



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

LIBERACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
TRANSFORMANTE β Y EXPRESIÓN DE SUS
RECEPTORES EN EL EPITELIO PIGMENTADO
DE LA RETINA: EFECTO DEL GLUTAMATO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

ARIADNA YOLANDA RUIZ LOREDO



FACULTAD DE CIENCIAS
ENAM

**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.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Liberación del factor de crecimiento transformante beta y expresión de sus receptores en el epitelio pigmentado de la retina: efecto del glutamato"

realizado por **Ruiz Loredo Ariadna Yolanda**, con número de cuenta **300092378** quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dra.	María Luisa Fanjul Peña	
Propietario	Dra.	Maricela Villagrán Santa Cruz	
Tutor(a) Propietario	Dra.	Ana María López Colomé	
Suplente	Dra.	Marina Macías Silva	
Suplente	Dr.	Manuel Uribe Alcocer	

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 18 de octubre del 2007
EL COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

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

Este trabajo fue parcialmente financiado por los donativos otorgados a la Doctora Ana María López Colomé 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 Doctora Ana María López Colomé por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su tiempo dedicado en mi formación profesional.

A los Doctores: María Luisa Fanjul Peña, Marina Macías Silva, Maricela Villagrán Santa Cruz y Manuel Uribe Alcocer, por sus valiosos comentarios y correcciones en la elaboración de esta tesis.

A la Q.F.B. Edith Catalina López Hernández, la Dra. Irene Lee Rivera y el M. en C. José Prisco Palma Nicolás, por su excelente ayuda técnica.

A mis compañeros de laboratorio, por su valioso apoyo técnico y las experiencias compartidas.

A mis padres, que me lo han dado todo, y a mi familia.

A mis amigos, por su apoyo incondicional.

A la fundación de Asistencia Privada “Alberto y Dolores Andrade”, por apoyarme económicamente a lo largo de mis estudios.

ÍNDICE

Abreviaturas	4
Resumen	8
I. Introducción	
Percepción visual y retina	9
El epitelio pigmentado de la retina (EPR)	10
Origen del EPR	11
Características anatómicas del EPR	12
Características funcionales del EPR	13
Respuestas celulares al desprendimiento de la retina	20
La vitreorretinopatía proliferativa (VRP)	21
Formación de membranas durante la VRP	22
La VRP y los factores de crecimiento	24
El factor de crecimiento transformante β (TGF- β)	25
La superfamilia del TGF- β	25
Receptores del TGF- β	25
Transducción de la señal y proteínas Smad	27
El papel de las proteínas accesorias	29
Regulación de la transcripción por las Smads	31
Mecanismos para finalizar la transducción por el TGF- β	34
Interacción del TGF- β con otras vías	35
Expresión del TGF- β y de sus receptores en el ojo	36
El glutamato	37
Receptores de glutamato	38
Farmacología de los receptores de glutamato	43
El glutamato y la regulación de la expresión génica	44
Glutamato y excitotoxicidad	45
El glutamato y su función en el ojo	45
Excitotoxicidad por glutamato y VRP	46
II. Planteamiento del Problema	
	48

III. Hipótesis	49
IV. Objetivos	49
V. Metodología	
Cultivo primario de EPR de pollo	50
Cultivo primario de ERP de rata	50
Pasaje de ARPE-19	51
Inmunofluorescencia	51
Cinéticas de activación por glutamato	52
Inmunoensayo unido a una enzima	52
Extracción de RNA	53
Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa	53
Electroforesis de cDNA	55
VI. Resultados	
Morfología de las células del EPR en cultivo	56
Inmunofluorescencia para RPE65 y citoqueratina	56
Efecto del glutamato sobre la liberación de TGF- β en el EPR	56
Expresión de los T β Rs en el EPR	58
Efecto del glutamato sobre la expresión de los T β Rs en el EPR	60
Factores de transcripción asociados a la región 5'-UTR del T β RII y del T β RIII en el pollo	63
VII. Discusión	
Expresión de la proteína RPE65 en cultivos primarios del EPR y no en la línea celular ARPE-19	65
El glutamato no modifica la liberación de TGF- β en el EPR	66
Análisis de la expresión de los T β Rs en el EPR	68
Regulación de la expresión génica de los T β Rs	69
El glutamato modifica la expresión del T β RII y del T β RIII en el EPR de pollo	70
Análisis de los posibles factores de transcripción involucrados en regular la expresión génica del T β RII y del T β RIII en el pollo	71

VIII. Conclusiones	73
IX. Referencias	74

ABREVIATURAS

ACPC	Ácido 1-aminociclopropanocarboxílico
AHR	Receptor de aril hidrocarbano
Akt	Proteína cinasa B
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalpropionato
AP	Proteína activadora
AREB	Elemento regulador de unión al ATP1 α 1
ARNT	Translocador nuclear del receptor de aril hidrocarbano
α-SMA	Actina α de músculo liso
ATF	Factor de transcripción activador
ATP	Adenosina 5' trifosfato
ATPA	Ácido 5- <i>tert</i> -butil-4-isoxazolpropiónico
BACH2	Represor transcripcional específico de células B
BRACH	Gen Brachyury
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BMP	Proteína de morfogénesis del hueso
BSA	Albúmina de suero bovino
CaMK	Proteína cinasa dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
Cdc	Proteína controladora de la división celular
CDE	Elemento dependiente del ciclo celular
c-ETS	Proto-oncogen perteneciente a la familia ETS
CGS 19755	Ácido (+/-)- <i>cis</i> -4-fosfonometil-2-piperidina carboxílico
CKROX	Proteína krox de colágena
CNQX	6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
COMP1	Factor de cooperación con proteínas miogénicas
CP2	Factor de transcripción relacionado con la familia de los elementos de unión neurogénicos
CP-465,022	3-(2-Cloro-fenil)-2-(2-(6-dietilaminometil-pirridin-2-il)-vinil)-6-fluoro-3 <i>H</i> -quinazolin-4-ona
CP-526,427	2-{2-(3-(2-Cloro-fenil)-6-fluoro-4-oxo-3,4-dihidro-quinazolin-2-il)-vinil}-nicotinonitrilo
CPG 39653	Ácido _{D,L} -(E)-2-amino-4-propil-5-fosfono-3-pentenóico
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
CX516	1-(quinoxalin-6-ilcarbonil)-piperidina
CX546	1-(1,4-benzotiadiazina)-1,1-dióxido
DAG	Diacilglicerol
DAN	Gen aberrante diferencial seleccionado por mapeo en neuroblastoma
D-AP5	(<i>R</i>)-2-amino-5-fosfonopentanoato
DEC	Proteína básica hélice-bucle-hélice, que “decora”
DEPC	Dietil-piromcarbonato
DNQX	6,7-dinitro-quinoxalina-2,3-diona
E2F	Regulador del promotor E2 de adenovirus
E4F	Regulador del promotor E4 de adenovirus
EAAC	Acarreador de aminoácidos excitadores
EAAT	Transportador de aminoácidos excitadores
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGR	Gen de respuesta temprana al crecimiento
EKLF	Factor eritroide semejante a Kruppel
ELF	Fodrina de hígado embrionario

ELISA	Inmunoensayo unido a una enzima
ELK-1	Oncogen de la familia ETS
EMT	Transición epitelio-mesénquima
EPR	Epitelio pigmentado de la retina
ERK	Cinasa regulada por señales extracelulares
ETS	Factor de transcripción que contiene un dominio Ets
EVI1	Factor codificado por el sitio 1 ecotrópico de integración viral
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FKBP12	Proteína de unión a FK506 de 12 kDa
FLI	Integración a la leucemia amigable
GABP	Proteína de unión a GA
GCM1	Células gliales sin el gen homólogo 1
GKLF	Factor enriquecido en las vísceras semejante a Kruppel
GLI1	Oncogen homólogo 1 asociado al glioma
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GYKI 52466	1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metilenodioxo-5H-2,3-benzodiazepina
GYKI 53784	(R)-1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metilenodioxo-4,5-di-hidro-3-metilcarbomil-2,3-benzodiazepina
GZF	Gen regulado por proteínas con dedos de zinc, inducido por el factor neurotrófico derivado de células gliales
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HELT	Represor transcripcional semejante a Hey
HES1	Potenciador del gen homólogo 1 split y hairy en <i>Drosophila</i>
Hgs	Substrato de tirosina cinasa regulado por el factor de crecimiento de hepatocitos
HIC	Clon inducido por peróxido de hidrógeno
HIF	Factor inducido por hipoxia
HMX	Caja homeótica
HNF	Factor nuclear hepático
HOX	Caja homeótica
HRP	Peroxidasa de rábano
IGF	Factor de crecimiento semejante a la insulina
iGluR	Receptor de glutamato ionotrópico
IκB	Inhibidor de NF-κB
IFN-γ	Interferón γ
INSM1	Asociado al insulinoma 1
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IPM	Matriz interfotorreceptora
IRF	Factor regulador de interferon
JNK	Cinasa N-terminal Jun
KA	2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina / Kainato
KKLF	Factor enriquecido en el riñón semejante a Kruppel
LY339434	Ácido (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>E</i>)-2-amino-4-carboxi-7-(2-naftil)hept-6-enóico
LY392098	(<i>R</i> - <i>S</i>)- <i>N</i> -2-(4-(3-tienil)fenil)propil-2-propanesulfonamida
LY404187	<i>N</i> -2-(4-(4-cianofenil)fenil)propil-2-propanesulfonamida
LYL1	Leucemia linfoblastómica 1
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MAZF	Dedo de zinc asociado a Myc
MAZR	Factor de transcripción relacionado a MAZF
MEK	MAP-cinasa-cinasa
MEKK, MKK	MAP-cinasa- cinasa-cinasa
mGluR	Receptor de glutamato metabotrópico

MH	Homólogo a Mad
MOK2	Proteína con dedos de zinc asociada a ribonucleoproteínas
MTATA	Caja TATA muscular
MTBF	Sitio de unión a Mt, específico de músculos
MTF	Factor de transcripción de metal
MyoD	Factor determinante de mioblastos
MYT	Factor de transcripción con dedos de zinc involucrado en la neurogénesis
MZF	Dedo de zinc mieloides
NAD	Nicotina adenina dinucleótido
NADP	Nicotina adenina dinucleótido fosfato
NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(<i>F</i>)quinoxalina
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica
NEUROG	Neurogenina
NF	Factor nuclear
NFE	Factor nuclear eritroide
NF-κB	Factor Nuclear κ B
NFY	Factor nuclear Y
NGFI-C	Proteína C inducida por el factor de crecimiento de nervios
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMP	Proteína de matriz nuclear
NO	Óxido nítrico
NRF	Factor respiratorio nuclear
NRSE	Elemento silenciador restrictivo de neuronas
NUDR	Factor de transcripción nuclear relacionado al factor autorregulador 1 deforme epidérmico
NXF	Factor nuclear de exportación de RNA
$^{\circ}$O₂	Anión superóxido
OH	Radical hidroxilo
p70S6K	Proteína ribosomal cinasa S6, de 70 kDa
Par	Partición-defectuosa, proteína de polaridad
PAX	Caja pareada
PBS	Amortiguador de fosfatos en solución salina
PBX1	Factor de transcripción de células Pre-B
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEDF	Factor derivado del epitelio pigmentado
PI3K	Fosfatidilinositol 3'-cinasa
PK	Proteína cinasa
PLAG1	Producto del gene pleomórfico de adenoma
PL	Fosfolipasa
PNQX	1,4,7,8,9,10-hexahidro-9-metil-6-nitropirido(3,4-f)-quinoxalina-2,3-diona
PU.1	Factor de transcripción semejante a ETS identificado en linfocitos B
PURA	Proteína de unión a elementos ricos en purinas A
RFX1	Factor regulador X1
RORα	Receptor huérfano relacionado con el receptor α de ácido retinóico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP58	Proteína con dedos de zinc
RT	Retrotranscripción
RU49	Proteína con dedos de zinc 38
RXR	Receptor de ácido retinóico
SARA	Anclaje de Smad para la activación del receptor
Ski	Proto-oncogene Sloan-Kettering Institute

Smad	Proteína relacionada a SMA y a MAD
Smurf	Factor regulador de la ubiquitinación de Smad
SNAIL	Factor de transcripción con dedos de zinc S
SNC	Sistema nervioso central
SnoN	Gen relacionado a Ski
SOG	Proteína corta de gastrulación
SP	Proteína estimuladora
SPI1	Oncogen de integración proviral del virus formador de focos en el bazo
SYM2081	Ácido (S)-5-iodowillardiina, (2S,4R) 4-metil glutámico
SZF1	Proteína con dedos de zinc y con un dominio formado por la caja asociada a Kruppel, restringido de células hematopoyéticas
TAK	Cinasa activada por TGF- β
TAL1	Leucemia linfocítica aguda de células T
TβR	Receptor de TGF- β
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TGIF	Factor de interacción con el TGF- β
TH1	Factor de transcripción Thing1
TIEG	Gen temprano inmediato inducido por el TGF- β
trans-ACDP	(1S,3R)-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato
UBP296	(R,S)-3-(2-carboxibenzil)-willardiina
USF	Factor estimulador río arriba
UTR	Región sin traducir
VDR	Receptor de vitamina D
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VMYB	Oncogen homólogo semejante al virus de mieloblastosis en las aves
VRP	Vitreoretinopatía proliferativa
WHN	Proteína con hélice alada
WT1	Tumor Wilms 1
ZBP	Factor de transcripción con dedos de zinc
ZBRK1	Proteína con dedos de zinc de interacción con el gen susceptible al cáncer de seno y ovario con un dominio formado por la caja asociada a Kruppel
ZF	Proteína con dedos de zinc
ZID	Dedo de zinc con interacción doma
ZNF	Proteína con dedos de zinc semejante a Kruppel

RESUMEN

En los vertebrados, el epitelio pigmentado de la retina (EPR) está formado por una monocapa quiescente de células situadas entre los fotorreceptores de la retina y la coroides. Durante el desarrollo de procesos fibróticos en el polo posterior del ojo, las células del EPR migran de la monocapa, proliferan y pierden su morfología epitelial para adoptar un fenotipo miofibroblástico. Entre las moléculas que han sido relacionadas con la activación de las células del EPR se incluyen al TGF- β y al glutamato. El TGF- β , una citocina multifuncional, está implicado en la transición epitelio-mesénquima de las células del EPR; mientras que el glutamato, el principal neurotransmisor excitador en la retina de los vertebrados, está implicado en la proliferación de dichas células.

