador vidrio - vidrio. Fueron dejadas en

hielo durante 15 minutos. Después fueron centrifugadas durante 20 minutos a 28,000 rpm (rotor 50 Ti) en la ultracentrífuga a 4°C. El sobrenadante fue retirado, la pastilla fue resuspendida en el mismo buffer y se volvió a centrifugar. Fueron lavadas dos veces más, y en el último lavado antes de centrifugar se tomó una alícuota para determinar la proteína por el método de Bradford.¹¹⁵ Para el ensayo de unión específica de Glutamato – H³, fueron utilizadas membranas totales, previamente lavadas. La pastilla fue resuspendida en un volumen para tener 25 µg prot/155 µl del buffer que se usó en el ensayo. Se agregó a todos los tubos 10 µl del compuesto radiactivo, (³H-Glu =50 nM). Se agregó a los tres primeros tubos 10 µl de buffer y a los tres restantes 10 µl del compuesto frío como competidor de la unión específica del glutamato – H³, (Glu 10µl/175µl = 1 mM). Se administró a todos los tubos 155 µl de la suspensión de membranas y fueron incubados a 4°C durante 10 min. La reacción fue detenida por centrifugación durante 2 minutos. El sobrenadante fue retirado, se les agregó buffer frío y fueron lavados dos veces. Se agregó 100 µl de SDS al 2% al pellet, y se dejó aproximadamente 12 horas para que se digiriera completamente. Finalmente cada tubo fue colocado en un vial, fueron agregados 5 ml de centelleador (tritosol), fueron agitados y la radioactividad fue medida en un contador de centelleo líquido.¹¹⁶ Se llevó a cabo experimentos de competencia con diferentes agonistas (AMPA: receptor ionotrópico de tipo AMPA, NMDA: receptor ionotrópico de tipo NMDA, trans-ACPD: receptores metabotrópicos) y antagonistas de los receptores de glutamato, (CNQX: receptor ionotrópico de tipo AMPA/KA, MCPG: receptorores metabotrópicos, APV: receptor ionotrópico de tipo NMDA). Con los datos obtenidos fueron calculadas las constantes cinéticas de los receptores (número de sitios y afinidad) por el método de Eadie-Hofstee, modificación de Scatchard. Mediante el uso de agonistas y antagonistas específicos, se estableció el perfil farmacológico para definir los subtipos de receptor de glutamato presentes en la membrana. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

6.7. Análisis de inmunodetección para Erk1/2 y α -sma en células del EPR de rata

Las células de EPR de rata fueron utilizadas a los 7 días de cultivo. Fueron incubadas en medio OPTIMEM sin SFB la noche anterior. Las células fueron lavadas tres veces con Krebs Ringer bicarbonato especial para EPR (KRBE). Las células fueron incubadas de acuerdo al siguiente protocolo: para evaluar el efecto de la concentración del glutamato sobre la activación de ERK las células fueron estimuladas con 0.5, 1.0 y 2.0 mM de glutamato por 10 min; para evaluar el patrón de activación de ERK fueron estimuladas con 1.0 mM de glutamato por 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60 y 90 min; para evaluar la participación de los agonistas sobre la activación de ERK fueron estimuladas con 1.0 mM de ACPD, AMPA y NMDA; los antagonistas de los receptores de glutamato fueron agregados 30 min antes de estimular con glutamato 1.0 mM a una concentración de 300 μ M CNQX y MCPG y 50 μ M de MK-801. Al terminar el tiempo de incubación las células fueron lavadas una vez con KRBE. Se agregó buffer de lisis (Tris-HCl pH= 7.4 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 10 Mm, SDS 0.1%, Triton 1%, Chaps 1%, NP40 0.5%, BSA [Albúmina bovina] 0.1%) con inhibidores de proteasas y fosfatasas, y las células fueron lisadas. Se agregó buffer Laemmli¹¹⁷ a los inmunoprecipitados y las muestras fueron hervidas por 5 min. La separación de las proteínas fue realizada por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% a 30 V y fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF. Después de bloquear las membranas por 30 min a temperatura ambiente, fueron incubados con los anticuerpos primarios -MAP cinasa ERK1/ERK2 (pThr202/Tyr204, 1:1 000, Calbiochem) por 36 h, anti-ERK1/2 (1:10 000; Calbiochem), anti- α -sma (1:10 000, Sigma) y anti-actina (1:5 000, Calbiochem) por 1 h. Se reveló con substrato quimioluminiscente para peroxidasa (ECL, Amersham).

7. Resultados

7.1. Las células del EPR en cultivo son un modelo experimental para estudiar la VRP

Se desarrolló el cultivo y subcultivo de células del EPR de rata Long Evans para estandarizar un modelo experimental que permita el estudio *“in vitro”* de la VRP. Fueron utilizados cultivos primarios de células de EPR y también el subcultivo 5. Se observa que las células de los cultivos primarios presentan una morfología típica poligonal con presencia de melanosomas (Figura 1A). A partir del subcultivo 3, las células pierden la forma epitelial de tipo hexagonal, se transforman a una morfología aplanada, fusiforme, semejando fibroblastos, pierden el pigmento y llegan a confluencia en menor tiempo (Figura 1B). Por medio del análisis inmunocitoquímico de la proteína α -sma se observa que las células presentan fibras de estrés, en el cultivo primario también se observan dichas fibras, aunque en menor proporción, debido probablemente al estrés propio del cultivo (Figura 1E). Las células de los subcultivos muestran mayor cantidad de fibras lo que confirma el cambio de morfología (Figura 1F). Estos resultados son compatibles con los reportados por López-Colomé y cols.⁷⁴ donde se demostró que las células del EPR humano cultivadas en presencia de suero sufren una transformación morfológica y pérdida de la melanina, paralelamente a cambios en las propiedades bioquímicas y farmacológicas de los receptores de glutamato.

La transición epitelio-mesénquima del EPR en este modelo se acompaña así mismo de un incremento en la proliferación celular, semejante a la sufrida por las células de la VRP. La proteína RPE65 participa en la trans-isomerización del retinol en el EPR, y se considera un marcador bioquímico de las células del EPR.¹¹⁸ Para caracterizar las células del EPR de cultivos primarios y las células transformadas de los subcultivos, se determinó la expresión de la proteína RPE65 por medio de análisis inmunocitoquímico (Figura 1C y D). Los resultados muestran que aunque las células transformadas tienen una menor intensidad de la proteína RPE65, dicha proteína está presente (Figura 1D), por lo tanto las células en los subcultivos con morfología en forma de huso son células epiteliales y se descarta una posible contaminación con fibroblastos de otro tejido. Consecuentemente se

concluye que las células de EPR de rata en cultivo son un modelo adecuado en donde se puede estudiar la transición epitelio-mesénquima.

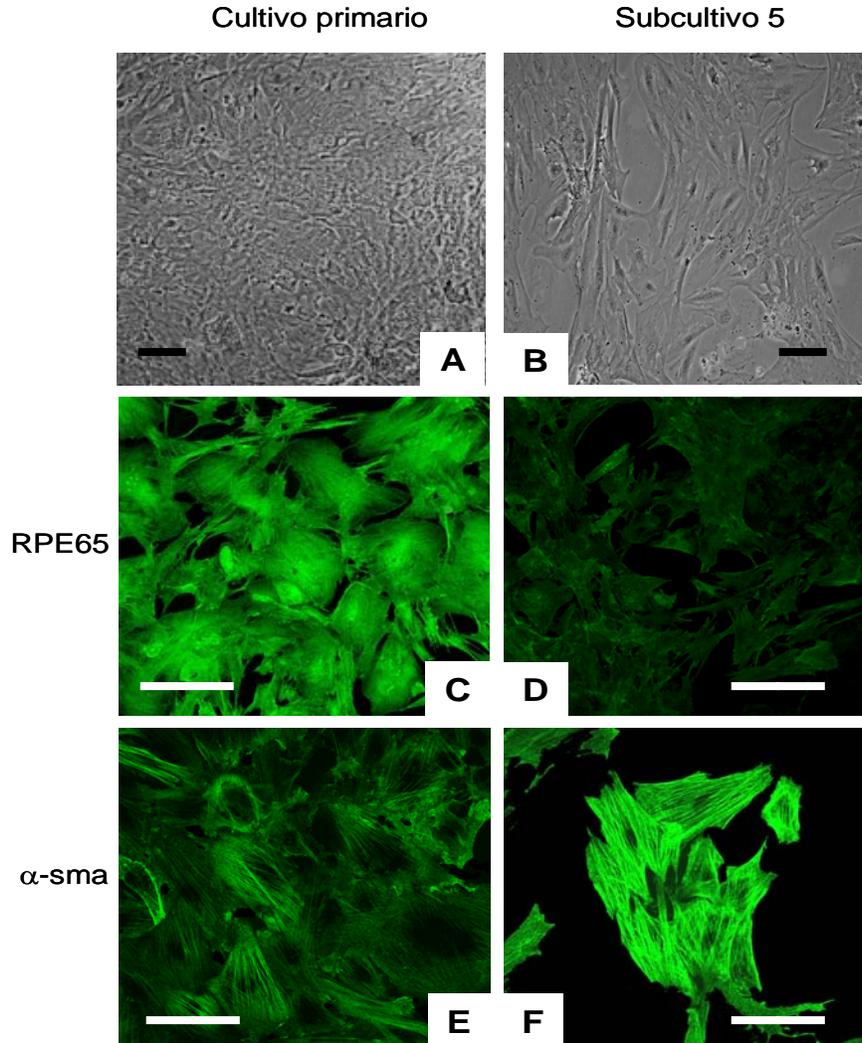


Figura 1. Caracterización de las células de EPR en cultivo. **A.** Las células de cultivo primario de EPR de rata, en confluencia (7 días), muestran una morfología epitelial y melanosomas. **B.** Las células de EPR de rata en el subcultivo 5, al 85% de confluencia (4 días), muestran una morfología aplanada en forma de huso (fibroblástica) y pérdida de melanosomas. **C.** Inmunodetección de la proteína RPE65 en las células de EPR de rata de cultivo primario. **D.** Inmunodetección de la proteína RPE65 en células de EPR de rata en el subcultivo 5. **E.** Inmunodetección de la proteína α -sma en células del EPR de rata de cultivo primario. **F.** Inmunodetección de la proteína α -sma de células de EPR de rata en el subcultivo 5. A y B, microscopía de luz. C-E, microscopía confocal.