Aunque la concentración de ambas moléculas se eleva cuando ocurre un trauma ocular, no se ha determinado si existe alguna interacción entre ellas. Por este motivo, los objetivos de este trabajo son: 1) determinar si el glutamato modifica la liberación de TGF- β en células del EPR, y 2) determinar si el glutamato modifica la expresión de los receptores de TGF- β en células del EPR, puesto que el nivel de expresión de los mismos contribuye a la modulación del señalamiento intracelular.

En este trabajo se realizaron cultivos primarios de EPR de pollo y de rata, y subcultivos de la línea celular de EPR humano ARPE-19. Se determinó bioquímicamente mediante inmunofluorescencia, si existían las proteínas RPE65 y citoqueratina en las células en cultivo. Para determinar si ocurría la liberación de TGF- β se realizaron ensayos de ELISA y para determinar la expresión de los receptores de TGF- β se realizaron ensayos de RT-PCR.

Los resultados muestran que el glutamato no modifica la liberación de TGF- β en el EPR de las especies estudiadas, y tampoco interviene en modular la expresión de los receptores de esta citocina en el EPR de rata y de humano. Sin embargo, este aminoácido induce un aumento significativo en la expresión de los receptores del TGF- β de tipo II y III en el EPR de pollo. El análisis de la región 5'-UTR de estos receptores muestra que el aumento en la transcripción podría deberse a la activación de factores como AP-1, CREB, EGR-1, -2, -3, NGFI-C, p53 y SP1.

INTRODUCCIÓN

Percepción visual y retina

La percepción visual se inicia cuando la luz entra en el globo ocular a través de la córnea, cruza la pupila y se enfoca por la lente sobre la retina, en donde se convierte en una señal electroquímica. Esta señal se envía a través del nervio óptico hacia centros específicos del cerebro para procesar la imagen (Kandel, et al., 2000).

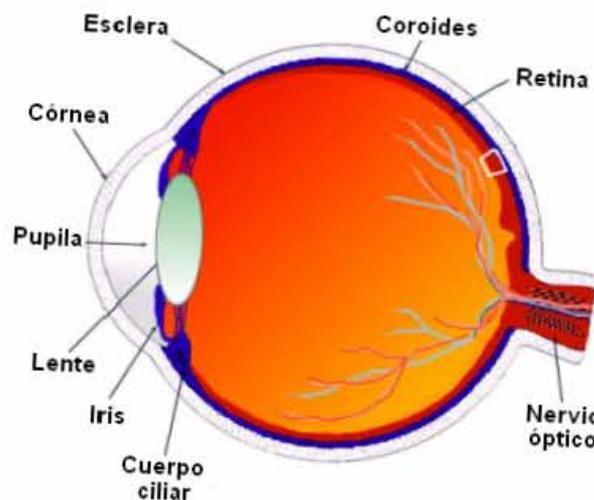


Figura 1. Sección diagramática del ojo humano.

La retina está formada por tres clases de neuronas: los fotorreceptores, que se ubican en la capa nuclear externa; las interneuronas (células bipolares, horizontales y amacrinas), que se localizan en la capa nuclear interna; y las células ganglionares. La mayoría de los contactos sinápticos en la retina están agrupados en dos capas plexiformes. Los fotorreceptores hacen contacto con las células bipolares y células horizontales en la capa plexiforme externa, mientras que las sinapsis de las células bipolares, amacrinas y ganglionares se localizan en la capa plexiforme interna. La información fluye tanto verticalmente de los fotorreceptores a las células bipolares y de éstas a las ganglionares; como lateralmente, a través de las células horizontales y de las células amacrinas (Kandel, et al., 2000).

La retina humana contiene dos tipos de fotorreceptores: los bastones (sin pigmento y altamente fotosensibles, están especializados en la visión nocturna) y los conos (con pigmento y menos fotosensibles que los bastones, intervienen en la visión del color y están especializados en la visión diurna). Ambas estructuras presentan 3 regiones funcionales: 1) los segmentos externos, localizados en la parte distal de la retina y responsables de la fototransducción. Tienen un sistema de discos membranosos que contienen a la rodopsina, el pigmento encargado de absorber la luz; 2) los

segmentos internos, que contienen al núcleo celular y la mayoría de la maquinaria sintética; y 3) una terminal sináptica que hace contacto con las interneuronas (Kandel, et al., 2000).

Las interneuronas no sólo transmiten las señales de los fotorreceptores a las células ganglionares, sino que combinan las señales provenientes de varios fotorreceptores de manera que las respuestas eléctricas transmitidas a las células ganglionares dependen de patrones específicos espacio-temporales de la luz que estimula a la retina (Kandel, et al., 2000).

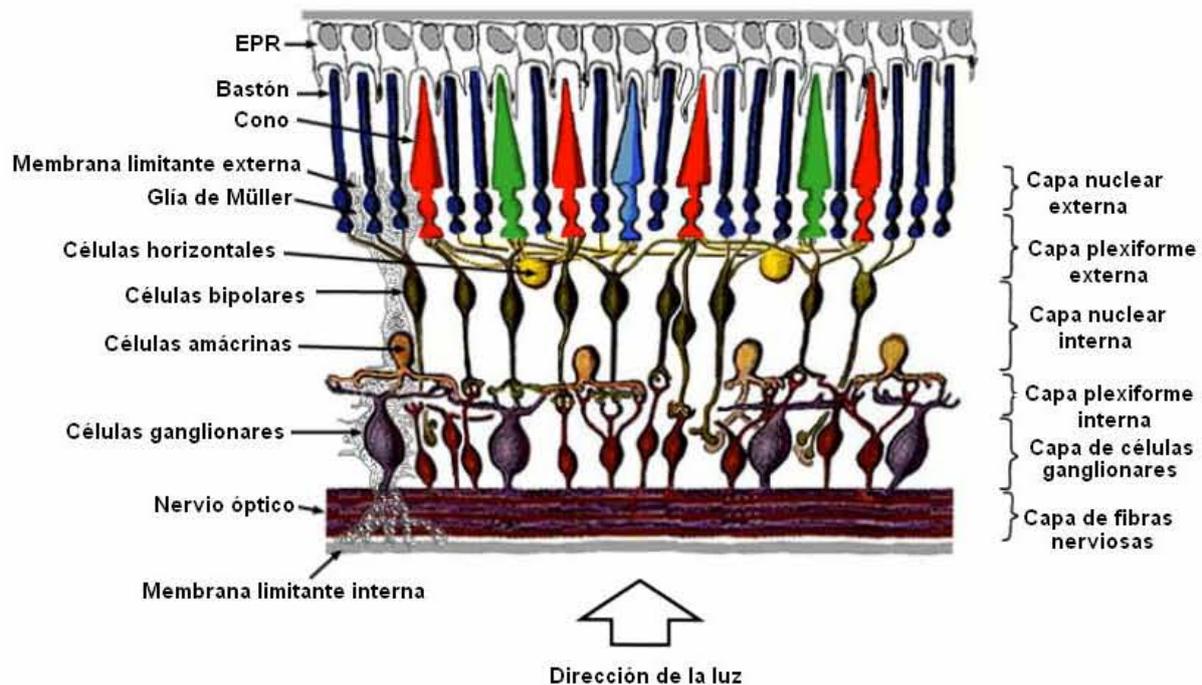


Figura 2. Diagrama que muestra las capas de la retina.

El epitelio pigmentado de la retina

En el ojo de los vertebrados, el epitelio pigmentado de la retina (EPR) es vital para las células visuales, ya que les provee de un soporte metabólico y funcional. Entre las funciones que realiza el EPR se encuentran: regular la nutrición de la retina externa; absorber la luz dispersada; introducir, convertir y transportar retinoides; sintetizar algunos componentes que forman parte de la matriz interfotorreceptora; transportar iones y fluidos; controlar el ambiente neuronal; fagocitar los segmentos externos de los fotorreceptores; sintetizar factores de crecimiento; responder a agentes humorales y mantener la adhesión de la retina (Hall, 1998; Marmor, 1998b).

El EPR se compone de una monocapa de células situada entre los fotorreceptores de la retina y la coroides. En circunstancias normales, el EPR no se renueva, realizando sus diversas funciones a

lo largo de la vida de un individuo. Una falla en cualquiera de estas funciones puede llevar a la degeneración de la retina y a la pérdida de la función visual (Hall, 1998; Strauss, 2005).

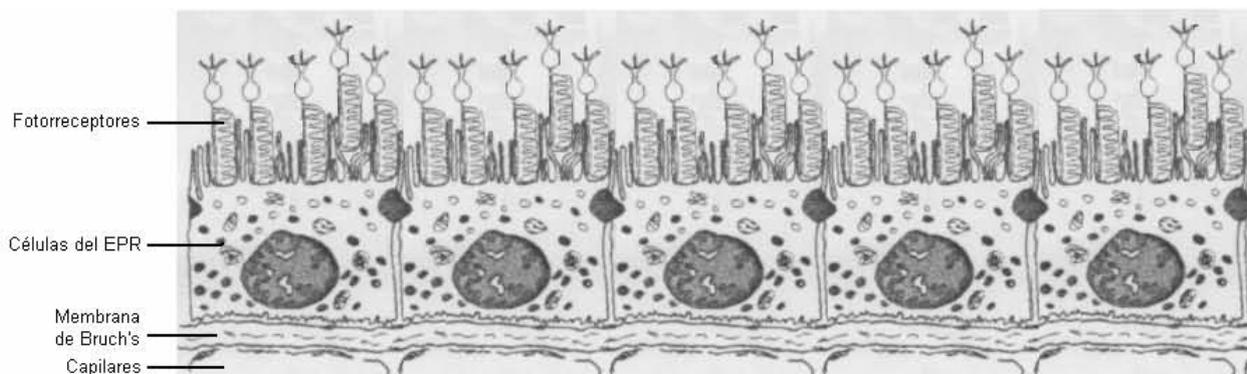


Figura 3. Esquema que muestra la estructura en monocapa del EPR y su ubicación. Modificado de Strauss, 2005.

Origen del EPR

Embriológicamente, el EPR se deriva del tubo neural, a partir del mismo tejido que formará a la retina. Las vesículas ópticas tempranas se invaginan para formar una copa, en la cual la capa interna dará origen a la retina neural, mientras que la capa externa dará origen al EPR. Posteriormente, la retina neurosensorial se diferencia en varias capas de neuronas, y el EPR permanece como una monocapa que adopta las características de un epitelio secretor (Marmor, 1998b; Mey y Thanos, 2000).

El desarrollo del EPR puede dividirse en dos fases principales:

1) En la primera fase se establece la estructura prospectiva de las dos capas. Después de la invaginación de la copa óptica, las células del neuroepitelio que, por un lado están destinadas a convertirse en EPR y por otro lado a formar parte de la retina neural, construyen dos capas opuestas que quedan separadas por un lumen remanente. Dicho espacio es ocupado por un nuevo material, la matriz interfotorreceptora. Varios factores de transcripción son necesarios para la determinación y diferenciación del EPR, entre los que se encuentran el factor de transcripción que contiene un homeodominio (OTX2) y el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF). También se ha visto que el ácido retinoico promueve la diferenciación del EPR (Mey y Thanos, 2000; Strauss, 2005).

La maduración del EPR comienza con la síntesis de una enzima llamada tirosinasa, la cual cataliza la conversión, a través de una compleja serie de intermediarios metabólicos, de L-tirosina a melanina. Durante esta etapa el EPR comienza a adoptar polaridad apical-basal, la cual queda establecida tanto por la formación de uniones estrechas, como por la expresión diferencial de

proteínas transportadoras y de adhesión. Las uniones estrechas contribuyen a la formación de la barrera hematorretiniana y al inicio del transporte epitelial (Boulton, 1998; Strauss, 2005).

2) Durante la segunda fase, el EPR se prepara para interactuar con los fotorreceptores, para lo cual alarga sus microvellosidades apicales hacia el espacio subretinal. Las microvellosidades comienzan a rodear a los segmentos externos de los fotorreceptores y al final de la diferenciación el EPR desarrolla dos tipos de microvellosidades: microvellosidades largas (5-7 μm) que maximizan la superficie apical para el transporte epitelial, y microvellosidades cortas involucradas en la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores (Strauss, 2005).

Características anatómicas del EPR

Vistas en una sección transversal, las células del EPR son cuboidales. En la región macular miden de 10-14 μm de diámetro, mientras que hacia la periferia las células se vuelven más aplanadas y anchas, alcanzando un diámetro de hasta 60 μm . Como la densidad de fotorreceptores también varía a lo largo de la retina, el número de fotorreceptores que se extienden sobre cada célula de EPR permanece constante, en un intervalo aproximado de 45-50 fotorreceptores por célula (Marmor, 1998b).

Cada célula de EPR está diferenciada en una porción apical (dirigida hacia los segmentos externos de los fotorreceptores), y una porción basal (dirigida hacia la membrana de Bruch). El lado apical cuenta con numerosas microvellosidades que alcanzan a los segmentos externos de los fotorreceptores, envolviéndolos parcialmente. El citoplasma apical contiene microfilamentos y microtúbulos, y también la concentración más alta de gránulos de melanina. La porción intermedia contiene al núcleo y a la maquinaria sintética, así como a las vesículas digestivas. La membrana basal tiene pequeñas invaginaciones que incrementan la superficie de absorción y secreción (Marmor, 1998b; Strauss, 2005).

Cerca de la porción apical de una célula de EPR se encuentra la zonula ocludens, formada por uniones estrechas. Estas uniones restringen el paso de moléculas y iones, permitiendo al EPR formar la parte exterior de la barrera hematorretiniana (la otra parte la conforma el endotelio capilar). Además de la zonula ocludens, células contiguas de EPR presentan una zonula adherens, involucrada en mantener la adhesión celular y la estructura en monocapa del epitelio (Marmor, 1998b; Spaide y Yanuzzi, 1998). Otra característica anatómica importante es la presencia de pigmentos, entre los que destacan la melanina y la lipofuscina (Marmor, 1998b).

La membrana de Bruch, un tejido conectivo acelular, separa al EPR del endotelio fenestrado de los coriocapilares. Esta estructura consta de cinco capas: a) la membrana basal del EPR, b) una capa interna de colágena, c) una capa de elastina, d) una capa externa de colágena y e) la membrana

basal de los coriocapilares (Hageman y Kuehn, 1998; Strauss, 2005). En el lado externo de la membrana de Bruch está la coroides, una estructura vascular densamente empacada (Spaide y Yanuzzi, 1998). El espacio subretinal está delineado por los ápices de las células de Müller, los fotorreceptores y el EPR (Hageman y Kuehn, 1998).

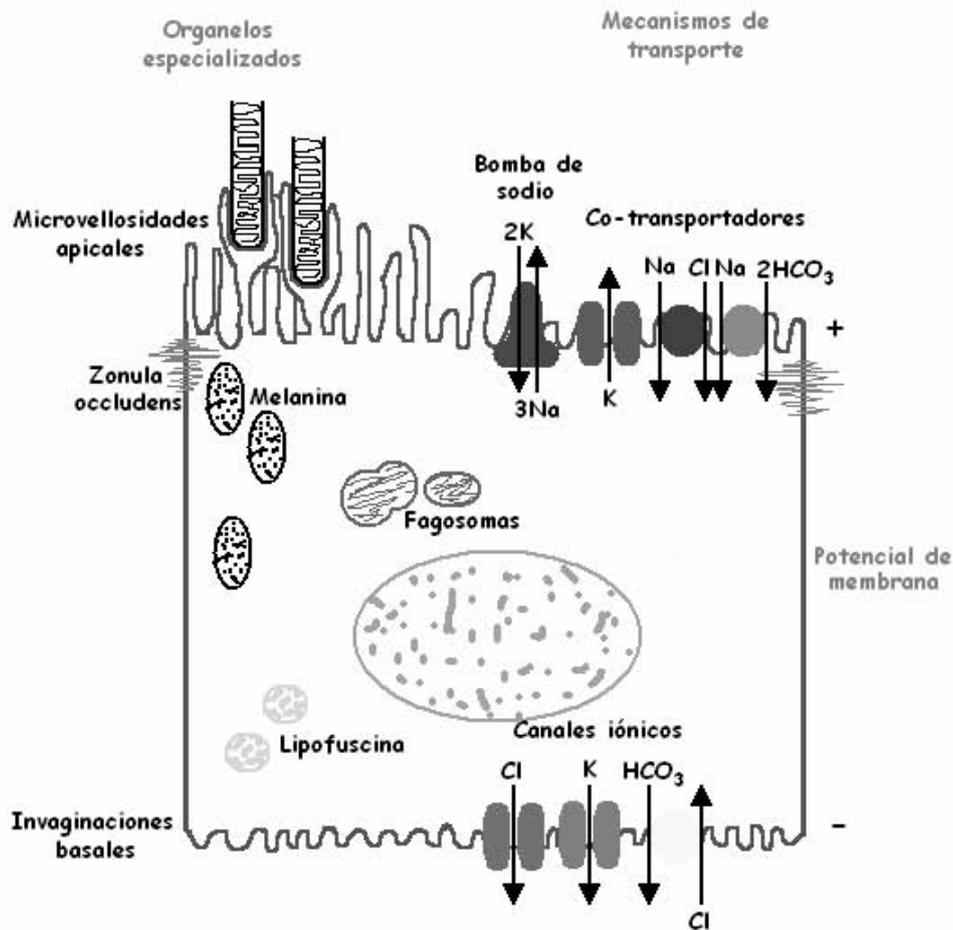


Figura 4. Célula de EPR idealizada que muestra las principales características anatómicas y fisiológicas. Modificado de Marmor, 1998.

Características funcionales del EPR

*Absorción de la energía. Como una capa de células pigmentadas, el EPR absorbe la energía luminosa dispersa, lo que ayuda a incrementar la calidad visual. El EPR cuenta con tres líneas de defensa contra la foto-oxidación y las toxinas: (1) absorción y filtrado de la luz, lo cual logra a través de los pigmentos que contiene; (2) presencia de antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa, carotenoides, glutatión y melanina); y (3) capacidad fisiológica de la célula para reparar DNA, lípidos y/o proteínas que hayan sufrido algún daño (Strauss, 2005).

*Pigmentos

-Melanina. El EPR debe su color café-negro al contenido de melanina, la cual se concentra en gránulos denominados melanosomas (Boulton, 1998).

La melanina: (a) actúa como un filtro neutral, contribuyendo a la visión al impedir el reflejo de luz en el fundus y al proteger a las células fotorreceptoras de un exceso de luz dispersada; (b) atenúa la radiación lumínica cuando está en el melanosoma; (c) absorbe la energía radiante (UV y del espectro visible) y disipa la energía absorbida como calor, sin ocasionar daño; (d) protege a las células del EPR y tejidos adyacentes ya que tiene la capacidad de unirse a varios químicos potencialmente dañinos, como aminas orgánicas, metales catalíticamente oxidativos, hidrocarburos aromáticos y/o policíclicos, grandes cantidades de calcio, etc.; (e) utiliza la energía absorbida para oxidarse a través de la generación de radicales libres semiquinoides en el polímero; (f) como un radical libre estable, tiene la capacidad de actuar como un polímero de intercambio biológico; (g) puede actuar como un quelante de radicales libres, ya que todas las melaninas funcionan como aceptores poderosas de electrones, lo que probablemente contribuya a su actividad como antioxidante; y (h) constituye la principal fuente de zinc en el ojo, siendo este metal muy importante para la actividad de algunas enzimas (superóxido dismutasa, anhidrasa carbónica, deshidrogenasa retinal, colagenasa y catalasa), además de intervenir en el metabolismo de la retina y en la regulación génica (Boulton, 1998; Schraermeyer y Heimann, 1999).

-Lipofuscina. También llamada pigmento del envejecimiento, es un material café-amarillento, electrodensito y con autofluorescencia que se acumula progresivamente con el paso del tiempo en los lisosomas de las células del EPR. Se piensa que la lipofuscina deriva de fragmentos de membrana (principalmente lípidos) dañados por la luz o la oxidación, provenientes de los segmentos externos que han sido ingeridos por el EPR. Como estos fragmentos son deficientemente digeridos, se acumulan conforme se envejece (Marmor, 1998b; Schraermeyer y Heimann, 1999).

*Transporte: control metabólico y del ambiente celular. El bienestar y la integridad de las neuronas que componen la retina dependen de un ambiente extracelular bien regulado y esto se logra mediante la actividad de células accesorias, entre las que destacan células del EPR. Las funciones del EPR que contribuyen a este proceso incluyen: fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, transporte y metabolismo de la vitamina A y la regulación del volumen y composición del fluido subretinal a través del transporte de iones, fluidos y metabolitos. Este transporte es generado por proteínas especializadas presentes en dos dominios membranales diferentes: la membrana apical y la membrana basolateral. Esta asimetría permite al epitelio llevar a cabo un transporte vectorial. Una variedad de señales paracrinas, autocrinas u hormonales originadas

a partir de la retina neural, el EPR mismo, o la sangre a través de la coroides modulan este transporte, permitiendo al EPR mantener el microambiente específico que se requiere para la actividad normal de la retina. Las señales recibidas activan a diferentes receptores en la superficie de la membrana, que están acoplados a proteínas G apropiadas y a otros mecanismos para activar sistemas intracelulares de segundos mensajeros, como: inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), Ca^{2+} , AMP cíclico (cAMP), H^+ , cuya actividad altera directamente la función y transporte del epitelio (Hughes, et al., 1998).

De acuerdo a la dirección del transporte de moléculas a través del EPR, éste puede dividirse en absorción y secreción:

-La absorción involucra el transporte de iones, agua y productos metabólicos de la retina hacia la coroides. Existe una gran producción de agua en la retina debido a la alta actividad metabólica de las neuronas y fotorreceptores, así como a la presión intraocular que mueve agua del cuerpo vítreo hacia la retina. Esto establece la necesidad de retirar constantemente el agua, función que en el espacio subretinal es realizada por el EPR. El EPR también es responsable de eliminar productos metabólicos de los fotorreceptores, siendo el más importante el ácido láctico (Strauss, 2005).

-La secreción involucra el transporte de nutrientes (glucosa), retinol y ácidos grasos de la coroides hacia la retina. Para transportar glucosa el EPR contiene altas cantidades de transportadores de glucosa tanto en el lado apical como en el basolateral. Otra función importante es transportar retinol para asegurar un suplemento, aunque pequeño, de retinal a los fotorreceptores. Las membranas de las neuronas y de los fotorreceptores están constituidas selectivamente de fosfolípidos altamente enriquecidos con ácido docosahexaenoico. Este compuesto no puede ser sintetizado por el tejido neural, sino que se sintetiza a partir de su precursor, el ácido linoleico, en el hígado y es transportado en la sangre unido a lipoproteínas plasmáticas (Strauss, 2005).

Como ya se mencionó, las membranas apical y basal de las células del EPR se diferencian por los receptores y canales iónicos que contienen. Por ejemplo, a diferencia de otros epitelios, en el EPR se expresa de manera apical la ATPasa de Na^+/K^+ , que además de mantener el gradiente electroquímico del Na^+ y el K^+ a través de la membrana plasmática, provee la energía necesaria para el transporte epitelial (Gundersen, et al., 1991). Los intercambiadores de Na^+/H^+ y de Na^+/HCO_3^- , que participan en la regulación del pH, también se localizan en la cara apical. En la cara basolateral podemos encontrar al intercambiador de Cl^-/HCO_3^- y a canales de Cl^- , que participan de manera importante en la regulación del pH. El EPR contiene transportadores que se expresan tanto en el lado apical como en el basal, como las acuaporinas y el cotransportador de lac^-/H^+ (Marmor, 1998b; Strauss, 2005).

El efecto neto de las bombas y los canales iónicos es un movimiento de agua a través del EPR en la dirección retina-coroides, así como la generación de una diferencia de voltaje a través del EPR (el lado apical tiene carga positiva y el basolateral tiene carga negativa). Si se daña la barrera formada por el EPR, el fluido abandonaría el espacio subretinal más rápidamente que en condiciones normales. Estas interacciones subyacen al mecanismo de desprendimientos clínicos de la retina y el EPR, y corioretinopatías (Marmor, 1998b; Strauss, 2005).