7.2. Caracterización bioquímica de los receptores de glutamato en células del EPR de rata

Los receptores de glutamato en las células de EPR de rata no han sido caracterizados. En este estudio los receptores de glutamato en las células de EPR de rata Long Evans fueron caracterizados. Se midió la unión específica de Glu-H³ a membranas de células de EPR de cultivo primario. La unión a Glu-H³ mostró ser saturable en una concentración de 50 nM a 2.5 mM. Por el análisis de Eadie-Hofstee, modificación de Scatchard, se obtuvo una BMAX (número de receptores) de 45.89 pmol/mg prot y una Kb (afinidad de los receptores) de 260.9 nM (Figura 2A). Estos resultados concuerdan con los reportados anteriormente para las

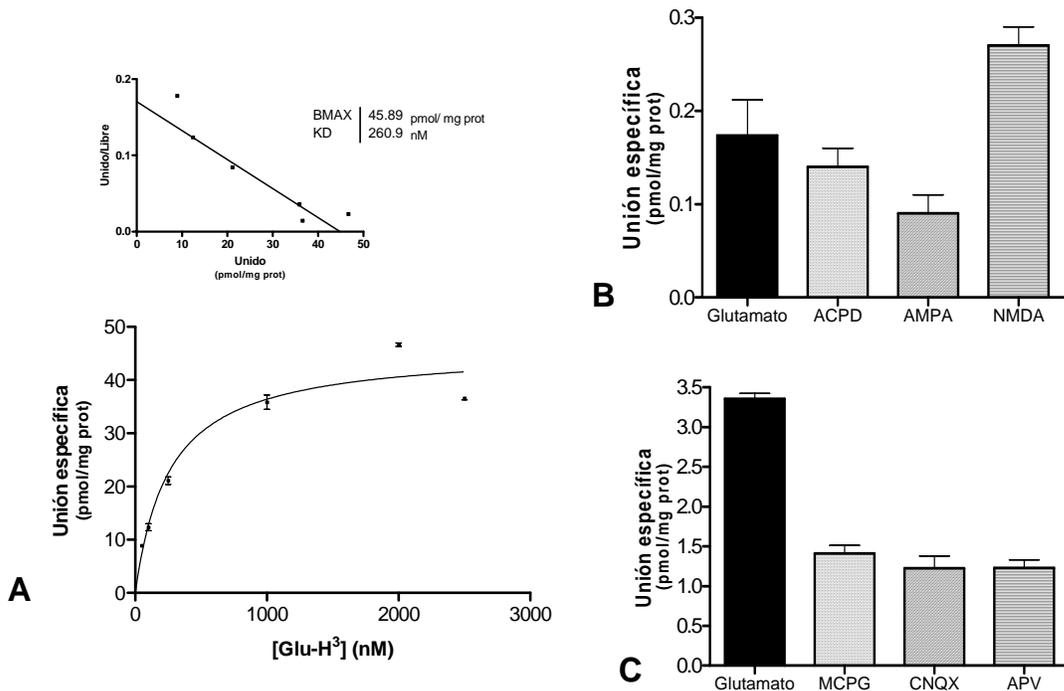


Figura 2 . Caracterización de los receptores de glutamato en cultivo primario de células de EPR de rata. **A.** Curva de saturación y análisis de Scatchard de la unión específica del glutamato a las membranas de EPR de rata. Los experimentos se realizaron utilizando 50-2500 nM de Glu-[H³]. La unión no específica se definió en presencia de 1mM de glutamato frío. Los resultados son el promedio±E.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **B.** Desplazamiento de la unión de Glu-[H³] por sus agonistas. **C.** Desplazamiento de la unión de Glu-[H³] por sus antagonistas. Los experimentos se realizaron utilizando 50 nM Glu-[H³] como ligando; todos los agonistas y antagonistas se utilizaron a una concentración de 1mM. Los datos están expresados como el promedio±E.E. de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

células de EPR de humano y pollo.^{73 74} Al realizar el ensayo por competencia empleando agonistas y antagonistas específicos para cada subtipo de receptor, se demostró la presencia de los tres tipos de receptores de glutamato: AMPA, NMDA y metabotrópicos, predominando los dos últimos (Figura 2B y C), e igualmente coincidiendo con las células de EPR humano y de pollo descritos anteriormente.

7.3. El glutamato estimula la proliferación de las células del EPR a través de la activación de receptores específicos

Después de que se demostró la interacción del glutamato con sus receptores específicos, se exploró el efecto del glutamato sobre la proliferación de las células del EPR. Para descartar alguna contaminación de los resultados por los efectos de los componentes del suero, las células permanecieron sin suero 24 h antes del experimento. Se observó que la proliferación en células de EPR de rata, al ser cultivadas con diferentes concentraciones de glutamato, tienen una respuesta directamente proporcional: 0.25, 0.5 y 1.0 mM de glutamato incrementa la proliferación en 50% ($p < 0.05$), 61% ($p < 0.01$) y 97% ($p < 0.01$), respectivamente (Figura 3A). Se observó la misma tendencia al cultivarlas en presencia de los agonistas de glutamato: NMDA, AMPA y ACPD (Figura 3A). El incremento en la proliferación de las células del EPR estimulada por el glutamato se inhibe principalmente por los antagonistas de los receptores NMDA y de los de tipo AMPA/KA; así como de los metabotrópicos pero en menor proporción (Figura 3B). Estos hallazgos sugieren que aunque hay una mayor participación de los receptores de tipo NMDA sobre la proliferación de las células del EPR, los receptores de tipo metabotrópicos y AMPA/KA también tienen un efecto significativo.

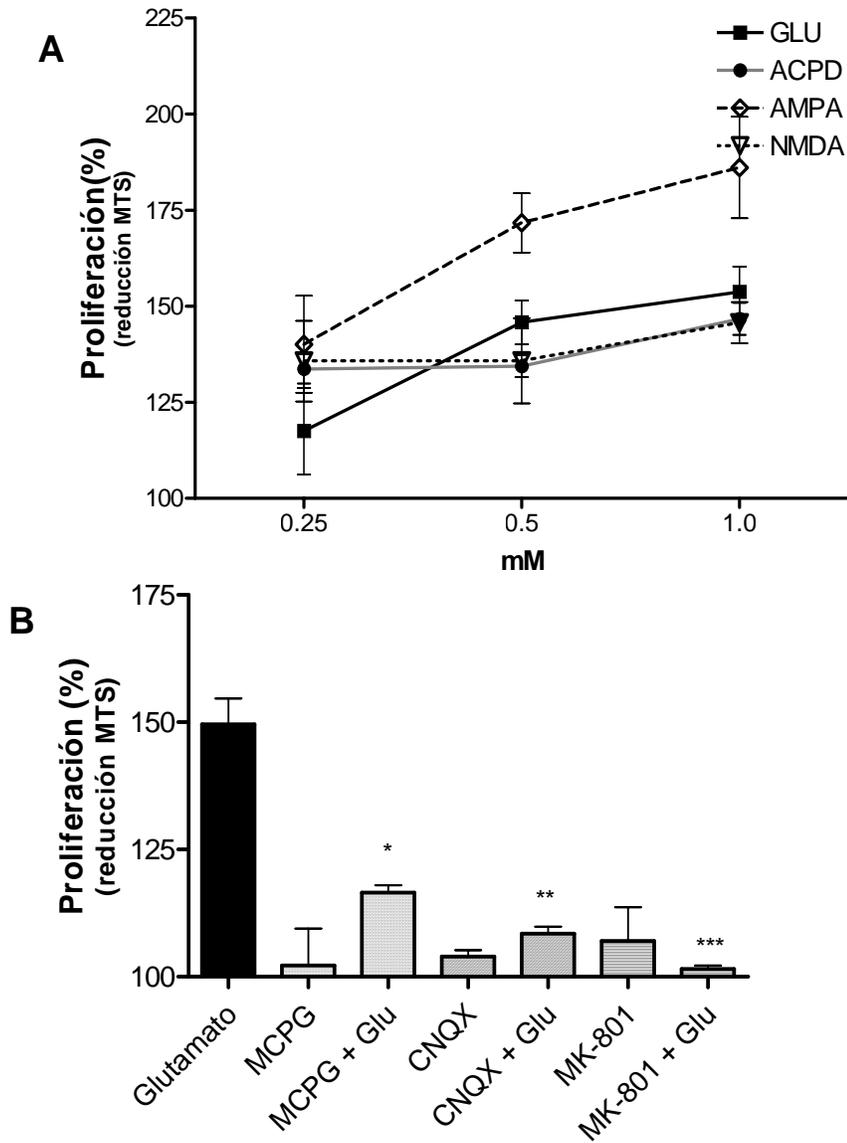


Figura 3. La estimulación de la proliferación de las células del EPR por glutamato está medida por los receptores ionotrópicos y metabotrópicos. **A.** La estimulación de la proliferación de las células del EPR por glutamato fue directamente proporcional a la dosis. Los tratamientos (glutamato o agonistas del receptor de glutamato; 0.25, 0.5 y 1.0 mM) se añadieron 72 h después de que las células estuvieran libres de suero por 24 h. **B.** Los antagonistas selectivos de los diferentes tipos receptores de glutamato inhiben la estimulación de la proliferación de las células del EPR por glutamato. Los resultados son el promedio±E.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

7.4. El glutamato activa la vía de MEK/ ERK 1/2 las células del EPR de rata

Dentro de la familia de las MAP cinasas, la activación de ERK 1/2 está típicamente asociada con la sobrevivencia celular, la proliferación y la diferenciación.^{101 119} Estudios en neuronas han mostrado que los tres subtipos de receptores ionotrópicos y los tres subgrupos de mGluRs estimulan la vía de las MAP cinasas. En este estudio se demostró que la máxima fosforilación (activación) de la cinasa Erk1/2 se lleva a cabo a los 10 min de estimulación con 1 mM de glutamato, manteniéndose constante hasta los 90 min de estimulación (Figura 4C y D). Se muestra que la activación de ERK 1/2 por glutamato es dosis dependiente (Figura 4A y B). Se observa que los diferentes agonistas de los receptores de glutamato contribuyen de igual manera en la activación de ERK 1/2 (Figura 4E y F). Aunque todos los antagonistas inhiben de manera significativa la activación de ERK estimulada por glutamato, la inhibición por MK-801 fue la más potente (Figura 4G y H), indicando que el glutamato activa ERK 1/2 principalmente a través de los receptores de NMDA. La vía de señalamiento intracelular Ras/Raf/MEK/ERK tiene una función esencial en la proliferación y en la muerte celular programada. La localización de ERK1/2 en la vía de señalamiento es determinante para la función de estas cinasas y al ser estimulada se transloca al núcleo, donde activa factores de transcripción que intervienen en la regulación de la expresión de proteínas del ciclo celular.^{120 121} Hecquet y cols.¹⁰⁹ demostraron que esta vía está involucrada en la regulación de la proliferación del EPR humano inducida por suero. Por lo tanto, los resultados sugieren que el glutamato activa la vía de las MAP cinasas/ERK, induciendo la proliferación de las células del EPR de rata en cultivo.

Varias cinasas directa o indirectamente fosforilan a ERK, y dado que es el único substrato conocido para la cinasa MEK, se evaluó si la activación de MEK es responsable de la fosforilación inducida por glutamato. El tratamiento de las células de EPR con 30 μ M del inhibidor de MEK, PD98059, por 12 horas previas a la estimulación con glutamato, inhibió la activación de ERK inducida por glutamato (Figura 5B). Por lo tanto los resultados sugieren que la estimulación tanto de los receptores metabotrópicos como ionotrópicos pueden inducir la proliferación celular al activar la vía de las MAP cinasas MEK/ERK 1/2.