*Ciclo visual. Otra de las funciones del EPR es su participación en el ciclo visual. Éste involucra el continuo movimiento de la vitamina A (retinol) y algunos de sus derivados (retinoides) entre los fotorreceptores y el EPR. El propósito de este ciclo es regenerar el 11-*cis*-retinal, cromóforo que forma parte de la rodopsina (Schraermeyer y Heimann, 1999).

La fototransducción se inicia con la isomerización del 11-*cis*-retinal a la forma all-*trans*-retinal, en respuesta a la energía proveniente de los fotones. Esto resulta en la formación de una rodopsina activa, que a su vez puede activar a la transducina en el siguiente paso de la cascada fototransdutora. El estado activo de la rodopsina termina cuando ésta es fosforilada y se asocia con la arrestina. La rodopsina inactiva libera el all-*trans*-retinal (que posteriormente es reducido a all-*trans*-retinol), y ahora se puede unir a una nueva molécula de 11-*cis*-retinal (Schraermeyer y Heimann, 1999; Strauss, 2005).

El EPR convierte el all-*trans*-retinal a 11-*cis*-retinal mediante dos vías:

-En la primera, el all-*trans*-retinol se une a la proteína de unión al retinol celular (CRBP). La reisomerización se inicia mediante una esterificación que incluye la transferencia de un grupo acilo al retinol, paso catalizado por la lecitin-retinol transferasa. La enzima que cataliza la isomerización de all-*trans*-retinil a 11-*cis*-retinol es la isómerohidrolasa RPE65, una proteína que se expresa de manera abundante en el EPR de los vertebrados, y que por ello se utiliza como marcador bioquímico de este tipo celular. El siguiente paso es la oxidación de 11-*cis*-retinol a 11-*cis*-retinal, paso dependiente de NAD y NADP, y que es llevado a cabo por una 11-*cis*-retinol deshidrogenasa (Dunn, et al., 1996; Kociok, et al., 1998; Ma, et al., 2001; Boulanger y Redmond, 2002; Moiseyev, et al., 2005; Strauss, 2005; Takahashi, 2006).

-Esta vía está complementada por un camino alternativo que involucra la actividad de un receptor EPR-retinal acoplado a una proteína G (RGR). RGR convierte all-*trans*-retinal a 11-*cis*-retinal en una reacción de isomerización inversa a la que ocurre en la rodopsina (Strauss, 2005).

*Matriz Interfotorreceptora. La matriz interfotorreceptora (IPM) se une firmemente tanto a la membrana de los segmentos externos de los fotorreceptores como a la membrana apical del EPR, y

media diversas interacciones entre estos dos tejidos como son la adhesión, la fagocitosis y el intercambio de nutrientes. La IPM está formada por moléculas complejas, entre las que se encuentran proteoglicanos, glucosaminoglicanos, ácido hialurónico, metaloproteasas, factores de crecimiento, proteína IRPB, etc. (Marmor, 1998b; Strauss, 2005).

Las propiedades adhesivas y la viscosidad de la matriz dependen de su hidratación y del ambiente iónico, los cuales están controlados metabólicamente por el EPR (Marmor, 1998b).

*Adhesión retinal. A pesar de la presencia del espacio subretinal, la retina permanece firmemente unida al EPR a lo largo de la vida. Esta adhesión es vital para la retina, ya que una retina desprendida no puede registrar las imágenes enfocadas, y los fotorreceptores finalmente degenerarían debido a la falta de nutrientes y de otros factores derivados del EPR (Marmor, 1998a).

El ojo cuenta con múltiples mecanismos que se complementan e interactúan entre sí para mantener a la retina en su lugar. Algunos de estos mecanismos se mencionan a continuación:

-La presencia del gel vítreo, que físicamente puede impedir la separación de la retina y tal vez funciona para sellar pequeños agujeros (Marmor, 1998a).

-El transporte de agua en dirección retina→coroides. Tanto las fuerzas hidrostáticas pasivas (presión hidrostática y presión osmótica), como el transporte activo de agua a través del EPR, actúan para conducir el agua fuera del espacio subretinal y hacia la coroides. La salida de agua actúa para empujar a la retina contra el EPR (Marmor, 1998a).

-Interacciones anatómicas: las microvellosidades presentes en la cara apical de las células del EPR se interdigitan con los segmentos externos de los fotorreceptores, lo que refuerza la adhesividad (Marmor, 1998a).

-Matriz interfotorreceptora. Probablemente la IPM sea el elemento de adhesividad más importante, pero su efectividad depende del estado metabólico del EPR y del grado de hidratación en el espacio subretinal (Marmor, 1998a).

-Factores metabólicos: cambiar el estado metabólico del espacio subretinal altera rápidamente la adhesividad (Marmor, 1998a).

Finalmente, podemos mencionar que la concentración iónica (la adhesividad es sensible a las concentraciones de calcio, magnesio, y pH), la temperatura, y las modificaciones enzimáticas y estructurales del EPR y la IPM, son factores que actúan como moduladores de la adhesividad (Marmor, 1998a).

*Fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores. Los fotorreceptores están continuamente expuestos a la energía radiante y al oxígeno, los cuales facilitan la producción de

radicales libres que dañan a las membranas. Como la transducción de la luz depende de la función y estructura apropiadas de los fotorreceptores, el segmento intermedio de éstos genera de manera constitutiva nuevos discos, de manera que los discos más viejos quedan en la punta. Estos discos viejos, que contienen la mayor cantidad de moléculas dañadas y de radicales libres, se desprenden de los fotorreceptores para ser fagocitados por el EPR, en donde son digeridos en vesículas llamadas fagosomas. Posteriormente, las moléculas importantes, como el retinal o el ácido docosahexaenoico, regresan a los fotorreceptores (Marmor, 1998b; Strauss, 2005).

Se considera que el proceso de la fagocitosis consiste de tres pasos: 1) el reconocimiento/unión entre la superficie del EPR y la partícula a ser engullida, 2) la ingestión, y 3) la digestión (López-Colomé, et al., 1994).

*Secreción. Se sabe que el EPR produce y secreta una gran variedad de factores de crecimiento esenciales para mantener la integridad estructural de la retina y de los coriocalpares. Diversos trabajos han demostrado que el EPR secreta: factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), miembros de la familia de las interleucinas (IL), y factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF) (Strauss, 2005).

-PEDF. En un ojo sano el EPR secreta PEDF, que ayuda a mantener tanto a la retina como a los coriocalpares mediante dos formas: 1) se ha descrito que el PEDF es un factor neuroprotector contra la apoptosis inducida por glutamato o por hipoxia; y 2) el PEDF funciona como un factor anti-angiogénico que inhibe la proliferación de las células endoteliales, lo que estabiliza al endotelio de los coriocalpares (Strauss, 2005).

-PDGF. Se sabe que el PDGF estimula la quimiotaxis, proliferación y producción de matriz de tejido conectivo, participando de manera importante en la reparación de las heridas (Campochiaro, 1998).

-VEGF. El VEGF estimula la angiogénesis y participa en la neovascularización ocular. Actúa como uno de los estímulos necesarios para el desarrollo normal de la vasculatura de la retina, y en los adultos funciona como un factor trófico que estabiliza a las células endoteliales (Campochiaro, 1998; Strauss, 2005).

-FGF. Tanto los fotorreceptores como las células del EPR producen y tienen receptores a los FGFs. Éstos actúan como agentes neuroprotectores, y también pueden mediar interacciones tróficas entre el EPR y los fotorreceptores (Campochiaro, 1998).

-Insulina e IGF. Estos factores estimulan la síntesis de DNA, proteínas y proteoglicanos. Su acción más característica es la de estimular la proliferación celular (Campochiaro, 1998).

-TGF- β . La superfamilia del TGF- β consiste en un gran número de proteínas estructuralmente relacionadas que incluyen cinco isoformas de TGF- β (tres de las cuales se expresan en mamíferos), activinas e inhibinas, proteínas morfogenéticas de hueso, etc. (Campochiaro, 1998). El TGF- β inhibe la proliferación de células epiteliales (incluyendo a las células del EPR), endoteliales, hematopoyéticas y de fibroblastos primarios. Sin embargo, el TGF- β tienen actividad mitogénica en ciertas células transformadas y en fibroblastos maduros (Moustakas y Heldin, 2005). Entre otras funciones, el TGF- β es un estimulador potente de la producción de matriz extracelular, promueve la diferenciación de algunas células, tiene efectos neuroprotectores, induce la producción de otros factores de crecimiento entre los que se incluyen al PDGF, FGF, VEGF, TGF- β 1 y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y es un regulador importante de la inflamación y la respuesta inmune (Campochiaro, 1998; Saika, 2006).

La función del TGF- β en la retina y coroides se desconoce. Sin embargo, parece que está involucrado en la modulación de la inflamación, la respuesta inmune y los efectos de otros factores de crecimiento; la neuroprotección; la formación de una barrera bioquímica que evite la neovascularización en el vítreo; y la participación en el proceso de cicatrización (Campochiaro, 1998).

Existen otros factores que se ha demostrado son producidos por células de EPR en cultivo, como son: el factor de crecimiento epidérmico (EGF, estimula la proliferación de células progenitoras neurales), y diversas citocinas (inician la respuesta inflamatoria en el ojo) (Campochiaro, 1998).

La secreción de los factores de crecimiento cambia en respuesta a un daño o a una herida, por ejemplo, estimulando la secreción de factores neuroprotectores como el bFGF y el CNTF. La desregulación de la secreción de estos factores también puede estar implicada en la patogénesis de enfermedades retinianas, caracterizadas por la proliferación celular y la vascularización anormal. Conforme se conozcan las interacciones de estos factores, se podrán encontrar nuevas rutas terapéuticas para tratar una variedad de desórdenes retinianos (Marmor, 1998b; Strauss, 2005).

Es importante mencionar que el EPR contiene receptores para un sorprendente número de agentes humorales, incluyendo receptores adrenérgicos, dopaminérgicos, glutamatérgicos, proteínas de unión para retinoides y nutrientes, receptores hormonales, y proteínas de unión para moléculas de adhesión y factores de crecimiento (López-Colomé, et al., 1994; Marmor, 1998b).

*Barrera Hematorretiniana. El ojo se considera un sitio privilegiadamente inmune, y el EPR desempeña un papel primordial en el mantenimiento de este estado. Como se mencionó previamente, el EPR forma parte de la barrera hematorretiniana, que previene el acceso de células sanguíneas y proteínas plasmáticas. Además el EPR expresa de manera constitutiva el Fas-ligando (capaz de inducir apoptosis de células T activas); y es capaz de sintetizar TGF- β y el antagonista del receptor de la interleucina 1a (IL-1Ra), moléculas que contribuyen al mecanismo de inmunosupresión (Holtkamp, et al., 1999; Zamiri, et al., 2004).

*Reparación y reactividad. En condiciones normales, las células del EPR son estacionarias y mitóticamente quiescentes, sin embargo, retienen las funciones de migración y regeneración como parte de su carácter epitelial (Burnside y Bost-Usinger, 1998; Marmor, 1998b; Spaide y Yannuzzi, 1998). Se sabe que algunos factores que están involucrados en mantener la quiescencia mitótica del EPR son el TGF- β , el IGF y el FGF-5 (Fisher y Anderson, 1998).

Pequeñas lesiones al EPR resultan en la migración y proliferación de nuevas células que rellenan la cavidad producida. Esta capacidad de crecimiento puede tener efectos adversos cuando las células del EPR migran hacia la retina en degeneración o hacia la cavidad vítrea (Marmor, 1998b).

Respuestas celulares al desprendimiento de la retina

La respuesta más rápida de las células del EPR a los desprendimientos retinianos consiste en la desdiferenciación de su superficie apical: las microvellosidades se acortan y algunas veces llegan a desaparecer (Fisher y Anderson, 1998).

Aparentemente, la aposición entre el EPR y la retina es suficiente para mantener la quiescencia mitótica; sin embargo, su separación puede ocasionar: 1) una respuesta intracelular en algunas de las células del EPR que las lleve a entrar al ciclo celular; o 2) la liberación local de algunos factores reguladores que estimulen a algunas de las células separadas a proliferar. La respuesta proliferativa del EPR es responsable de alterar significativamente la organización de la interfase EPR-fotorreceptores, ya que las células hijas asumen diferentes configuraciones, que incluyen largos agregados de células que sobresalen en el espacio subretinal, conjuntos de células que permanecen asociadas a la monocapa, agregados discretos de células dentro del espacio subretinal, y/o múltiples capas adyacentes a la monocapa original (Fisher y Anderson, 1998).

Después del desprendimiento, ocasionalmente se observa que las células del EPR migran de la monocapa. Después de que este proceso se completa y las células entran al espacio subretinal, generalmente las células del EPR asumen una apariencia parecida a la de los macrófagos (Fisher y

Anderson, 1998). Las células que migran exhiben grandes diferencias en la organización de su citoesqueleto, las cuales incluyen la formación de filamentos de actina especializados, llamados fibras de estrés, y su asociación con proteínas accesorias como la vinculina, que son necesarias para generar fuerzas traccionales para la migración celular. La migración del EPR también se ve influenciada por citocinas y factores de crecimiento (Burnside y Bost-Usinger, 1998).

La vitreorretinopatía proliferativa

La vitreorretinopatía proliferativa (VRP) puede ser definida como el establecimiento y contracción de membranas celulares dentro de la cavidad vítrea y en ambas superficies de la retina, proceso que ha sido caracterizado como una cicatrización inapropiada que ocurre después de que la retina ha sufrido un desprendimiento (Kim y Arroyo, 2002; Pastor, et al., 2002).

La VRP puede presentarse antes de que se lleve a cabo la cirugía intraocular (VRP preoperativa), pero su incidencia (de entre 5-10%) aumenta después de haberse llevado a cabo la cirugía (VRP postoperativa), constituyéndose como la principal barrera para una cirugía exitosa. La formación de membranas contráctiles genera nuevos desprendimientos de la retina, reapertura de las heridas tratadas, plegamiento parcial o total de la retina, e incluso en la formación de un agujero en la retina (Hiscott y Sheridan, 1998; Kim y Arroyo, 2002; Pastor, et al., 2002).

La VRP postoperativa está asociada con los siguientes factores: presencia preoperativa de la VRP, hemorragia intraocular durante o después de la cirugía, desprendimiento coroidal, crioterapia excesiva, fotocoagulación, cirugías repetitivas, pérdida del vítreo durante el drenaje del fluido subretinal, etc. (Pastor, et al., 2002).

Algunos autores han resaltado la importancia del rompimiento de la barrera hematorretiniana como el primer paso en la patogénesis. Parece obvio que la alteración de esta barrera modifique el ambiente intraocular y permita establecer condiciones favorables para el desarrollo de VRP. Sin embargo, el rompimiento de esta barrera es constante en todos los desprendimientos retinianos y sólo una pequeña proporción desarrolla la VRP; además, la misma barrera se interrumpe en otras patologías (uveítis, retinopatía diabética), y no se ha reportado a la VRP como una complicación de dichas enfermedades (Pastor, et al., 2002).

Otros autores han postulado que, como la VRP se desarrolla en situaciones en las que el vítreo entra en contacto con el EPR después de ocurrido el trauma, el contacto de los componentes vítreos con el EPR desencadenaría una compleja cascada de señales de transducción que podrían marcar el inicio de la enfermedad (Burnside y Bost-Usinger, 1998).

Formación de membranas durante la VRP

La cicatrización de una herida consta de tres fases: inflamación, formación de tejido y remodelación del tejido; y es posible extrapolar estas fases al proceso de formación de membranas que ocurre durante la VRP. En respuesta a factores inflamatorios liberados ante una lesión, células tanto del EPR como de la glia migran hacia ambas superficies de la retina y proliferan. La remodelación de estas membranas conlleva a la contracción, con la resultante tracción de la retina (Kim y Arroyo, 2002). La VRP no es una enfermedad que se desarrolla inmediatamente después de que ha ocurrido un desprendimiento retiniano, ya que las células implicadas necesitan tiempo para desdiferenciarse, migrar, proliferar, sintetizar matriz extracelular y subsecuentemente ejercer contracción (Pastor, et al., 2002).

Las membranas retinales se pueden formar en distintas partes dentro de la cavidad vítrea, de manera epi-, sub-, e intrarretinalmente, y aunque se considera que todas las formas son la misma enfermedad, la mayoría de la información disponible concierne a las membranas epirretinales. Entre los principales componentes celulares que se han identificado como parte de estas membranas se encuentran: células del EPR, macrófagos, células de la glia y fibroblastos. Otras células que se piensa desempeñan un papel secundario incluyen neutrófilos, linfocitos T y B, plaquetas y eritrocitos (Hiscott y Sheridan, 1998; Pastor, et al., 2002).

Por otro lado, se han identificado tres grupos de proteínas en las membranas epirretinales: 1) proteínas estructurales (colágena y elastina), 2) proteínas adhesivas de matriz extracelular (laminina, fibronectina y vitronectina), y 3) proteínas matricelulares (proteínas no estructurales expresadas en tejidos en formación, que incluyen la trombospondina, osteonectina y tenascina) (Pastor, et al., 2002).

Las membranas subretinales han recibido menos atención, aunque también son componentes de las membranas formadas en la VRP. Se presume que se originan exclusivamente a partir de células del EPR, aunque también se han encontrado células gliales (Pastor, et al., 2002).

A continuación se describen los principales tipos celulares involucrados en la formación de las membranas epirretinales.

*Células del EPR. Se considera que las células del EPR son claves en el desarrollo de la VRP, ya que parecen ser cruciales para su establecimiento (Pastor, et al., 2002). Cuando las células del EPR migran y se dividen en respuesta a un evento patológico, su conformación fenotípica cambia drásticamente: al inicio las células se desprenden de su monocapa simple y polarizada, y se aíslan. Estas células son sumamente móviles, y adoptan un fenotipo parecido a los macrófagos o a los

fibroblastos. Conforme las células sufren estos cambios, pueden liberar melanina (Hiscott y Sheridan, 1998).

La interacción entre células del EPR y la matriz extracelular es central en el proceso de la VRP (Kim y Arroyo, 2002). Durante el movimiento de las células, es necesaria la síntesis de una matriz extracelular que permita su migración. Se piensa que las células del EPR pueden sintetizar una matriz extracelular temprana, formada de glicoproteínas (principalmente fibronectina, que induce a las células a adoptar un fenotipo fibroblástico, y trombospondina), a la que posteriormente pueden añadirse otros componentes como colágena y elastina. De hecho, se considera que las células del EPR son las principales productoras de colágeno, además de que también sintetizan laminina, fibronectina y trombospondina (Hiscott y Sheridan, 1998; Kim y Arroyo, 2002; Pastor, et al., 2002). Algunos mecanismos mediante los cuáles estas proteínas pueden influenciar el comportamiento de las células del EPR son: 1) interactuar con receptores a integrinas, 2) interactuar con receptores superficiales diferentes a las integrinas, y 3) servir como almacén de diversos factores de crecimiento, como el TGF- β (Kim y Arroyo, 2002).

Asimismo, se ha sugerido que las fuerzas traccionales de las membranas están generadas por interacciones entre la matriz extracelular y las células individuales. Las asociaciones entre células y matriz dependen de receptores superficiales, entre los que se incluyen a las integrinas. Se han detectado varias integrinas en el EPR tanto in situ como en las membranas epirretinales (Hiscott y Sheridan, 1998).

Las metaloproteinasas de la matriz extracelular, que degradan componentes de la misma, también son importantes, ya que permiten la migración de las células a través de la matriz y también pueden funcionar en la contracción de las membranas (Kim y Arroyo, 2002).

*Macrófagos. De todas las células inflamatorias, se considera a los macrófagos como los más importantes en la VRP. Se piensa que estas células pueden provenir de: 1) la circulación sistémica, y 2) a partir de la transformación de células del EPR. Las funciones principales de los macrófagos son: fagocitar desechos y restos celulares; secretar factores de crecimiento y citocinas, estimulando la proliferación y quimiotaxis de diversas células; y funcionar como células presentadoras de antígenos (Pastor, et al., 2002).

*Células de la glia. Las células de la glia son los componentes celulares más importantes de las membranas no traccionales (Pastor, et al., 2002).

*Fibroblastos. Los fibroblastos/miofibroblastos también son componentes importantes de las membranas epirretinales, y pueden provenir de: células del EPR, hialocitos, células epiteliales vasculares y astrocitos. Presentes en casi todas las membranas maduras, los fibroblastos sintetizan colágena y otros componentes de la matriz extracelular y finalmente desempeñan un papel importante en la contracción (Pastor, et al., 2002).

La VRP y los factores de crecimiento

Tomando en cuenta que la base de la VRP es la proliferación indeseada de células, y que se ha demostrado una elevada concentración de factores de crecimiento en el vítreo y en las membranas epirretinales de ojos que presentan la enfermedad, varios estudios se han enfocado en conocer cuál es el papel de estos factores en el transcurso de la VRP, entre los que destacan el PDGF y el TGF- β (Kim y Arroyo, 2002; Pastor, et al., 2002).

El PDGF actúa como un factor mitogénico y quimiotáctico para fibroblastos y células gliales; y se ha demostrado que las células de EPR producen PDGF y expresan sus receptores (Kim y Arroyo, 2002).

El TGF- β funciona como un potente quimioatrayente de monocitos y fibroblastos, y se ha demostrado que participa de manera importante durante todo el proceso de cicatrización. Las células del EPR, fibroblastos, plaquetas y macrófagos son capaces de secretar TGF- β , además, estudios *in vitro* han demostrado que el TGF- β estimula la síntesis y secreción de fibronectina y la contracción de colágena en células de EPR (Kim y Arroyo, 2002). Específicamente, experimentos con células de EPR en cultivo han demostrado que el TGF- β 2 puede modificar el fenotipo celular y estimular la síntesis de colágena; así como inducir significativamente la producción de la actina α de músculo liso (α -SMA) y la síntesis y secreción de otros factores de crecimiento. El TGF- β 1 puede modificar el fenotipo de las células del EPR a través de cambios en la expresión de α -SMA y de estimular la síntesis de fibronectina, confiriéndole con ello a las células características de miofibroblastos (Pastor, et al., 2002; Saika, et al., 2004; Gamulescu, et al., 2006). En conclusión, se considera al TGF- β como el principal inductor de la transición epitelio-mesénquima que afecta a las células del EPR después de que ha ocurrido un desprendimiento de la retina al controlar procesos de adhesión y migración celular a través de cambios en la expresión de proteínas de matriz extracelular y de fibras de estrés como la α -SMA; todos estos cambios llevan a adoptar a las células del EPR un fenotipo miofibroblástico (Saika, et al., 2004; Gamulescu, et al., 2006).

La finalidad de estudiar los mecanismos involucrados en la VRP es identificar blancos terapéuticos específicos que la detengan. Algunas drogas inhiben la proliferación celular, y la

formación y contracción de las membranas retinales; sin embargo, la mayoría de estas drogas generan efectos colaterales indeseables, y muy pocas se han utilizado en pruebas clínicas. Recientemente se ha centrado la atención en combinar el uso de drogas para actuar en diferentes estadios de la enfermedad (Pastor, et al., 2002).

El factor de crecimiento transformante β

La transducción iniciada por el TGF- β está implicada en el control de varios procesos celulares, entre los que se incluyen: la proliferación (que generalmente inhibe), la diferenciación, la apoptosis, la síntesis de matriz extracelular, la migración, la especificación durante el desarrollo embrionario, etc. (Obata, et al., 1999; Shi y Massagué, 2003).

La superfamilia del TGF- β

La superfamilia del TGF- β consta de una serie de citocinas multifuncionales, que podemos dividir en dos: (1) la subfamilia TGF- β / activina / Nodal, y (2) la subfamilia Proteína de morfogénesis del hueso (BMP) / Factor de diferenciación y de crecimiento (GDF) / Sustancia inhibidora Mülleriana (MIS) (Obata, et al., 1999; Shi y Massagué, 2003).

El ligando activo es un dímero estabilizado mediante interacciones hidrofóbicas, y mediante la formación de un enlace disulfuro entre las subunidades del dímero (Shi y Massagué, 2003). El TGF- β es una de las pocas citocinas que actúa a concentraciones subpicomolares y es capaz de autoinducirse (Huang y Huang, 2005).

Específicamente, los mamíferos expresan tres isoformas del TGF- β (TGF- β 1, - β 2 y - β 3), las cuales están codificadas por genes independientes. Las proteínas maduras comparten del 65-80% de identidad en sus residuos de aminoácidos y, mientras las isoformas TGF- β 1 y - β 3 comparten una idéntica actividad biológica, la isoforma - β 2 difiere (Campochiaro, 1998; Lai, et al., 2000). Las moléculas activas son homodímeros de 25 kDa derivados de precursores inactivos por cortes proteolíticos en el extremo amino terminal de la cadena. En la mayoría de los tejidos, el TGF- β se encuentra en forma latente, por lo que su activación representa un importante mecanismo de control (Campochiaro, 1998).

Receptores del TGF- β

Técnicas de radioligando han permitido identificar tres receptores proteicos membranales que unen al TGF- β con alta afinidad. Estos receptores han sido denominados receptor a TGF- β de tipo I (T β RI, ~55 kDa), de tipo II (T β RII, ~75 kDa), y de tipo III (T β RIII, ~300 kDa); y se encuentran

formando complejos homoméricos y/o heteroméricos en la superficie de las células (Tsuchida, et al., 1993; Blobel, et al., 2001).