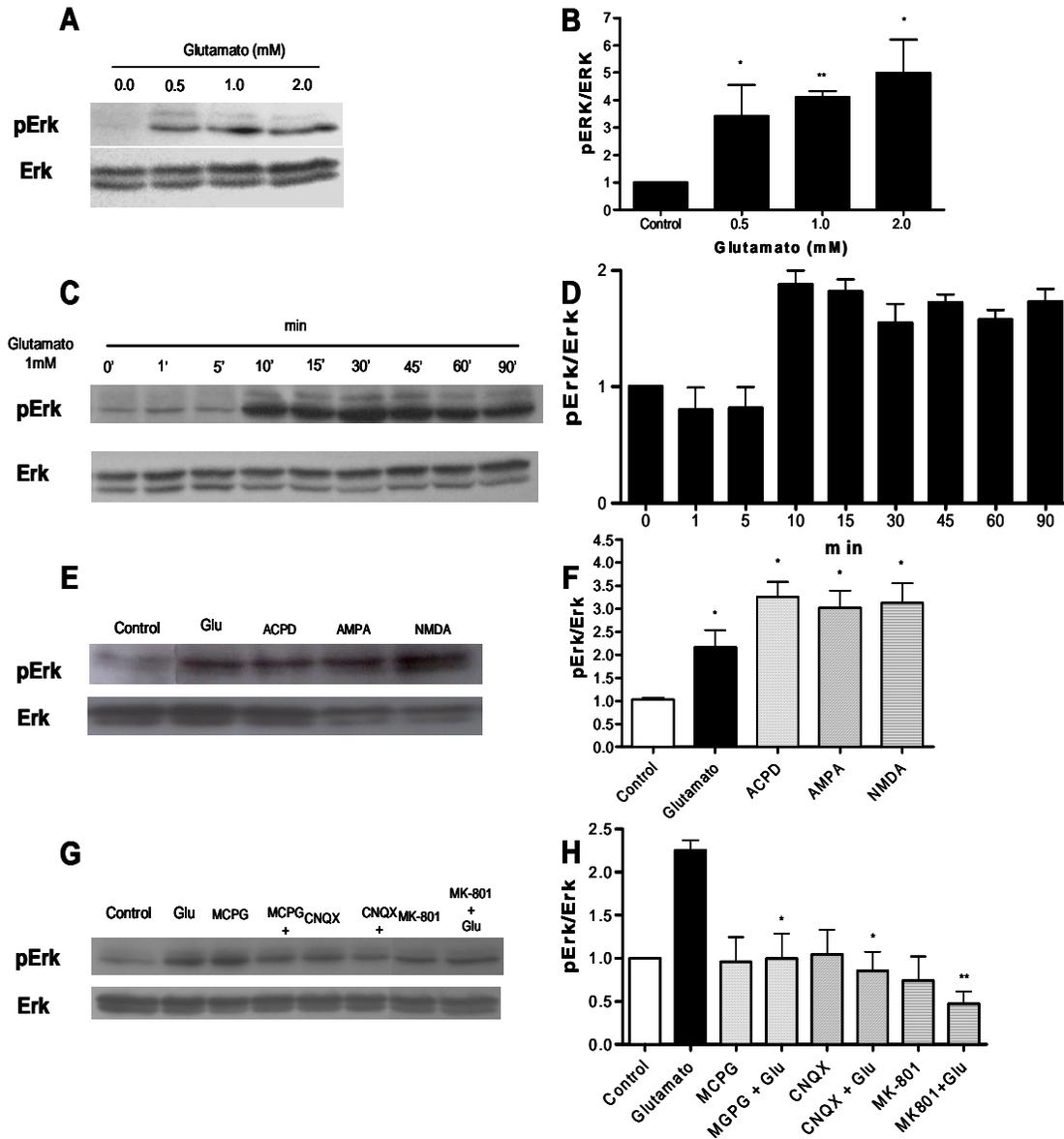


Figura 4. La activación de ERK1/2 por glutamato está inducida principalmente por la estimulación del receptor de tipo NMDA. A las células de cultivo primario de EPR se les retiró el suero 24 h antes del ensayo. **A.** Las células se trataron con 0.5, 1.0 y 2.0 mM de glutamato por 10 min. La fosforilación de ERK1/2 es dosis-dependiente. **B.** Representación gráfica de A. **C.** Las células se trataron con 1.0 mM de glutamato por diferentes tiempos. La activación máxima de ERK 1/2 fue a los 10 min y se sostuvo hasta los 90 min. **D.** Representación gráfica de C. **E.** Los agonistas de los receptores de glutamato tanto metabotrópicos como ionotrópicos, a una concentración de 1mM, activaron con la misma eficiencia a ERK1/2. **F.** Representación gráfica de D. **G.** La activación de ERK inducida por glutamato se evitó con los antagonistas selectivos de los diferentes subtipos de los receptores de glutamato, principalmente los de NMDA. **H.** Representación gráfica de G. Concentración de fármacos: 300µM MCPG y CNQX; 50µM MK 801; 1 mM glutamato. Las gráficas muestran el análisis densitométrico de los geles PAGE/SDS seguida de la inmunodetección por anti-ERK y anti-p-ERK. Los resultados son el promedio±E.E. de tres experimentos independientes. * p<0.05, ** p<0.01, *** p>0.001.

7.5. La activación de la vía de MEK-ERK1/2 media la proliferación celular estimulada por glutamato en las células del EPR de rata

Previamente se mostró que el glutamato activa la vía de señalamiento MEK/ERK, involucrada en el control de la proliferación. Por ello se analizó el efecto del inhibidor específico de MEK, PD98059, sobre el control de la proliferación celular. Como se muestra en la figura 5A, el PD98059 administrado 12 h antes de la estimulación, inhibió completamente la proliferación estimulada por el glutamato. Por lo tanto, es necesaria la activación de la vía MAPK/ERK1/2 para que el glutamato estimule la proliferación de las células del EPR.

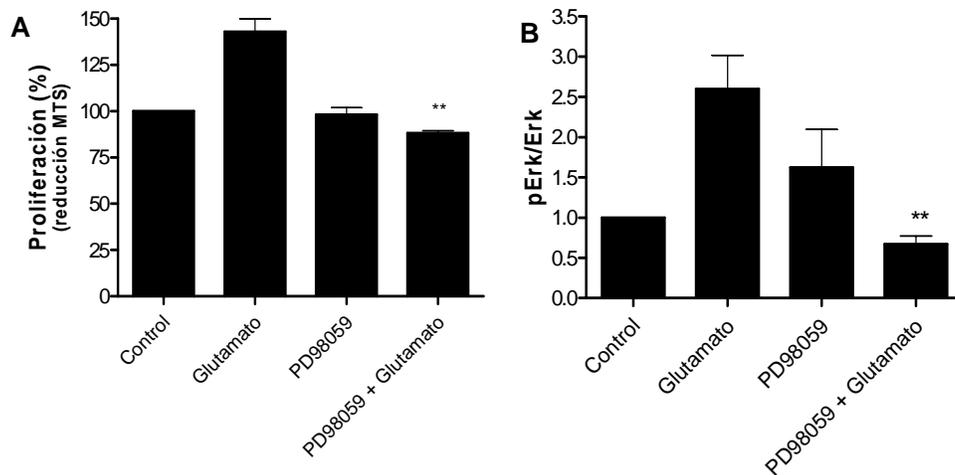


Figura 5. La activación por glutamato de la vía de las MAP cinasas estimula la proliferación de las células de EPR. **A.** La proliferación inducida por 1mM de glutamato se evitó al tratar las células con el inhibidor específico de MEK, PD98059. **B.** La fosforilación de ERK1/2 inducida por glutamato se evitó por el inhibidor de MEK, PD98059. Los resultados se expresaron como el promedio±E.E. del análisis densitométrico de tres experimentos independientes. Se utilizaron 30 μ M PD98059 y 1mM glutamato. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

7.6. La activación de la vía ERK1/2 promueve la desorganización de la α -sma en las células del EPR de rata

En paralelo con el aumento en la proliferación, las células del EPR muestran un cambio fenotípico llamado transición epitelio-mesénquima. Antes, se demostró que la activación de ERK por glutamato estimula la proliferación de las células del EPR. Ahora, se exploró el efecto del glutamato sobre la morfología de las células del EPR utilizando microscopia confocal para evaluar la expresión de las fibras de α -sma, una proteína marcadora de miofibroblastos^{122 123} y el cambio fenotípico de las células del EPR.¹²⁴ La inmunocitoquímica para α -sma mostró que el tratamiento con glutamato desorganizó las fibras de estrés de α -sma (Figura 6B) presentes en las células de cultivo primario sin tratamiento probablemente por el estrés que producen las condiciones “in vitro” en las células (Figura 6A). La cuantificación de la intensidad relativa de la fluorescencia mostró una disminución de 1062 ± 108.9 píxeles por célula ($n=29$) en las células control a 676.3 ± 40.44 píxeles por célula ($n=30$) en los cultivos tratados con glutamato (Figura 6E), además de una reducción significativa en la expresión de α -sma evaluada por análisis de Western blot (Figura 7). Los efectos inducidos por el glutamato sobre la organización y expresión de la proteína α -sma se previno al tratar las células del EPR, con $30 \mu\text{M}$ de PD98059, previamente a la estimulación con glutamato (Figura 6D). Por lo tanto, los resultados sugieren que la activación de la vía de MEK-ERK1/2 por el glutamato está involucrada en la desorganización de la α -sma que se requiere para la movilidad de las células del EPR.

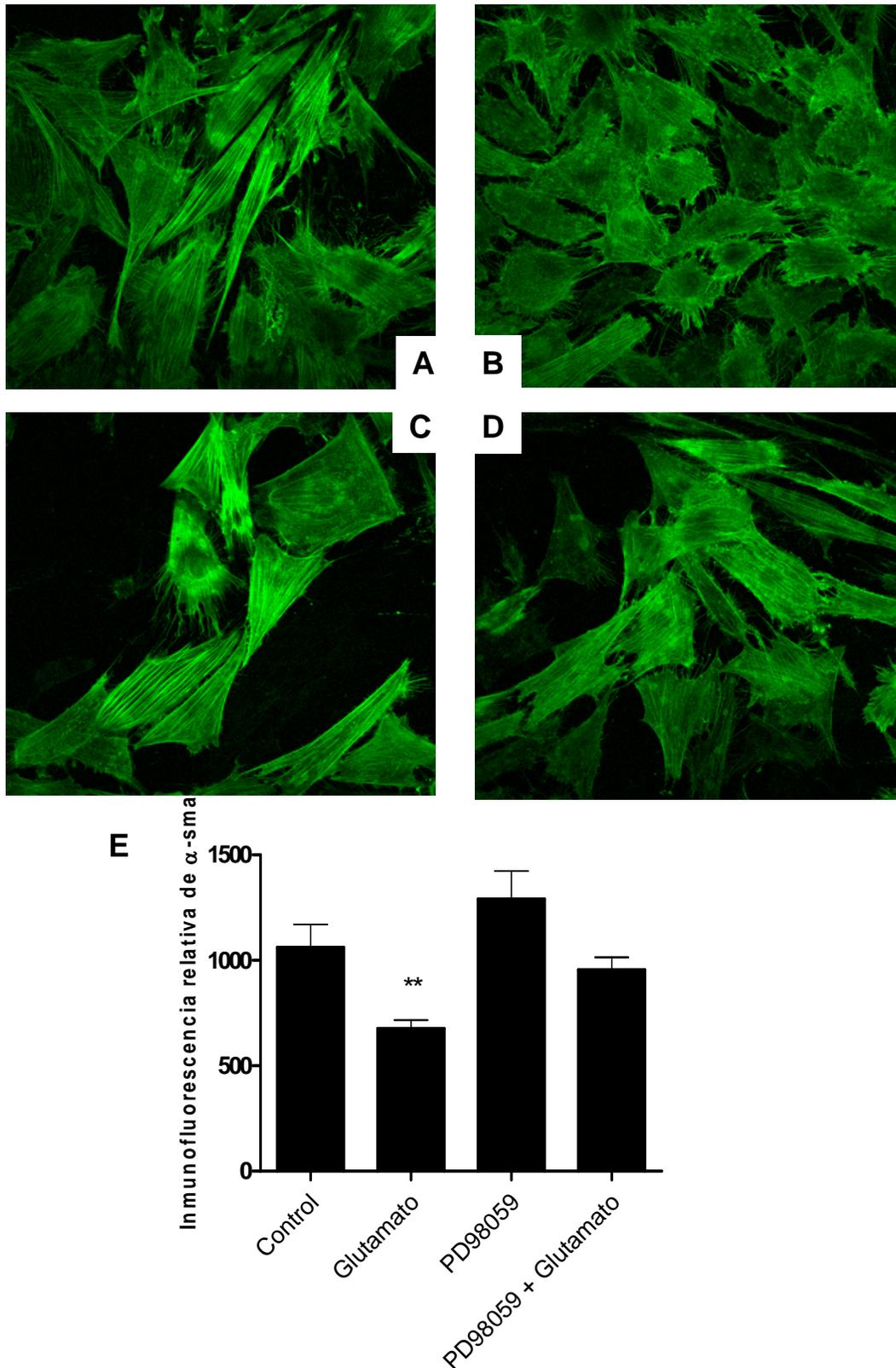


Figura 6. La activación de la vía MEK/ERK por glutamato desorganiza la actina en las células de EPR. Los tratamientos se agregaron después de 24 h que las células se mantuvieron en ausencia de suero. **A.** Se observan fibras de estrés en los cultivos sin tratar. **B.** La estimulación con 1 mM de glutamato por 48 h disminuye significativamente la presencia de fibras de estrés. **C.** 30 μM PD98059 no afectó significativamente las fibras de estrés, pero evitó la transformación morfológica inducida por glutamato (**D**). La cuantificación de la fluorescencia relativa de la proteína α-sma se muestra en la figura **E**. t de Student, ** p<0.01.

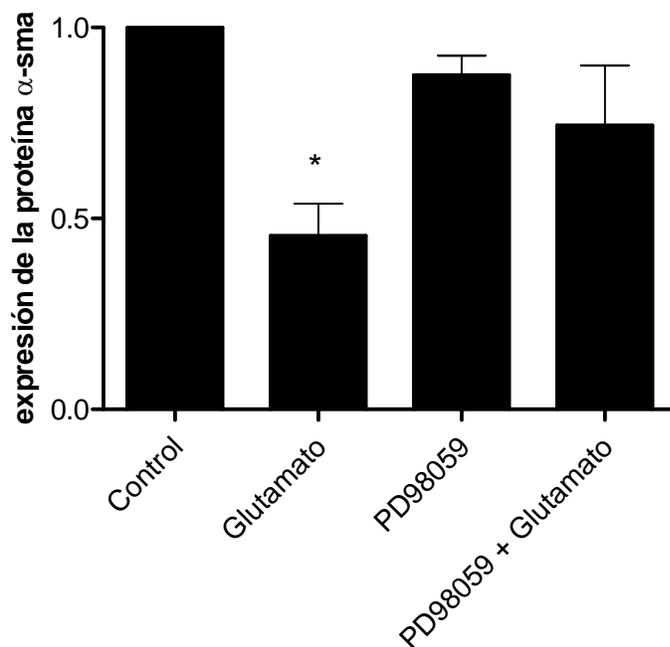


Figura 7. La activación de la vía MEK/ERK por glutamato disminuye la expresión de la proteína α -sma en las células de EPR. Las células de EPR se mantuvieron sin suero 24 h antes de tratarlas con 1mM glutamato por 10 min, 30 μ M del inhibidor de MEK PD98059 por 12 hrs, o con el inhibidor de MEK seguido del glutamato. La inmunodetección de la proteína se realizó con el anticuerpo anti- α -sma, y anti-F-actina como control. Los resultados están expresados como el promedio \pm E.E. de la razón α -sma/F-actina en tres experimentos independientes. t de Student, * $p < 0.05$.

8. Discusión

El tratamiento y la prevención de la VRP requieren que se determinen los mecanismos moleculares que están involucrados en su desarrollo. La VRP se debe considerar una enfermedad multifactorial causada por la interacción de varias células y estímulos. En respuesta al desprendimiento de retina o a la cirugía de retina,³⁰ las células del EPR presentan alteraciones morfológicas, en paralelo con la proliferación celular así como migración dentro del humor vítreo. Estos factores condicionan la formación de las membranas características en la VRP. Varios factores promueven esta transformación, además de que sus concentraciones en el humor vítreo están elevadas en pacientes con VRP, entre estos se encuentran el PDGF,⁴⁵ TGF- β ,¹⁵ bFGF,⁵⁵ IL-6,¹⁰¹ IL-1 β ¹⁵ y HGF.⁵⁷ Más recientemente, se han detectado concentraciones elevadas de glutamato en el humor vítreo de pacientes con desprendimiento de retina,¹⁰² así como en pacientes con retinopatía diabética proliferativa.¹²⁵ Cuando la retina sufre un daño, se liberan cantidades excesivas de glutamato debido probablemente a hipoxia, y se ha observado que este glutamato participa en la activación de las células del EPR durante el proceso de cicatrización. Sin embargo, el papel del glutamato a nivel molecular en el desarrollo de la VRP no se ha explorado.

El presente trabajo demuestra que las células del EPR en cultivo son un modelo adecuado para estudiar la participación del glutamato en la transformación celular característica de la VRP. Además, el trabajo confirma que la expresión de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de glutamato en estas células, exhiben las características bioquímicas que previamente se habían reportado para estos receptores en el cerebro así como en las células del EPR de pollo y humano. Conjuntamente se demostró que el cultivo en presencia de suero, genera que las células del EPR presenten transdiferenciación, aunque retienen su naturaleza epitelial.³⁶ ¹²⁶ las células se transforman a fibroblastos, pierden melanosomas e incrementan la proliferación celular,⁷⁴ principales alteraciones observadas en la VRP. Con este modelo, se exploró el efecto del glutamato sobre la proliferación y la transición epitelio-mesenquima en las células del EPR.

Los hallazgos de este trabajo confirman que el glutamato estimula la proliferación de las células del EPR, principalmente a través de los receptores de tipo NMDA, ya que el efecto se evitó totalmente al utilizar el MK-801, inhibidor específico del canal del receptor. Esto concuerda con resultados previos en donde el efecto del glutamato no se aisló de la participación que pudiera tener el suero,¹⁰⁸ ya que se demostró, aunque en menor proporción, que la activación de los receptores de AMPA y metabotrópicos indujeron la proliferación, indicando que el glutamato puede activar múltiples vías intracelulares que convergen en la activación de las células del EPR. En otros estudios se ha reportado el efecto trófico del glutamato tanto en neuronas en desarrollo como maduras. El glutamato interviene durante el desarrollo temprano del telencéfalo anterior al promover la proliferación de las neuronas progenitoras del estriado por un mecanismo dependiente de los receptores de NMDA,¹²⁷ así como en la neurogénesis de las células granulares de precursores neuronales preexistentes sensibles tanto a AMPA como a NMDA en tejido del hipocampo postnatal temprano.¹²⁸ Tanto los receptores inotrópicos como metabotrópicos de glutamato están implicados en la promoción de la sobrevivencia de las neuronas y de la protección de agresiones por parte del medio.^{129 130 131}

La vía de Ras/Raf/MEK/ERK es una de las principales cascadas de señalamiento que se activa a través de diferentes rutas por aminoácidos excitadores.¹³² Particularmente en las células del EPR, se ha demostrado que el suero induce proliferación al activar la vía Ras/Raf/MEK/ERK.¹⁰⁹ En este trabajo se proporciona evidencia en donde se liga la estimulación de glutamato a la activación de ERK1/2 y la proliferación. Varios estudios han establecido el papel de los receptores de NMDA en la regulación de la vía de MAP-quinasas, mediando el crecimiento celular así como la proliferación, la diferenciación y la supervivencia en varios tipos celulares.¹³³ En este trabajo se demostró que el tratamiento con glutamato incrementa significativamente la fosforilación de ERK1/2, principalmente a través de la activación de los receptores de NMDA y AMPA/KA. La proliferación y la activación de ERK1/2 disminuyó significativamente por la inhibición de los receptores de NMDA y AMPA/KA por el MK-801 y la CNQX respectivamente,

sugiriendo que ambos efectos están causalmente relacionados. Estos resultados fueron posteriormente confirmados por la inhibición de ambos efectos por el inhibidor específico de MEK, PD98059.

Aunque muchos factores se han asociado al efecto trófico del glutamato, el señalamiento mediado por Ca^{2+} es crítico. Si bien las concentraciones de Ca^{2+} se pueden elevar por varios mecanismos, este efecto se le puede atribuir a la actividad selectiva de los canales tipo – L y a los receptores de NMDA que activan el señalamiento de calmodulina (CaM).¹³⁴ El complejo Ca^{2+} -CaM media la activación del factor de intercambio Ras-GRF1 y la activación de la GTPasa-Ras SynGAP (Figura 8).¹³⁵ ¹³⁶ Krapivinsky y cols.¹³⁷ mostraron que en neuronas, utilizando un dominante negativo de RasGRF1, se inhibe la activación de ERK dependiente de NMDA. Esto sugiere que RasGRF1 es un intermediario crucial entre los receptores de NMDA y la activación de ERK. La interacción entre NR2B y RasGRF1, y la demostración de que al interrumpir esta interacción disminuye la activación de ERK dependiente de NMDA, sugieren que la subunidad NR2B vincula directamente a los receptores de NMDA con la activación de ERK. Dicha relación, el papel regulador de ERK en la proliferación de las células del EPR, y los hallazgos de este trabajo sugieren que la vía de Ras/Raf/MEK/ERK tiene un papel importante en el control de la proliferación de las células del EPR inducida por glutamato a través de los receptores de NMDA. Además, estudios realizados principalmente en neuronas han mostrado que la estimulación del receptor de NMDA lleva a varios efectos opuestos sobre la fosforilación de ERK, dependiendo de la población específica de receptores que se activan.¹³⁸ Mientras ERK se fosforila por la estimulación de los receptores sinápticos de NMDA, la fosforilación de ERK se inhibe por la estimulación de los receptores extrasinápticos.¹³⁹ Esta información sugiere que la actividad de ERK está regulada por los receptores de NMDA dependiendo de la entrada diferencial de calcio determinada por el tipo de subunidades que componen al receptor,¹⁴⁰ los receptores de NR1/NR2B muestran una alta permeabilidad al calcio en comparación con los receptores NR1/NR2A.¹⁴¹ ¹⁴² Aunque la composición de las subunidades de los receptores de NMDA en las células del EPR aún no está claro, se sabe que la estimulación con calcio activa la