Los receptores T β RI y T β RII se caracterizan por formar el complejo activo de señalamiento, ya que tienen actividad de cinasa de residuos de serina y treonina. Están conformados aproximadamente de 500 residuos de aminoácidos, y están organizados en una región extracelular N-terminal de unión al ligando, una región transmembranal, y una región intracelular C-terminal con actividad de cinasa de residuos de serina y treonina (Shi y Massagué, 2003).

El T β RI, denominado también ALK-5 (receptor de activina con actividad de cinasa), contiene una secuencia característica SGSGSG, denominada dominio GS. La activación del receptor de tipo I involucra la fosforilación de este dominio (Shi y Massagué, 2003; Heather y Peng, 2006). Es interesante notar que la actividad cinasa del T β RII se detecta independientemente de su unión con el ligando (Vellucci y Reiss, 1997). El T β RIII es una proteína integral de membrana altamente modificada por grupos glicosaminoglicanos (Wang, et al., 1991). Sus funciones están relacionadas con la unión, presentación y transferencia del TGF- β hacia el T β RII; y con la regulación del señalamiento. Esto es particularmente importante para la isoforma TGF- β 2, que no se puede unir al T β RII de manera independiente (Blobel, et al., 2001). En la mayoría de los linajes celulares, el T β RIII se constituye como el receptor más abundante en la superficie celular, y muestra afinidades equivalentes para todas las isoformas del TGF- β (López-Casillas, et al., 1991; Wang, et al., 1991).

Todos los T β Rs han sido aislados y clonados en el pollo (Nohno, et al., 1993; Barnett, et al., 1994; Lai, et al., 2000), en la rata (López-Casillas, et al., 1991; Wang, et al., 1991; He, et al., 1993; Tsuchida, et al., 1993), y en el humano (Lin, et al., 1992; Moren, et al., 1992; Vellucci y Reiss, 1997) (Tabla 1).

Tabla 1. Características de los T β Rs en el pollo, la rata, y el humano.

Especie	Receptor	Peso Molecular (kDa)	Residuos de Aminoácidos	Referencia en el GenBank
<i>Gallus gallus</i>	T β RI	56.5079	503	NM_204246.1
	T β RII	63.3077	557	NM_205428.1
	T β RIII	93.312	841	NM_204339.1
<i>Rattus norvegicus</i>	T β RI	55.6108	497	NM_012775.2
	T β RII	76.540	567	NM_0.1132.3
	T β RIII	94.1022	853	NM_017256.1
<i>Homo sapiens</i>	T β RI	55.9591	503	NM_004612.2
	T β RII	67.4563	592	NM_001024847.1
	T β RIII	93.4985	851	NM_003243.2

Transducción de la señal y proteínas Smad

En la ausencia del ligando, los receptores de tipo I y tipo II existen predominantemente como homodímeros en la superficie celular. La transducción se inicia cuando el TGF- β se une a sus receptores, actuando como un factor de ensamblaje que permite la interacción entre dos receptores de tipo I y dos receptores de tipo II. Este arreglo hetero-tetramérico permite al receptor de tipo II transfosforilar el dominio GS del receptor de tipo I, que entonces propaga la señal a través de la subsecuente fosforilación de las proteínas Smad. Las proteínas Smad activas forman oligómeros entre sí y con una Smad co-mediadora, y después se translocan al núcleo para regular la expresión génica (Massagué, 2000; Derynck y Zhang, 2003; Shi y Massagué, 2003; de Caestecker, 2004).

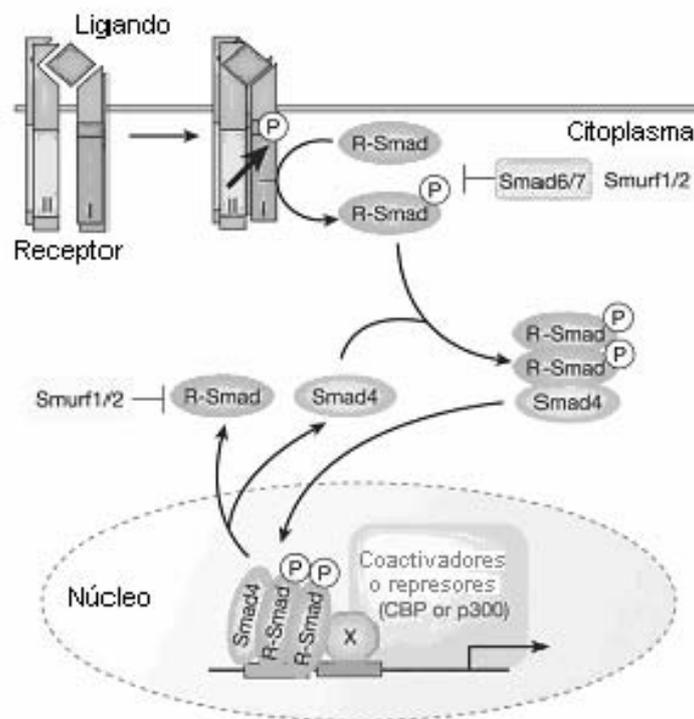


Figura 5. Mecanismo general de transducción de señales a través de los receptores a TGF- β y de las proteínas Smad. Modificado de Derynck y Zhang, 2003.

El modelo propuesto por Blobe, et al. (2001) incluye la participación del T β RIII durante el señalamiento. Cuando el TGF- β se une al T β RIII, este receptor presenta el ligando de manera preferencial a receptores de tipo II activados, es decir, a T β RIIs autofosforilados en su dominio citoplásmico. El complejo formado por TGF- β /T β RII/T β RIII recluta al receptor de tipo I. El T β RII transfosforila y activa al T β RI, y también transfosforila el dominio citoplasmático del T β RIII, liberándolo así del complejo activo de señalamiento.

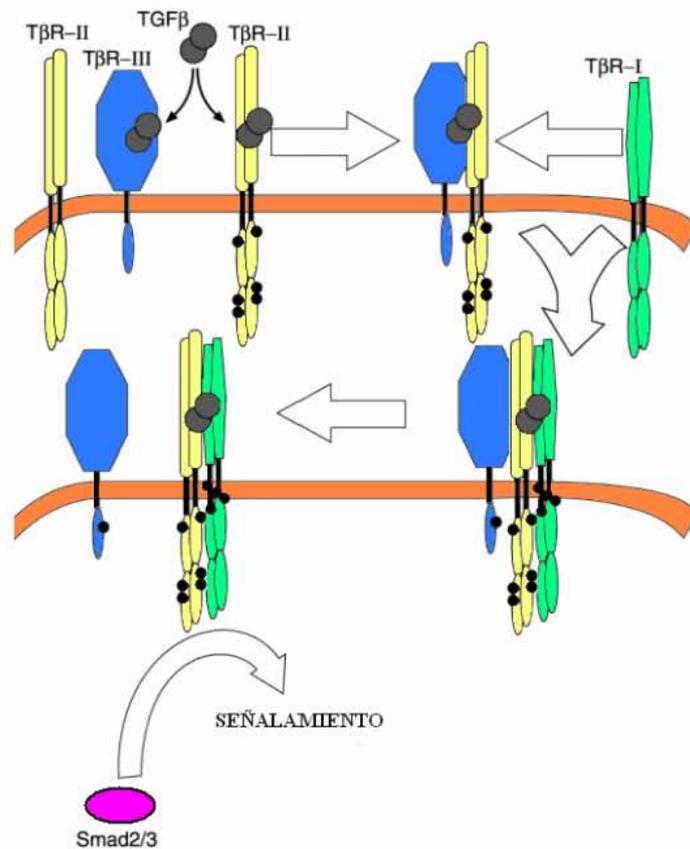


Figura 6. Esquema que representa la participación del TβRIII durante el señalamiento. Modificado de Blobel, et al. 2001.

Existen 8 proteínas Smad diferentes, que constituyen 3 clases funcionales:

1) R-Smads (Smads reguladas por receptor). Las R-Smads (Smad 1, 2, 3, 5 y 8) son directamente fosforiladas por el receptor de tipo I, y una vez activadas forman complejos heteroméricos con la Co-Smad. Las Smads 2 y 3 responden al señalamiento de la subfamilia del TGF-β, y las Smads 1, 5 y 8 lo hacen principalmente al señalamiento activado por la subfamilia de las BMPs (Shi y Massagué, 2003).

Las R-Smads contienen un motivo SSXS en su dominio C-terminal, cuya fosforilación conlleva a su activación (Shi y Massagué, 2003). La región cinasa del TβRI conocida como Loop 45 es la encargada de contactar a la R-Smad, determinando con ello la especificidad de la interacción (Heather y Peng, 2006). Las R-Smads fosforiladas son capaces de liberarse de su anclaje citoplásmico, exponer su señal de importación al núcleo, y aumentar su afinidad de unión por la Co-Smad (Massagué, 2000).

2) Co-Smad (Smad co-mediadora). Esta proteína está representada por la Smad 4. Los complejos activos de R-Smad/Co-Smad se translocan al núcleo y, en conjunto con otros cofactores nucleares, regulan la expresión de genes específicos (Shi y Massagué, 2003).

3) I-Smads (Smads inhibitoras). Estas Smads (Smad 6 y 7) regulan de manera negativa la transducción: compiten con las R-Smads tanto por los sitios de fosforilación en los receptores como por los sitios de unión con la Smad 4, además de marcar a los receptores para su degradación (Shi y Massagué, 2003).

En estado basal, las R-Smads se localizan de manera predominante en el citoplasma, mientras que las I-Smads tienden a ser nucleares. Smad 4 se distribuye tanto en el citoplasma como en el núcleo (Shi y Massagué, 2003).

Las R-Smads y la Co-Smad contienen dos dominios estructuralmente conservados: el dominio N-terminal MH1 y el dominio C-terminal MH2 (Shi y Massagué, 2003). Las I-Smads no cuentan con un dominio MH1, pero sí con un dominio MH2 (Dernyck y Zhang, 2003).

El dominio MH1 exhibe actividad específica de unión a DNA, regula negativamente al dominio MH2, y está involucrado en el importe de las proteínas al núcleo mediante un motivo conservado (KKLKK), que se piensa actúa como una señal de localización nuclear. El dominio MH2 es responsable de la interacción proteína-receptor, de la formación de complejos homoméricos o heteroméricos entre las Smads, y está involucrado directamente en el transporte nucleocitoplásmico, mediante su unión a nucleoporinas. Ambos dominios interactúan con un gran número de proteínas en el núcleo para efectuar la transcripción (Shi y Massagué, 2003).

Los dominios MH1 y MH2 están unidos por secuencias que, aunque difieren entre las Smads, contienen múltiples sitios de fosforilación por proteínas como: la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), la proteína cinasa C (PKC) y la proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII), que permiten la intercomunicación con otras vías de transducción; así como un motivo PY, que media la interacción con las Smurfs (factor regulador de la ubiquitinación de Smad) (Shi y Massagué, 2003).

Aunque existen pocos receptores y Smads con respecto a la gran variedad de ligandos, existe una gran versatilidad en el señalamiento. Las combinaciones entre los receptores de tipo I y tipo II, la formación de complejos oligoméricos entre las Smads, y los diversos factores de transcripción con los que las Smads cooperan permiten una diversidad substancial en el señalamiento (Dernyck y Zhang, 2003).

El papel de las proteínas accesorias

El acceso de los ligandos a sus receptores está controlado por dos clases de moléculas, cuyas funciones son opuestas:

-La primera clase comprende un diverso grupo de proteínas solubles que atrapan a los ligandos, impidiendo su unión con los receptores. Éstas incluyen a la proteína de latencia asociada

(LAP), un polipéptido permanece unido de manera no covalente al dominio bioactivo de la proteína; al proteoglicano denominado decorina; y a la α 2-macroglobulina, que se unen al TGF- β libre. Otras moléculas incluyen a la folistatina, que se une a las activinas y a las BMPs, y a las proteínas Noggin, Chordin/SOG y DAN/Cerberus, cuyos miembros también unen BMPs (Shi y Massagué, 2003).

-La segunda clase de moléculas incluye a proteínas membranales que actúan como receptores accesorios, o co-receptores, promoviendo la unión del ligando a sus respectivos receptores. En esta categoría podemos incluir al T β RIII o β -glicano, que facilita la unión del TGF- β a su receptor de tipo II, aumentando con ello el señalamiento (Shi y Massagué, 2003; Abe, et al., 2004).

Los complejos formados por los receptores son puntos nodales para la asociación de múltiples proteínas que regulan la función del receptor, su tráfico y el señalamiento dependiente o independiente de Smads (Dernyck y Zhang, 2003).

El reconocimiento de las R-Smads por los receptores puede estar facilitado por proteínas accesorias. Por ejemplo, Smad 2 y 3 pueden ser inmovilizadas cerca de la membrana celular mediante la proteína SARA (anclaje de Smad para la activación del receptor). Otras proteínas que facilitan la transmisión de la señal vía Smads son Hgs, Disabled 2, axina y la β -espectrina ELF (Shi y Massagué, 2003).

A nivel de la membrana plasmática, los receptores a TGF- β son internalizados a través de dos vías endocíticas: 1) mediante vesículas de clatrina, en la cual los receptores son dirigidos hacia endosomas tempranos en donde interactúan con diversas proteínas (Smad 2, SARA, Disabled 2) para transmitir la señal de manera eficiente y posteriormente ser reciclados a la membrana plasmática; y 2) mediante vesículas de caveolina, en donde los receptores se asocian con el complejo Smad 7-Smurf 2, lo que lleva a su ubiquitinación y posterior degradación (Dernyck y Zhang, 2003; de Caestecker, 2004; Le Roy y Wrana, 2005). Por ello, interacciones múltiples de proteínas controlan la localización subcelular de los receptores y su disponibilidad en la superficie, parámetros que pueden controlar la duración y la respuesta ante la estimulación (Dernyck y Zhang, 2003).

Las proteínas del citoesqueleto también desempeñan un papel importante en la localización de las Smads. Por ejemplo, las Smad 2 y 3 desfosforiladas se unen a microtúbulos, y el tratamiento con TGF- β induce su disociación. Las Smads también pueden interactuar con la filamina, un andamio para proteínas de señalamiento intercelular. El TGF- β induce la fosforilación de ELF y su asociación con las Smad 3 y 4, la pérdida de esta proteína implica también la pérdida de la transducción de la señal (Dernyck y Zhang, 2003).

Regulación de la transcripción por las Smads

Los receptores a TGF- β se mantienen activos al menos 3-4 horas después de la unión del ligando, lo que mantiene a las Smads en el núcleo, en donde regulan la expresión génica. La estimulación celular con TGF- β conlleva a la activación o a la inhibición de la transcripción de cientos de genes, y la respuesta depende del tipo celular y de las condiciones que afectan a la célula en el momento de la estimulación (Dernyck y Zhang, 2003; Shi y Massagué, 2003).

Después de ser fosforiladas, las R-Smads se disocian del receptor tipo I, presumiblemente mediante cambios conformacionales que a su vez favorecen la formación de complejos oligoméricos con otras Smads. Las Smads fosforiladas pueden formar heterotrímeros compuestos de dos R-Smads y una Smad 4, o heterodímeros formados por una R-Smad y una Smad 4, que posteriormente se translocan al núcleo. En el núcleo, las R-Smads son constantemente desfosforiladas, lo que resulta en la disociación del complejo y la exportación de las Smads inactivas al citoplasma. El número de factores de transcripción con los que pueden interactuar las Smads es impresionante, y éstos están frecuentemente regulados por múltiples vías de señalamiento (Dernyck y Zhang, 2003).

El complejo R-Smad–Smad 4 coopera con factores de transcripción secuencia-específicos (X) que se unen con gran afinidad a secuencias de DNA conocidas, y también se une, aunque con menor afinidad, al elemento de unión a las Smads, activando la transcripción (Dernyck y Zhang, 2003).

Las Smads cooperan entre ellas, y con otras proteínas, para efectuar una transcripción específica. Por ejemplo, las Smads cooperan con los coactivadores transcripcionales CBP (proteína de unión a CREB)/p300, ARC105 (cofactor activador de reclutamiento de 105 kDa), MSG1 (gen específico de melanocitos) y SMIF (coactivador transcripcional de interacción con Smad 4); y con los co-represores c-Ski/SnoN, c-Myc, EVI1 (factor codificado por el sitio 1 ecotrópico de integración viral), ATF3 (factor de transcripción activador 3), TGIF (factor de interacción con el TGF- β), SNIP1 (proteína nuclear 1 de interacción con Smad), SIP (proteína nuclear 1 inducible por la proteína 53 relacionada a la transformación) y Tob (transductor del receptor de estrógeno β) (Dernyck y Zhang, 2003; Shi y Massagué, 2003).

*TGF- β y apoptosis celular. Existen varios mecanismos a través de los cuales el TGF- β induce una respuesta apoptótica en la célula: 1) el T β RII interactúa con la proteína pro-apoptótica Daxx, la cual activa a la cinasa N-terminal Jun (JNK), induciendo apoptosis en células epiteliales y hepatocitos; 2) tanto los receptores a TGF- β como los receptores a BMPs activan a TAK1 (cinasa 1 activada por TGF- β), que a su vez es capaz de activar a las MAPKs-cinasa-cinasa (MKK) 3, 4 o 7. Estas cinasas conllevan a la activación de JNK o p38, las cuales conducen a la apoptosis de varios tipos celulares; 3) a través de las Smads, el TGF- β induce la expresión de genes que codifican

proteínas pro-apoptóticas como DAPK (proteína cinasa asociada a muerte), SHIP (fosfatasa de fosfolípidos) y TIEG1 (gen temprano inmediato inducido por el TGF- β); y 4) las Smads también inactivan a la cinasa de supervivencia Akt (Moustakas y Heldin, 2005).

*TGF- β e inhibición de la proliferación. El TGF- β inhibe la proliferación de la mayoría de los tipos celulares, incluyendo células epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas y fibroblastos embrionarios; sin embargo hay que mencionar que estimula la proliferación de ciertas células mesénquimas y de otros tipos celulares (Huang y Huang, 2005).

El TGF- β es capaz de activar a proteínas inhibitoras del ciclo celular como p15, p21 y p57, así como de reprimir la expresión de c-Myc (que codifica un potente activador transcripcional de genes requeridos para la proliferación) y de los factores de diferenciación Id1, Id2 e Id3 (Shi y Massagué, 2003; Moustakas y Heldin, 2005). El TGF- β también inhibe la diferenciación de miofiblastos, osteoblastos y adipocitos a través de la represión funcional de factores de transcripción claves que conducen a este proceso (Dernyck y Zhang, 2003).

El TGF- β también puede activar a RhoA, que a su vez activa a la cinasa 1 de Rho (Rock1), lo que resulta en la fosforilación, y consecuente inactivación de la fosfatasa Cdc25 en células epiteliales. Cdc25 se encarga de desfosforilar a cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), promoviendo con ello la progresión del ciclo celular. Su inactivación contribuye al arresto del ciclo celular en la fase G1 (Moustakas y Heldin, 2005).

Es interesante mencionar que Huang y Huang (2005) han propuesto un modelo en el cual, cuando la tasa de unión del TGF- β a los receptores T β RII y T β RI es mayor a 1 (el TGF- β se une de manera dominante al T β RII), se prefiere la vía de internalización a través de clatrina; y cuando la tasa de unión del TGF- β a los receptores T β RII y T β RI es menor a 1 (el TGF- β se une de forma dominante a T β RI), el complejo se internaliza a través de endocitosis mediada por caveolina. En células (por ejemplo epiteliales y endoteliales) que presentan una tasa de unión al TGF- β menor de 1, este ligando actúa como un antiproliferativo; por el contrario, en células (mesénquimas) que presentan una tasa de unión al TGF- β mayor de 1, el TGF- β actúa como un factor mitogénico. Entonces la respuesta celular al TGF- β puede ser potenciada o atenuada al modificar la expresión de los receptores de tipo I, de tipo II y de tipo III.

*TGF- β y cáncer. Se ha reportado que en varios tipos de cáncer las células han adquirido resistencia a los efectos antiproliferativos del TGF- β . Esta pérdida en la actividad antitumoral se atribuye a la interrupción en alguno de los componentes de la vía de señalamiento del TGF- β , entre

los que se incluyen a los T β Rs, a las proteínas Smads, y al mismo TGF- β (Bae, et al., 1995; Heather y Peng, 2006; Yamamoto, et al., 2006).

En un estadio temprano de la enfermedad el TGF- β actúa como un agente antitumoral; sin embargo, conforme progresa la formación del tumor el TGF- β contribuye a la oncogénesis (Heather y Peng, 2006). En lo que respecta a la relación entre el cáncer y los T β Rs, se pueden mencionar los siguientes ejemplos: la falta de actividad del T β RI se asocia con cáncer de próstata, de seno, pancreático, gástrico, renal, y con leucemia linfocítica crónica (Vellucci y Reiss, 1997; Kim, et al., 2000; Heather y Peng, 2006). La pérdida en la expresión del T β RII ha sido reportada en la carcinogénesis de colon, estómago, páncreas, hígado, seno, corteza suprarrenal, y tumores neuroectodérmicos primitivos (Hahm, et al., 1999; Yamamoto, et al., 2006), mientras que la pérdida de la expresión del T β RIII está implicada en el cáncer de ovario, de próstata, de páncreas, de seno, y renal (Sun y Chen, 1997; Venkatasubbarao, et al., 2000; Copland, et al., 2003; Dong, et al., 2007; Hempel, et al., 2007; Sharifi, et al., 2007; Turley, et al., 2007).

La vía de Ras-MEK-ERK merece una mención especial, ya que durante el control normal de la proliferación el efecto antimitogénico del TGF- β es dominante sobre el efecto de factores mitogénicos que señalizan a través de Ras. Sin embargo, la hiperactividad de Ras puede contrarrestar el efecto antiproliferativo del TGF- β al ocasionar que disminuya la expresión de los T β Rs, al atenuar la acumulación de las Smads en el núcleo, y al aumentar el nivel de expresión del co-represor TGIF (Massagué, 2000).

*TGF- β y transición epitelio-mesénquima. Las respuestas morfogénicas al TGF- β incluyen la migración celular y la transición epitelio-mesénquima (EMT), las cuales son cruciales durante la embriogénesis y para el establecimiento de enfermedades fibróticas y de carcinomas. Durante las EMTs el epitelio polarizado de las células cambia, ya que: a) se rompe la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular; b) la matriz extracelular se degrada; y c) cambia el fenotipo celular debido al rearrreglo del citoesqueleto de actina (Moustakas y Heldin, 2005).

Las Smads regulan genes como Snail, cuya proteína actúa como represor génico de la E-cadherina, conllevando a la disolución de las uniones adherentes. Por otro lado, los receptores a TGF- β se asocian de manera constitutiva con la proteína de polaridad Par6. Después de la unión del ligando, el receptor de tipo II fosforila a Par6, que entonces recluta a Smurf1. Smurf1 ubiquitina a RhoA, marcándola para su degradación y consecuentemente, se pierden las uniones estrechas (Moustakas y Heldin, 2005).

Por último, Smad 3 y 4 cooperan con el señalamiento de RhoA y p38 para conducir a la expresión de NET1 (gen transformador de células neuroepiteliales) y tropomiosinas,

respectivamente, que son importantes en el establecimiento a largo plazo de fibras de estrés de actina (Moustakas y Heldin, 2005).

Mecanismos para finalizar la transducción por TGF- β

-La inmunofilina FKBP12 inhibe el señalamiento al unirse a las regiones GS desfosforiladas del receptor tipo I (Shi y Massagué, 2003).

-La desfosforilación, así como la ubiquitinación y degradación mediada por proteosomas de las R-Smads activas son dos mecanismos para terminar la señal (Shi y Massagué, 2003). Dos proteínas pertenecientes a la familia de las ubiquitina ligasas E3, Smurf 1 y Smurf 2, antagonizan el señalamiento del TGF- β al interactuar con las R-Smads y marcarlas para su degradación. Smurf 1 interactúa con las Smads 1 y 5, afectando las respuestas inducidas por BMP; mientras que Smurf 2 interactúa con diferentes R-Smads, permitiendo la interferencia en el señalamiento de BMP, TGF- β y activinas (Dernyck y Zhang, 2003).

-Smad 7 se une a los receptores activos en competencia con las R-Smads. Además, la Smad 7 conlleva a la ubiquitinación y degradación de los receptores con la ayuda de las Smurfs (Shi y Massagué, 2003).

-Entre los reguladores negativos de la función transcripcional de las Smads, c-Ski y SnoN antagonizan la transducción por TGF- β a través de su interacción directa con Smad 4 y las R-Smads. Por ejemplo, Ski compete con las R-Smads por el sitio de unión a la Smad 4, interrumpiendo la formación de un complejo funcional (Shi y Massagué, 2003).

-Las citocinas pro-inflamatorias interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), cuya transducción se realiza vía STAT (transductor de señales y activador de la transcripción) y NF- κ B (Factor Nuclear κ B), respectivamente, activan la expresión de la Smad 7, lo que conlleva a la inhibición de la señal del TGF- β (Shi y Massagué, 2003).