PLC¹⁴³ y la PKC, además de la cinasa de calmodulina, todas estas conocidas como activadoras de ERK.¹³³

Se han estudiado en las células de la glia radial de pollo en cultivo, los efectos del glutamato y sus análogos estructurales, NMDA, KA y AMPA, sobre la activación de MAPK/ERK.¹⁴⁴ El glutamato, NMDA, AMPA y KA indujeron un incremento en la actividad de ERK 1/2 dosis- y tiempo dependiente. Además, la respuesta de AMPA y KA se bloqueó con CNQX y la respuesta a NMDA se bloqueó con CPP indicando que el incremento en la actividad de ERK1/2 esta mediada por los subtipos de receptores de glutamato de AMPA/KA y NMDA. Algunos autores han sugerido que los efectos de los agonistas de los receptores de tipo AMPA/KA es indirecto. Al respecto Vaccarino y cols.¹⁴⁵ estudiaron la inducción de factores de transcripción en cultivos de neuronas corticoestriadas en respuesta al glutamato, y concluyeron que el efecto de los receptores de tipo no-NMDA se debe a la liberación de Mg²⁺ dependiente de la despolarización que bloquea a los receptores de NMDA. En el trabajo de Bading y cols.¹⁴⁶ el glutamato o NMDA inducen la transcripción de genes tempranos de neuronas de hipocampo en cultivo, bloqueándose el efecto por el antagonista de los receptores de tipo NMDA, APV y, en menor proporción por los antagonista de los receptores de tipo AMPA/KA, CNQX y APV, sugiriendo un mecanismo indirecto. En este trabajo, también se demuestra que, además de la activación de los receptores de NMDA, los receptores de AMPA incrementaron la fosforilación de ERK. Como se discutió, este efecto puede deberse a la entrada de calcio a través de los receptores de AMPA permeables a Ca²⁺¹⁴⁷ y a la consiguiente activación de CAMKII y PI3K.¹⁴⁸ En este trabajo se encontró que la contribución de los receptores metabotrópicos fue limitada, apoyando que la activación de ERK por glutamato es un proceso dependiente de Ca²⁺ principalmente, mediada por receptores ionotrópicos, de manera concordante con estudios previos en neuronas.¹⁴⁹

La fosforilación de ERK1/2 puede activar varios factores de transcripción como Elk1, SAP-1, Mnk1/2, MAPKAP-K1/p90Rsk, que están asociados con la expresión de genes tempranos inmediatos que llevan a la proliferación.¹⁵⁰ Recientemente se

demonstró que la fosforilación de ERK y el aumento en la expresión de la ciclina D1, seguido del desprendimiento de retina, aumentan la proliferación de la glía de Müller,¹⁵¹ el segundo principal componente de las membranas epirretinales en la VRP.

Junto con la proliferación y la migración, la transformación morfológica de las células del EPR es una de las características de la VRP. La desdiferenciación y los eventos adaptativos son observados comúnmente en las células en cultivo y en varias enfermedades. Casaroli-Marano y cols.³⁶ indican que la transición epitelio-mesénquima de las células del EPR se da tanto *in vivo* como *in vitro* y se explica como una transición epitelio-mesénquima. Los epitelios en tejidos adultos o maduros pueden presentar transición epitelio-mesénquima debido a estrés producido por inflamación,^{113 152} o lesión,^{112 153} lo que resulta en la producción de fibroblastos y fibrogénesis. La vía de señalamiento de MEK1/2 – ERK1/2 es un determinante importante de la conversión fenotípica epitelio – mesénquima. Se encontró en este trabajo que la activación de ERK1/2 por glutamato, además de inducir un incremento en la proliferación, induce también la regulación reversible del marcador mesenquimal, la expresión de la proteína α -sma,^{122 123 147} y su ensamble en fibras, que se correlaciona con la pérdida de la unión célula – célula y permite la movilidad y la subsecuente migración de las células del EPR cuando están expuestas a altas concentraciones de glutamato. Las señales que controlan el cambio de la activación de ERK a diferentes funciones como proliferación y transformación, no se encuentran dilucidados. Nuestros hallazgos muestran que el glutamato modula este proceso actuando a través de los receptores de NMDA y es consistente con estudios en neuronas donde se muestra que el receptor de NMDA está acoplado a la vía de ERK por una interacción directa entre la subunidad NR2B y RasGRF1, un factor liberador de RAS-guanina-nucleótido dependiente de Ca^{2+} /calmodulina.¹³⁷ Además, se ha visto que la inhibición de los receptores de tipo NMDA suprime el crecimiento de las células tumorales al inhibir la vía de ERK,¹⁰⁷ lo que concuerda con los resultados mostrados en este trabajo.

La evidencia permite especular que la activación de ERK inducida por los receptores de NMDA y metabotrópicos en las células de EPR de rata puede converger en la activación de ERK a través de la vía de Ras/Raf/MEK/ERK debido a la elevación de las concentraciones intracelulares de calcio, diversificando la respuesta de ERK para controlar ya sea la proliferación o la dinámica del citoesqueleto (Figura 9). Muchos trabajos hay al respecto que apoyan esta información en neuronas.

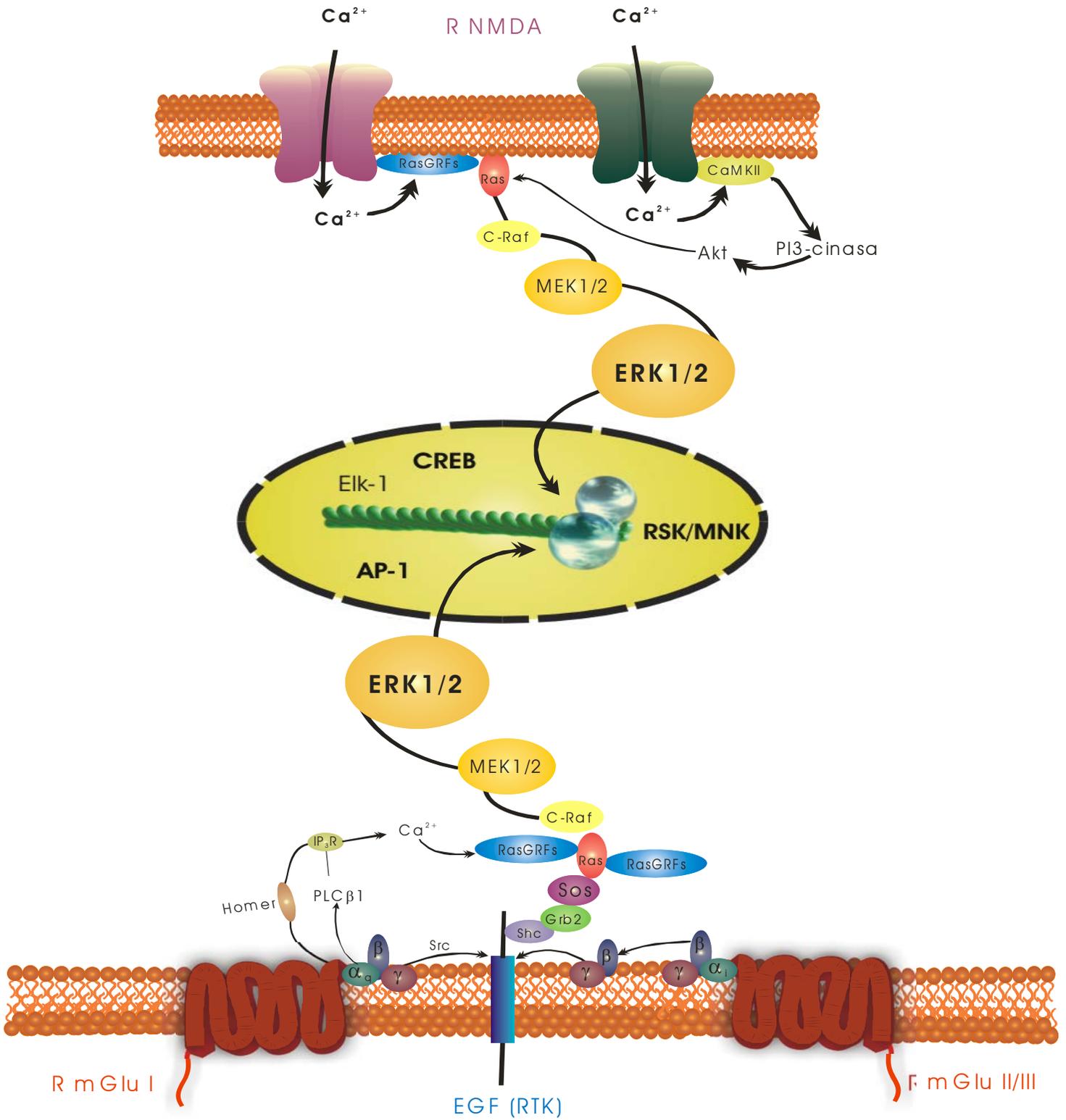


Figura 8. Activación de la vía ERK1/2 por los diferentes subtipos de receptores de glutamato.

En distintos tipos celulares, la activación de Ras se ha relacionado con la desorganización de la actina a través de la activación de la vía Ras/Raf/MEK/ERK.^{154 155} Estudios previos en células transfectadas con el oncogén Ras han establecido un entrecruzamiento entre la vía de Ras/Raf/MEK/ERK con la vía de Rho/ROCK1-Rho cinasa, la cual juega un papel importante en el control de la actina así como en la migración e invasión durante la tumorigénesis.^{154 156} Varios hallazgos han demostrado que la activación sostenida de ERK por la transformación del oncogén Ras, regula ROCK1 y Rho cinasa, dos efectores de Rho que se requieren para la formación de fibras de estrés de actina. La subfamilia de GTPasas de Rho: Rho, Rac y Cdc42 controlan la reorganización de la actina.¹⁵⁷ Rho regula el ensamble de las fibras de actina y de las uniones focales a través de la activación de mDia y de las cinasas ROCK1/Rho-cinasa.¹⁵⁸^{159 160} Rho-cinasa a su vez activa LIM-cinasa, que subsecuentemente fosforila a la cofilina inhibiendo su actividad despolimerizadora lo que contribuye a la estabilización de la actina.^{161 162 163 164} Aunque la activación de Rho promueve el desarrollo de fibras de estres y de uniones focales, la vía de Ras inhibe la actividad de Rho. Esto se explica por la inhibición de ROCK1 y Rho-cinasa por ERK1/2 que resulta en la disminución de la fosforilación de la cofilina, demostrando que la inhibición de la vía Rho-cinasa/LIM-cinasa/cofilina interviene en la organización de las fibras de actina. Por lo tanto nuestros resultados sugieren que la activación de ERK por la estimulación del glutamato de Ras/Raf/MEK puede estar involucrada en la desorganización de las fibras de α -sma y en la disminución de la expresión de α -sma, como resultado de inhibición de la vía dependiente de las cinasas ROCK1/Rho (Figura 9).¹⁵⁶

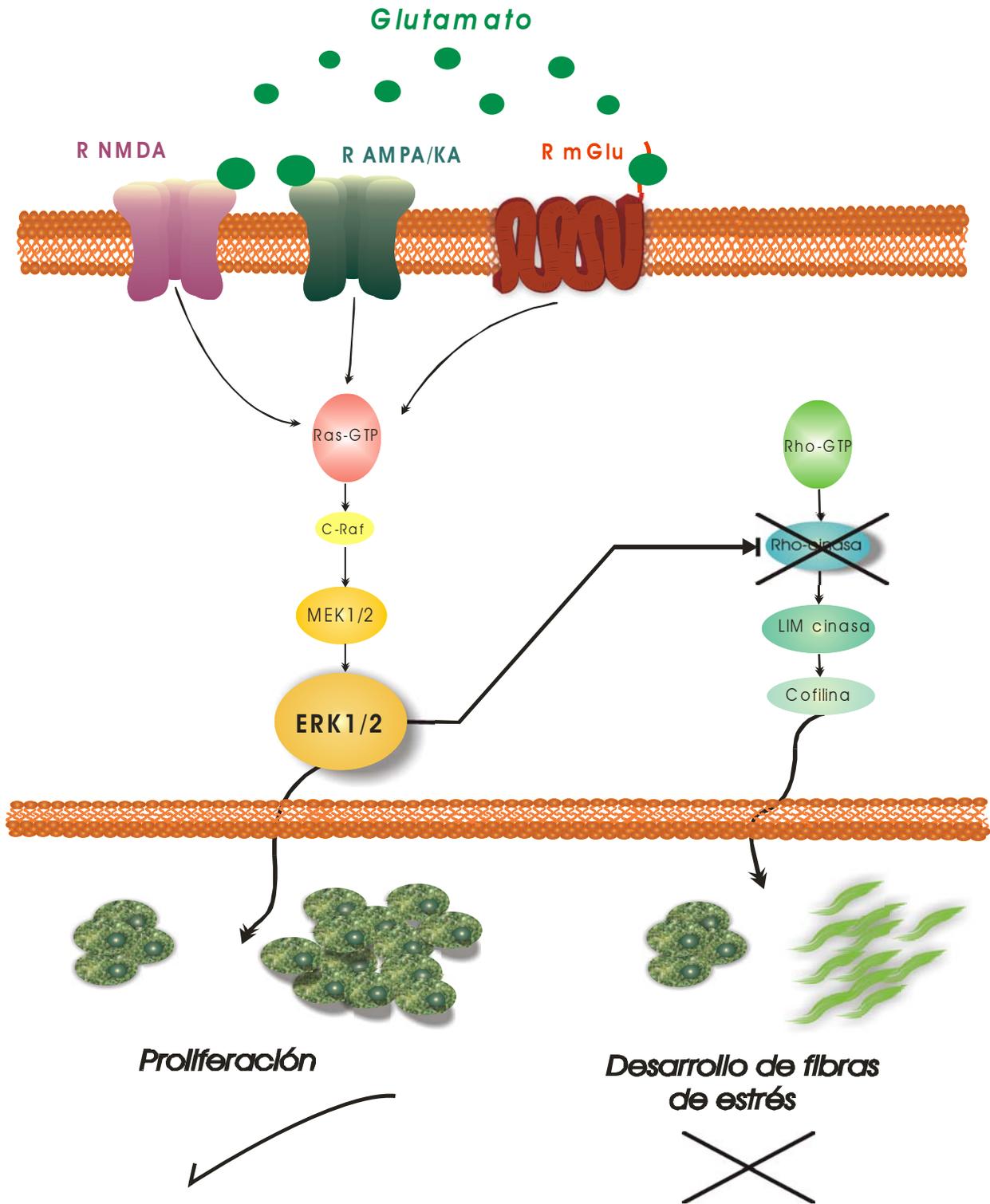


Figura 9. Efecto del glutamato sobre la proliferación y la transición epitelio-mesénquima en las células de EPR de rata en cultivo.

Aunque muchos factores pueden contribuir a la inducción de la VRP, este trabajo apoya la participación del glutamato en la patogénesis de la VRP, a través de un mecanismo similar a la transformación oncogénica por Ras, que favorece un aumento en la proliferación y la pérdida de fibras de actina, que contribuye a aumentar la movilidad de las células transformadas y que puede estar involucrado en la fisiopatogenia de la VRP. Por último son importantes estudios futuros sobre las interacciones entre los diferentes factores que intervienen en la proliferación, dediferenciación, y migración de estas células.

9. Conclusiones

- 1) Se desarrolló un modelo experimental que permite el estudio *in vitro* de la VRP.
- 2) Los receptores de glutamato se caracterizaron por primera vez en las células de EPR de rata. Las células de EPR de rata expresan receptores de glutamato tanto metabotrópicos como ionotrópicos, predominando los de tipo NMDA.
- 3) El glutamato estimuló la proliferación de las células de EPR, efecto llevado a cabo principalmente a través de los receptores de tipo NMDA.
- 4) El glutamato indujo la activación sostenida y dosis-dependiente de ERK1/2. Este efecto también llevado a cabo principalmente a través de los receptores de tipo NMDA.
- 5) El glutamato disminuyó la expresión de la expresión de la proteína α -sma así como de su organización.
- 6) Tanto la proliferación como la activación de ERK así como la disminución de la expresión y la desorganización de las fibras de α -sma se previno por la inhibición de MEK.

10. Bibliografía

- ¹ Pastor JC. Proliferative vitreoretinopathy: an overview. *Surv Ophthalmol.* 1998;43:3-18.
- ² Sebag J. Shaken not stirred. *Ophthalmology.* 2001;108:1177-8.
- ³ Ng G K, Graue W F. Tratamiento médico de la vitreoretinopatía proliferativa con colchicina oral. *Rev Mex Oftalmol.* 2004; 78: 13-6.
- ⁴ Raymond MC, Thompson JT. RPE-mediated collagen gel contraction. Inhibition by colchicine and stimulation by TGF-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990; 31:1079-86.
- ⁵ Weller M, Wiedemann P, Heimann K. Proliferative vitreoretinopathy--is it anything more than wound healing at the wrong place? *Int Ophthalmol.* 1990;14:105-17.
- ⁶ Machemer R, Aaberg TM, Freeman HM, Irvine AR, Lean JS, Michels RM. An updated classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol.* 1991;112:159-65.
- ⁷ Pastor JC, de la Rúa ER, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Retin Eye Res.* 2002; 21:127-44.
- ⁸ Nagasaki H, Shinagawa K, Mochizuki M. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Prog Retin Eye Res.* 1998; 17:77-98.
- ⁹ Girard P, Mimoun G, Karpouzas I, Montefiore G. Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery. *Retina.* 1994;14:417-24.
- ¹⁰ Bonnet M. The development of severe proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery. Grade B: a determining risk factor. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1988;226:201-5
- ¹¹ Cowley M, Conway BP, Campochiaro PA, Kaiser D, Gaskin H. Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1989; 107:1147-51.
- ¹² Grizzard WS, Hilton GF, Hammer ME, Taren D. A multivariate analysis of anatomic success of retinal detachments treated with scleral buckling. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1994; 232:1-7.
- ¹³ Ahmadiéh H, Entezari M, Soheilian M, Azarmina M, Dehghan MH, Mashayekhi A, Sajjadi H. Factors influencing anatomic and visual results in primary scleral buckling. *Eur J Ophthalmol.* 2000; 10:153-9.
- ¹⁴ Lleo Perez A, Campos Fernandez R, Lopez Santovena F, Sanchez Lorente G, Hernandez Martinez FJ, Navarro Palop C. Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2000; 75:741-750.
- ¹⁵ Kon CH, Occleston NL, Aylward GW, Khaw PT. Expression of vitreous cytokines in proliferative vitreoretinopathy: a prospective study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40:705-12.
- ¹⁶ Rodríguez de la Rúa Franch, E., Aragón Roca, J., Pastor Jimeno, J.C., Carrasco Herrero, B., González Rodríguez, J.C., Álvarez Requejo, A., Martín de Diego, I., Giraldo Arguello, A. Posibilidad de predecir el riesgo de una vitreoretinopatía proliferante mediante el análisis de factores clínicos de los desprendimientos de retina regmatogénicos. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 2000; 75, 807-12.

- ¹⁷ Girard P, Karpouzas I. Pseudophakic retinal detachment: anatomic and visual results. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1995;233:324-30.
- ¹⁸ Yanyali A, Bonnet M. Risk factors of postoperative proliferative vitreoretinopathy in giant tears. *J Fr Ophtalmol.* 1996;19:175-80.
- ¹⁹ Dumas C, Bonnet M. Choroidal detachment associated with rhegmatogenous retinal detachment: a risk factor for postoperative PVR. *J Fr Ophtalmol.* 1996;19:455-63.
- ²⁰ Duquesne N, Bonnet M, Adeleine P. Preoperative vitreous hemorrhage associated with rhegmatogenous retinal detachment: a risk factor for postoperative proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1996; 234:677-82.
- ²¹ Bonnet M, Fleury J, Guenoun S, Yanyali A, Dumas C, Hajjar C. Cryopexy in primary rhegmatogenous retinal detachment: a risk factor for postoperative proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1996; 234:739-43.
- ²² Capeans C, Lorenzo J, Santos L, Suarez A, Copena MJ, Blanco MJ, vSanchez-Salorio M. Comparative study of incomplete posterior vitreous detachment as a risk factor for proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1998; 236:481-5.
- ²³ Limb GA, Chignell AH. Vitreous levels of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) as a risk indicator of proliferative vitreoretinopathy. *Br J Ophthalmol.* 1999; 83:953-6.
- ²⁴ Yang CM, Olsen KR, Hernandez E, Cousins SW. Measurement of cellular proliferation within the vitreous during experimental proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1992; 230:66-71.
- ²⁵ Cousins SW, Rubsamen PE. Comparison of flow cytometry with the surgeon regarding ability to predict the ultimate success of surgery for proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1994;112:1554-60.
- ²⁶ Goldaracena, B., Pastor, J.C., Saornil, M.A., Garcia Layana, A., De la Fuente, F. Creación de un modelo eficaz de VRP. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 1994; 67, 127-34.
- ²⁷ Jerdan JA, Pepose JS, Michels RG, Hayashi H, de Bustros S, Sebag M, et al. Proliferative vitreoretinopathy membranes. An immunohistochemical study. *Ophthalmol* 1989;96:801-10.
- ²⁸ Morino I, Hiscott P, McKechnie N, Grierson I. Variation in epiretinal membrane components with clinical duration of the proliferative tissue. *Br J Ophthalmol* 1990;74:393-9.
- ²⁹ Charteris DG, Hiscott P, Robey HL, Gregor ZJ, Lightman SL, Grierson I. Inflammatory cells in proliferative vitreoretinopathy subretinal membranes. *Ophthalmol* 1993;100:43-6.
- ³⁰ Campochiaro PA. Pathogenic mechanisms in proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 1997;115:237-41.
- ³¹ Vinos SA, Campochiaro PA, Conway BP. Ultrastructural and electron-immunocytochemical characterization of cells in epiretinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31:14-28.
- ³² Yanoff: *Ophthalmology*, 2nd ed. 2004 Mosby, Inc.

- ³³ Anderson DH, Stern WH, Fisher SK, Erickson PA, Borgula GA. Retinal detachment in the cat: the pigment epithelial-photoreceptor interface. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983; 24:906-26.
- ³⁴ Baudouin C, Hofman P, Brignole F, Bayle J, Loubiere R, Gastaud P. Immunocytology of cellular components in vitreous and subretinal fluid from patients with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmologica.* 1991;203:38-46.
- ³⁵ Charteris DG. Proliferative vitreoretinopathy: pathobiology, surgical management, and adjunctive treatment. *Br J Ophthalmol.* 1995; 79:953-60.
- ³⁶ Casaroli-Marano RP, Pagan R, Vilaro S. Epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy: intermediate filament protein expression in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40:2062-72.
- ³⁷ Lee SC, Kwon OW, Seong GJ, Kim SH, Ahn JE, Kay ED. Epitheliomesenchymal transdifferentiation of cultured RPE cells. *Ophthalmic Res.* 2001; 33:80-6.
- ³⁸ Stocks SZ, Taylor SM, Shiels IA. Transforming growth factor-beta1 induces alpha-smooth muscle actin expression and fibronectin synthesis in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2001; 29:33-7.
- ³⁹ Glaser BM, Cardin A, Biscoe B. Proliferative vitreoretinopathy. The mechanism of development of vitreoretinal traction. *Ophthalmology.* 1987; 94:327-32.
- ⁴⁰ Wu WC, Kao YH, Hu DN. Relationship between outcome of proliferative vitreoretinopathy and results of tissue culture of excised preretinal membranes. *Kaohsiung J Med Sci.* 2000; 16:614-9.
- ⁴¹ Wiedemann P. Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. *Surv Ophthalmol.* 1992; 36:373-84.
- ⁴² Campochiaro PA, Hackett SF, Vinore SA, et al. Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Sci* 1994;107:2459-69.
- ⁴³ Liang Y, Li X, Fan J, Zhao M, Jiang Y. The effect of platelet-derived growth factor on the formation of proliferative vitreoretinopathy. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 2002;38:144-7.
- ⁴⁴ Mori K, Gehlbach P, Ando A, Dyer G, Lipinsky E, Chaudhry AG, Hackett SF, Campochiaro PA. Retina-specific expression of PDGF-B versus PDGF-A: vascular versus nonvascular proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2001-6.
- ⁴⁵ Cassidy L, Barry P, Shaw C, Duffy J, Kennedy S. Platelet derived growth factor and fibroblast growth factor basic levels in the vitreous of patients with vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol* 1998;82:181-5.
- ⁴⁶ Andrews A, Balciunaite E, Leong FL, Tallquist M, Soriano P, Refojo M, et al. Platelet-derived growth factor plays a key role in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2683-9.
- ⁴⁷ Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999; 341:738-46.
- ⁴⁸ Tanihara H, Yoshida M, Matsumoto M, Yoshimura N. Identification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34:413-9.

- ⁴⁹ Pfeffer BA, Flanders KC, Guerin CJ, Danielpour D, Anderson DH. Transforming growth factor beta 2 is the predominant isoform in the neural retina, retinal pigment epithelium-choroid and vitreous of the monkey eye. *Exp Eye Res.* 1994; 59:323-33.
- ⁵⁰ Osusky R, Soriano D, Ye J, Ryan SJ. Cytokine effect on fibronectin release by retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res.* 1994; 13:569-74.
- ⁵¹ Choudhury P, Chen W, Hunt RC. Production of platelet-derived growth factor by interleukin-1 beta and transforming growth factor-beta-stimulated retinal pigment epithelial cells leads to contraction of collagen gels. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38:824-33.
- ⁵² Ikuno Y, Kazlauskas A. TGFbeta1-dependent contraction of fibroblasts is mediated by the PDGF alpha receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:41-6.
- ⁵³ Carrington L, McLeod D, Boulton M. IL-10 and antibodies to TGF-beta2 and PDGF inhibit RPE-mediated retinal contraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1210-6.
- ⁵⁴ Connor TBJ, Roberts AB, Sport MB, Danielpour D, Dart LL, Michels RG. Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 in levels in the eye. *J Clin Invest.* 1989;83: 1661-1666.
- ⁵⁵ Hueber A, Wiedemann P, Esser P, Heimann K. Basic fibroblast growth factor mRNA, bFGF peptide and FGF receptor in epiretinal membranes of intraocular proliferative disorders (PVR and PDR). *Int Ophthalmol.* 1996-1997; 20:345-50.
- ⁵⁶ El-Ghrably IA, Dua HS, Orr GM, Fischer D, Tighe PJ. Detection of cytokine mRNA production in infiltrating cells in proliferative vitreoretinopathy using reverse transcription polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol.* 1999; 83:1296-9.
- ⁵⁷ Mitamura Y, Takeuchi S, Matsuda A, Tagawa Y, Mizue Y, Nishihira J. Hepatocyte growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol.* 2000; 129:678-80.
- ⁵⁸ Abu El-Asrar AM, Struyf S, Kangave D, Geboes K, Van Damme J. Chemokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17:155-65.
- ⁵⁹ Bok D. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl.* 1993;17:189-95
- ⁶⁰ Rizzolo LJ. Polarity and the development of the outer blood-retinal barrier. *Histol Histopathol.* 1997;12:1057-67.
- ⁶¹ Hamann S. Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int Rev Cytol.* 2002;215:395-431.
- ⁶² Baehr W, Wu SM, Bird AC, Palczewski K. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res.* 2003;43:2957-8.
- ⁶³ Dornonville de la Cour M. Ion transport in the retinal pigment epithelium. A study with double barreled ion-selective microelectrodes. *Acta Ophthalmol Suppl.* 1993;209:1-32.
- ⁶⁴ Tanihara H, Inatani M, Honda Y. Growth factors and their receptors in the retina and pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res.* 1997; 16:271-301.
- ⁶⁵ Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005;85:845-81.
- ⁶⁶ Ishida K, Panjwani N, Cao Z, Streilein JW. Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina

suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul Immunol Inflamm.* 2003;11:91-105.

⁶⁷ Lopez-Colome A M. Aminoacids as excitatory transmitters in the retina. En: *Excitatory amino acids*. Roberts P J, Storm-Mathisen J y Bradford H F. Macmillan Press. London. Pp.143-57.

⁶⁸ Michaelis EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol.* 1998;54:369-415.

⁶⁹ Ozawa S, Iino M, Tsuzuki K. Two types of kainate response in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 1991;66:2-11.

⁷⁰ Gilbertson TA, Scobey R, Wilson M. Permeation of calcium ions through non-NMDA glutamate channels in retinal bipolar cells. *Science.* 1991;251:1613-5.

⁷¹ Burnashev N, Khodorova A, Jonas P, Helm PJ, Wisden W, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B. Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells. *Science.* 1992;256:1566-70.

⁷² Pourcho R. Neurotransmitters in the retina. *Curr Eye Res* 1996; 15: 797-803.

⁷³ Fragoso G, Lopez-Colome AM. Excitatory amino acid-induced inositol triphosphate formation in cultured retinal pigment epithelium. *Vis Neurosci.* 1999;16:263-9.

⁷⁴ Lopez-Colome AM, Fragoso G, Wright CE, Sturman JA. Excitatory amino acid receptors in membranes from cultured human retinal pigment epithelium. *Curr Eye Res.* 1994;13:553-60.

⁷⁵ Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1993;268:14553-6.

⁷⁶ Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995;270:1326-31

⁷⁷ Boulton MI, King DI, Donson J, Davies JW. Point substitution in a promoter-like region and the V1 gene affect the host range and symptoms of maize streak virus. *Virology.* 1991;183:114-21.

⁷⁸ Peyssonnaud C, Provot S, Felder-Schmittbuhl MP, Calothy G, Eychene A. Induction of postmitotic neuroretina cell proliferation by distinct Ras downstream signaling pathways. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7068-79

⁷⁹ Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 1998; 273:24052-6.

⁸⁰ McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin RA, D'Assoro AB, Salisbury JL, Mazarino MC, Stivala F, Libra M. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul.* 2006;46:249-79.

⁸¹ Luo Z, Tzivion G, Belshaw PJ, Vavvas D, Marshall M, Avruch J. Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature.* 1996; 383:181-5.

⁸² Fabian JR, Daar IO, Morrison DK. Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol.* 1993; 13:7170-9.

⁸³ Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C, Fee F, Katsanakis KD, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM, Kolch W. Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature.* 1999;401:173-7.

- ⁸⁴ Dhillon AS, Meikle S, Yazici Z, Eulitz M, Kolch W. Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J.* 2002;21:64-71.
- ⁸⁵ Blalock WL, Weinstein-Oppenheimer C, Chang F, Hoyle PE, Wang XY, Algate PA, Franklin RA, Oberhaus SM, Steelman LS, McCubrey JA. Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia.* 1999;13:1109-66.
- ⁸⁶ Lee JT Jr, McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia.* 2002;16:486-507.
- ⁸⁷ Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia.* 2003;17:1263-93.
- ⁸⁸ Fantl WJ, Muslin AJ, Kikuchi A, Martin JA, MacNicol AM, Gross RW, Williams LT. Activation of Raf-1 by 14-3-3 proteins. *Nature.* 1994;371:612-4.
- ⁸⁹ Blagosklonny MV. Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs. *Leukemia.* 2002;16:455-62.
- ⁹⁰ Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia.* 2004;18:189-218.
- ⁹¹ Steelman LS, Bertrand FE, McCubrey JA. The complexity of PTEN: mutation, marker and potential target for therapeutic intervention. *Expert Opin Ther Targets.* 2004;8:537-50.
- ⁹² Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 1997;272:4378-83.
- ⁹³ Mason CS, Springer CJ, Cooper RG, Superti-Furga G, Marshall CJ, Marais R. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *EMBO J.* 1999;18:2137-48.
- ⁹⁴ Diaz B, Barnard D, Filson A, MacDonald S, King A, Marshall M. Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for Ras-dependent activation and biological signaling. *Mol Cell Biol.* 1997;17:4509-16.
- ⁹⁵ Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature.* 1993;364:249-52.
- ⁹⁶ Barnard D, Diaz B, Clawson D, Marshall M. Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms. *Oncogene.* 1998;17:1539-47.
- ⁹⁷ Corbit KC, Trakul N, Eves EM, Diaz B, Marshall M, Rosner MR. Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem.* 2003;278:13061-8.
- ⁹⁸ Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.* 1994;13:1610-9.

- ⁹⁹ Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol.* 2002;64:755-63.
- ¹⁰⁰ Malumbres M, Perez De Castro I, Hernandez MI, Jimenez M, Corral T, Pellicer A. Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). *Mol Cell Biol.* 2000;20:2915-25.
- ¹⁰¹ Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:463-89
- ¹⁰² Diederer RM, La Heij EC, Deutz NE, Kijlstra A, Kessels AG, van Eijk HM, Liem AT, Dieudonne S, Hendrikse F. Increased glutamate levels in the vitreous of patients with retinal detachment. *Exp Eye Res.* 2006;83:45-50.
- ¹⁰³ Neal M, Cunningham J. Modulation by endogenous ATP of the light-evoked release of ACh from retinal cholinergic neurones. *Br J Pharmacol.* 1994;113:1085-7
- ¹⁰⁴ Rego AC, Santos MS, Oliveira CR. Oxidative stress, hypoxia, and ischemia-like conditions increase the release of endogenous amino acids by distinct mechanisms in cultured retinal cells. *J Neurochem.* 1996;66:2506-16.
- ¹⁰⁵ Toti P, Morocutti A, Sforzi C, De Santi MM, Catella AM, Baiocchi S. The subretinal fluid in retinal detachment. A cytologic study. *Doc Ophthalmol.* 1991;77:39-46.
- ¹⁰⁶ Okisaka S, Liu GJ, Mizukawa A. Comparative histopathological study of free-running mode and continuous wave Nd:YAG laser photocoagulation of monkey retina and choroid. *Jpn J Ophthalmol.* 1991;35:233-58.
- ¹⁰⁷ Stepulak A, Sifringer M, Rzeski W, Endesfelder S, Gratopp A, Pohl EE, Bittigau P, Felderhoff-Mueser U, Kaindl AM, Buhner C, Hansen HH, Stryjecka-Zimmer M, Turski L, Ikonomidou C. NMDA antagonist inhibits the extracellular signal-regulated kinase pathway and suppresses cancer growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:15605-10.
- ¹⁰⁸ Uchida N, Kiuchi Y, Miyamoto K, Uchida J, Tobe T, Tomita M, Shioda S, Nakai Y, Koide R, Oguchi K. Glutamate-stimulated proliferation of rat retinal pigment epithelial cells. *Eur J Pharmacol.* 1998;343:265-73.
- ¹⁰⁹ Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, Engelmann K, Mascarelli F. Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelial cells: ERK and RPE cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43:3091-8.
- ¹¹⁰ Liou GI, Matragoon S, Samuel S, Behzadian MA, Tsai NT, Gu X, Roon P, Hunt DM, Hunt RC, Caldwell RB, Marcus DM. MAP kinase and beta-catenin signaling in HGF induced RPE migration. *Mol Vis.* 2002; 8:483-93.
- ¹¹¹ Schinkmann KA, Kim TA, Avraham S. Glutamate-stimulated activation of DNA synthesis via mitogen-activated protein kinase in primary astrocytes: involvement of protein kinase C and related adhesion focal tyrosine kinase. *J Neurochem.* 2000; 74:1931-40
- ¹¹² Hay, E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformations. *Acta Anat.* 1995; 154:8–20. 18.
- ¹¹³ Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 2002;110:341-50.

- ¹¹⁴ Kiemer, A.K., Takeuchi, K., and Quinlan, M.P. Identification of genes involved in epithelial-mesenchymal transition and tumor progression. *Oncogene*. 2001; 20:6679–88.
- ¹¹⁵ Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochem*. 1976; 72: 248-54.
- ¹¹⁶ Fricke V. A new scintillation cocktail based on Triton-X-100. *Anal Biochem*. 1975; 63: 555-8.
- ¹¹⁷ Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: 680-5.
- ¹¹⁸ Wolf G. Function of the protein RPE65 in the visual cycle. *Nutr Rev*. 2005;63:97-100.
- ¹¹⁹ Boulton, T., Nye, S., Robbins, D., Ip, N., Radziejewska, E., Morgenvesser, S., Depinho, R., Panayotatos, N., Cobb, M., and Yancopoulos, G. *Cell*. 1991; 65:663–75.
- ¹²⁰ Kyriakis, J. M. y Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev*. 2001; 81: 807–69.
- ¹²¹ Chen, R.H., Sarnecki, C. y Blenis, J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol*. 1992; 12: 915–27.
- ¹²² Tang, W.W., et al. 1996. Platelet-derived growth factor-BB induces renal tubulointerstitial myofibroblast formation and tubulointerstitial fibrosis. *Am. J. Pathol*. 1996;148:1169–80.
- ¹²³ Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int*. 1998;54:864-76.
- ¹²⁴ Grisanti S, Guidry C. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:391-405.
- ¹²⁵ Ambati J, Chalam KV, Chawla DK, D'Angio CT, Guillet EG, Rose SJ, Vanderlinde RE, Ambati BK. Elevated gamma-aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1997;115:1161-6.
- ¹²⁶ Bochaton-Piallat ML, Kapetanios A, Donati G, Redard M, Gabián G, Pournaras C. TGF-b1, TGFb receptor II and DE-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41: 2336-42.
- ¹²⁷ Luk KC, Kennedy TE, Sadikot AF. Glutamate promotes proliferation of striatal neuronal progenitors by an NMDA receptor-mediated mechanism. *J Neurosci*. 2003;23:2239-50.
- ¹²⁸ Poulsen FR, Blaabjerg M, Montero M, Zimmer J. Glutamate receptor antagonists and growth factors modulate dentate granule cell neurogenesis in organotypic, rat hippocampal slice cultures. *Brain Res*. 2005;1051:35-49.
- ¹²⁹ Balazs R, Jorgensen OS, Hack N. N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells in culture. *Neuroscience*. 1988;27:437-51.
- ¹³⁰ D'Mello SR. Molecular regulation of neuronal apoptosis. *Curr Top Dev Biol*. 1998;39:187-213.

- ¹³¹ Copani A, Casabona G, Bruno V, Caruso A, Condorelli DF, Messina A, Di Giorgi Gerevini V, Pin JP, Kuhn R, Knopfel T, Nicoletti F. The metabotropic glutamate receptor mGlu5 controls the onset of developmental apoptosis in cultured cerebellar neurons. *Eur J Neurosci*. 1998;10:2173-84.
- ¹³² Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem*. 2001;76:1-10.
- ¹³³ Wang JQ, Fibuch EE, Mao L. Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem*. 2007;100:1-11.
- ¹³⁴ Dolmetsch RE, Pajvani U, Fife K, Spotts JM, Greenberg ME. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*. 2001;294:333-9.
- ¹³⁵ Kim JH, Liao D, Lau LF, Huganir RL. SynGAP: a synaptic RasGAP that associates with the PSD-95/SAP90 protein family. *Neuron*. 1998 ;20:683-91.
- ¹³⁶ Chen HJ, Rojas-Soto M, Oguni A, Kennedy MB. A synaptic Ras-GTPase activating protein (p135 SynGAP) inhibited by CaM kinase II. *Neuron*. 1998;20:895-904.
- ¹³⁷ Krapivinsky G, Krapivinsky L, Manasian Y, Ivanov A, Tyzio R, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Clapham DE, Medina I. The NMDA receptor is coupled to the ERK pathway by a direct interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron*. 2003;40:775-84.
- ¹³⁸ Tian X, Feig LA. Age-dependent participation of Ras-GRF proteins in coupling calcium-permeable AMPA glutamate receptors to Ras/Erk signaling in cortical neurons. *J Biol Chem*. 2006;281:7578-82.
- ¹³⁹ Ivanov A, Pellegrino C, Rama S, Dumalska I, Salyha Y, Ben-Ari Y, Medina I. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol*. 2006;572:789-98.
- ¹⁴⁰ Kim MJ, Dunah AW, Wang YT, Sheng M. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. *Neuron*. 2005;46:745-60.
- ¹⁴¹ Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*. 1999;51:7-61.
- ¹⁴² Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2007;27:2846-57.
- ¹⁴³ Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 1993;361:315-25
- ¹⁴⁴ Lopez-Colome AM, Ortega A. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate in cultured radial glia. *Neurochem Res*. 1997; 22:679-85.
- ¹⁴⁵ Vaccarino FM, Hayward MD, Nestler EJ, Duman RS, Tallman JF. Differential induction of immediate early genes by excitatory amino acid receptor types in primary cultures of cortical and striatal neurons. *Brain Res Mol Brain Res*. 1992; 12:233-41.
- ¹⁴⁶ Bading H, Segal MM, Sucher NJ, Dudek H, Lipton SA, Greenberg ME. N-methyl-D-aspartate receptors are critical for mediating the effects of glutamate on

intracellular calcium concentration and immediate early gene expression in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*. 1995;64:653-64.

¹⁴⁷ Wang JQ, Tang Q, Parelkar NK, Liu Z, Samdani S, Choe ES, Yang L, Mao L. Glutamate signaling to Ras-MAPK in striatal neurons: mechanisms for inducible gene expression and plasticity. *Mol Neurobiol*. 2004;29:1-14.

¹⁴⁸ Perkinton MS, Sihra TS, Williams RJ. Ca(2+)-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *J Neurosci*. 1999;19:5861-74.

¹⁴⁹ Thandi S, Blank JL, Challiss RA. Group-I metabotropic glutamate receptors, mGlu1a and mGlu5a, couple to extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation via distinct, but overlapping, signalling pathways. *J Neurochem*. 2002;83:1139-53.

¹⁵⁰ Hazzalin CA, Mahadevan LC. MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3:30-40.

¹⁵¹ Kase S, Yoshida K, Harada T, Harada C, Namekata K, Suzuki Y, Ohgami K, Shiratori K, Nakayama KI, Ohno S. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and p27(KIP1) after retinal detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006;244:352-8.

¹⁵² Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol*. 1995;130:393-405.

¹⁵³ Desmouliere, A. 1995. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol. Int.* 19:471-6.

¹⁵⁴ Pawlak G, Helfman DM. Post-transcriptional down-regulation of ROCK1/Rho-kinase through an MEK-dependent pathway leads to cytoskeleton disruption in Ras-transformed fibroblasts. *Mol Biol Cell*. 2002;13:336-47.

¹⁵⁵ Reuveni, H., Geiger, T., Geiger, B., and Levitzki, A. Reversal of the ras-induced transformed phenotype by HR12, a novel ras farnesylation inhibitor, is mediated by the Mek/Erk pathway. *J. Cell Biol.* 2000.151, 1179-92.

¹⁵⁶ Sahai E, Olson MF, Marshall CJ. Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J*. 2001;20:755-66.

¹⁵⁷ Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*. 2000;348 Pt 2:241-55.

¹⁵⁸ Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science*. 1997;275:1308-11.

¹⁵⁹ Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*. 1999;1:136-43.

¹⁶⁰ Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol*. 1996;16:5313-27.

¹⁶¹ Yang N, Higuchi O, Ohashi K, Nagata K, Wada A, Kangawa K, Nishida E, Mizuno K. Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature*. 1998;393:809-12.

¹⁶² Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*. 1999;285:895-8.

¹⁶³ Bamburg JR, McGough A, Ono S. Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol*. 1999;9:364-70.

¹⁶⁴ Ohashi K, Nagata K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S, Mizuno K. Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem*. 2000;275:3577-82.