-Varias proteínas con dominios WD-40 se pueden asociar con los receptores a TGF- β . Por ejemplo, la proteína de interacción con el receptor de TGF- β (TRIP-1) interactúa con los T β RIIs unidos a su ligando y es fosforilada por éste. Niveles crecientes de TRIP-1 fosforilada reprimen la transcripción inducida por TGF- β . Por otro lado, la proteína asociada al receptor con actividad de cinasa de residuos de serina y treonina (STRAP) se puede asociar con los receptores a TGF- β tanto de tipo I como de tipo II, y con las Smads 2, 3 y 7. STRAP estabiliza la asociación de Smad 7 con el receptor, e inhibe la transcripción al interferir con la unión de Smad 2 y 3 a su receptor (Dernyck y Zhang, 2003).

Interacción del TGF- β con otras vías

Otras vías de señalamiento ayudan a definir la respuesta mediada por el TGF- β , y es aparente que las proteínas relacionadas con el TGF- β no sólo activan a las Smads, sino que también lo hacen con componentes de otras vías (Dernyck y Zhang, 2003). Se reconocen tres mecanismos a través de los cuales diversas proteínas involucradas en la transducción de señales, e independientes de las Smads, contribuyen a mediar las respuestas fisiológicas del TGF- β : 1) algunas proteínas modifican (fosforilan) a las Smads, modulando la actividad de sus principales efectores; 2) las Smads interactúan y modulan a su vez la actividad de otras proteínas de señalamiento (quinasas), transmitiendo la señal a otras vías; y 3) los receptores a TGF- β son capaces de fosforilar a proteínas diferentes a las Smads, iniciando un señalamiento paralelo que coopera con esta vía (Moustakas y Heldin, 2005).

*Vías que regulan la respuesta mediada por el TGF- β

-Se ha demostrado que la activación de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), como consecuencia de la activación de Ras, deriva en la fosforilación de las Smads 1, 2, y 3, lo que disminuye su acumulación en el núcleo, alterando con ello la transcripción dependiente de Smads (Dernyck y Zhang, 2003; Shi y Massagué, 2003).

-La vía JNK tiene efectos positivos en la función de las Smads, ya que JNK fosforila a Smad 3, aumentando su translocación nuclear y la transcripción (Dernyck y Zhang, 2003; Shi y Massagué, 2003).

-Similar al efecto de ERK, la CaMKII inhibe el señalamiento del TGF- β a través de la fosforilación de las Smads 2, 3 y 4, afectando su heteromerización e inhibiendo su importe nuclear y por tanto la transcripción (Dernyck y Zhang, 2003; Shi y Massagué, 2003).

-Se ha visto que la activación de MEKK1 (MAPK cinasa) aumenta la fosforilación de Smad 2, su heteromerización con Smad 4, su translocación al núcleo y su actividad transcripcional (Dernyck y Zhang, 2003).

-La proteína cinasa C (PKC) fosforila el dominio MH1 de las Smads 2 y 3, lo que impide la unión de Smad 3 con el DNA (Dernyck y Zhang, 2003).

-Las Smads también se pueden unir al corepresor transcripcional TGIF. La regulación de TGIF se lleva a cabo mediante la vía Ras-MEK-MAPK. Los factores de crecimiento que activan a Ras causan la fosforilación de TGIF, lo que favorece la formación del complejo TGIF-Smad 2 (Shi y Massagué, 2003).

*Vías independientes de Smad activadas por el TGF- β

Además de mediar la transcripción a través de las Smads, el TGF- β activa otras vías de señalamiento, algunas de estas vías regulan la activación de las Smads, pero otras pueden inducir respuestas no relacionadas con la transcripción (Dernyck y Zhang, 2003).

-El TGF- β puede activar las vías de ERK, JNK y p38 de forma independiente a las Smads, mediante la activación de Ras, TAK1 y MEKK1. TAK1 puede fosforilar y activar a la cinasa I κ B (Inhibidor de NF- κ B), estimulando con ello el señalamiento de NF κ B (Dernyck y Zhang, 2003).

-Smad 6 puede unirse a TAK1, disminuyendo su actividad; mientras que Smad 7 puede aumentar y mantener la activación de JNK (Dernyck y Zhang, 2003).

-Dependiendo de la línea celular, el TGF- β puede activar GTPasas como RhoA, RhoB, Rac y Cdc42. Rac y Cdc42 regulan la activación de JNK y p38; mientras que Rho, Rac y Cdc42 afectan la organización del citoesqueleto (Dernyck y Zhang, 2003).

-El TGF- β también puede activar a la fosfatidilinositol 3'-cinasa (PI3K), mediante la fosforilación de su efector Akt. La inhibición de PI3K reduce la fosforilación de Smad 2 y la transcripción inducida por el TGF- β (Dernyck y Zhang, 2003).

-El TGF- β puede actuar a través de la fosfatasa 2A, aumentando su activación, lo que conlleva a la desfosforilación de p70S6K, una proteína clave en la progresión del ciclo celular (Dernyck y Zhang, 2003).

Expresión del TGF- β y de sus receptores en el ojo

*TGF- β . En el tejido ocular el TGF- β participa principalmente en procesos de migración y de proliferación celular (Saika, 2006). Estudios previos realizados en ojos de mono (*Macaca mulatta*) han demostrado que de las tres isoformas del TGF- β presentes en mamíferos, el TGF- β 2 es la isoforma predominante en el polo posterior del ojo (retina, vítreo y complejo EPR-coroides). La isoforma TGF- β 1 también se expresa, pero en mucho menor cantidad. In vivo, el TGF- β 2 es producido principalmente por el EPR, el epitelio ciliar y el epitelio de la lente; mientras que la coroides, con su combinación de células endoteliales, pericitos, melanocitos y fibroblastos es la fuente principal de TGF- β 1. En este contexto, la evidencia apoya la posibilidad de que el EPR o los fotorreceptores sean una fuente de TGF- β 2, un blanco para esta molécula, o ambas cosas (Pfeffer, et al., 1994; Saika, 2006).

Otros estudios inmunohistoquímicos han localizado al TGF- β 1 en el endotelio coroidal, segmentos externos de los fotorreceptores y células de Müller. El TGF- β 2 ha sido localizado en el estroma de la coroides, EPR, segmentos externos de los fotorreceptores y hialocitos. El TGF- β 3 se ha

encontrado en los segmentos internos de los fotorreceptores, células de Müller, células ganglionares y hialocitos (Campochiaro, 1998).

Se ha propuesto al TGF- β 2 como la isoforma de mayor importancia en los tejidos oculares, ya que la falta de TGF- β 2, pero no de TGF- β 1 ó - β 3, perturba el desarrollo embrionario en ojos de ratón (Saika, 2006).

Se sabe que el TGF- β influencia la proliferación y diferenciación de varios tipos de células epiteliales, entre las que se incluye al EPR. Por ello, variaciones de la concentración de TGF- β en el polo posterior del ojo pueden contribuir con la función normal visual, pero también estar implicados en la patogénesis de enfermedades fibróticas asociadas a la reparación de tejidos, que impiden la visión y la homeóstasis del tejido ocular. Por ejemplo, se ha demostrado que en ojos humanos afectados por la VRP la concentración del TGF- β 2 en el vítreo es mayor que en los ojos sanos. La importancia del dato de la concentración elevada radica en su correlación con la severidad de la VRP (Pfeffer, et al., 1994; Obata, et al., 1999; Saika, 2006).

*Receptores de TGF- β . En un estudio realizado en ojos de rata, los siguientes tejidos expresan receptores a TGF- β a nivel de proteína: córnea, cuerpo ciliar, iris, lente, retina, EPR y células vasculares. Específicamente, T β RI se expresa en la córnea, cuerpo ciliar, iris, lente, retina (excluyendo a los segmentos externos de los fotorreceptores), EPR y células vasculares. Además de los tejidos mencionados en relación al T β RI, el T β RII se expresa también en los segmentos externos de los fotorreceptores (Obata, et al., 1999).

El Glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el Sistema Nervioso Central (SNC). Este aminoácido desempeña múltiples funciones, que incluyen la transmisión sináptica, a través de la despolarización de la membrana celular; el desarrollo del SNC, como estímulo quimiotáctico que inicia la migración; la adquisición y almacenamiento de nueva información (aprendizaje); la sobrevivencia neuronal; y la sinaptogénesis, ya que modula el crecimiento axonal y la formación de sinapsis (Michaelis, 1998).

El glutamato también puede funcionar como un agente excitotóxico cuando su concentración extracelular es elevada, por lo que ha sido relacionado con una variedad de enfermedades neurodegenerativas (Michaelis, 1998).

Receptores de Glutamato

Estudios previos han revelado una gran complejidad en la estructura de los receptores a glutamato, que va a la par con la variedad de vías de transducción de señales que se activan con la estimulación de estos receptores. Éstas incluyen la activación o inhibición de enzimas; la liberación o inhibición de segundos mensajeros (IP₃, diacilglicerol (DAG), cAMP, Ca²⁺, especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno); y la formación y liberación de mensajeros trans-celulares como el óxido nítrico (NO) y el ácido araquidónico. Las vías de transducción intra o intercelulares activadas por el glutamato pueden conducir, finalmente a cambios en la regulación de la expresión génica (Lerea, 1997; Michaelis, 1998).

El glutamato actúa a través de receptores ionotrópicos (canales iónicos regulados por ligando) y metabotrópicos (receptores acoplados a proteínas G) (Michaelis, 1998; Kew y Kemp, 2005).

*Receptores ionotrópicos

Los receptores ionotrópicos a glutamato (iGluRs) son canales catiónicos encargados de transmitir las respuestas excitadoras en la mayoría de las sinapsis del SNC, ya que su activación produce un cambio en el potencial de membrana de la célula postsináptica (Mayer, 2005).

Existen tres tipos principales de iGluRs, que han sido nombrados de acuerdo a los agonistas que originalmente los activaron de manera selectiva (Michaelis, 1998; Kew y Kemp, 2005): 1) AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropiónico), 2) Kainato (2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina), y 3) NMDA (N-metil-D-aspartato).

Las subunidades de los iGluRs poseen: un dominio extracelular N-terminal bi-lobulado; dos dominios, también extracelulares, de unión al ligando designados como D1 y D2; un canal iónico formado por tres segmentos transmembranales (dominios M1, M3 y M4); un poro (dominio M2, que no atraviesa totalmente la membrana, sino que forma un asa re-entrante al citoplasma); y un dominio intracelular C-terminal de tamaño variable e importante en la regulación del receptor (Kew y Kemp, 2005; Mayer, 2005).

Es interesante notar que los iGluRs presentan agonismo parcial, y se han propuesto dos modelos para explicar este comportamiento: 1) en el modelo de transición concertada, los agonistas poseen diferentes afinidades por el receptor dependiendo si éste está en su conformación activa o de reposo; y 2) el modelo adaptativo sugiere que los receptores pueden existir en múltiples estados conformacionales, y que los ligandos que mejor se acoplen a ellos serán los que produzcan la mayor activación. La estructura cristalográfica de los iGluRs indica que los dos modelos están involucrados en la activación parcial de los receptores (Mayer, 2005).

Finalmente podemos mencionar que los iGluRs se asocian a un gran número de proteínas citoplasmáticas y citoesqueléticas a través de dominios PDZ. La evidencia indica que estas proteínas modulan la función de los receptores (Mayer, 2005).

Receptores AMPA. Los receptores AMPA forman una familia de cuatro subunidades (GluR1-4), producto de genes diferentes (Michaelis, 1998). Los receptores funcionales están formados por tetrámeros (Kew y Kemp, 2005). La mayoría de los receptores AMPA son impermeables al Ca^{2+} , aunque algunos receptores identificados en hipocampo, células bipolares de la retina, células no piramidales de la corteza cerebral, y células de Bergmann en el cerebelo, forman canales iónicos permeables al Ca^{2+} . La subunidad GluR2 es clave para determinar la permeabilidad de los receptores al Ca^{2+} , ya que su presencia confiere al receptor impermeabilidad a este catión (Michaelis, 1998; Kew y Kemp, 2005).

Existen variantes de todas las subunidades que forman los receptores AMPA, debido al empalme alternativo de secuencias exónicas, denominadas formas “flip” y “flop”. Estas formas alternativas se expresan diferencialmente durante el desarrollo embrionario: las variantes flip se expresan principalmente en las neuronas prenatales, mientras que las variantes flop aparecen en el período postnatal de maduración (Michaelis, 1998; Kew y Kemp, 2005).

Receptores Kainato. Las subunidades que forman los receptores Kainato (KA) se clasifican en dos subfamilias: 1) GluR5-7, y 2) KA-1 y KA-2. Los receptores nativos se presentan en combinaciones tetraméricas, que pueden ser homoméricas y heteroméricas. Las subunidades KA-1 y KA-2 no forman receptores homoméricos funcionales (Kew y Kemp, 2005).

De manera similar a la subunidad GluR2, las características de la subunidad GluR6 le confieren a los receptores que la contengan impermeabilidad a cationes divalentes (Michaelis, 1998).

Los receptores AMPA y KA funcionan para una neurotransmisión excitadora rápida, ya que se activan (1-4 mseg) y se desensibilizan rápidamente (2-14 mseg). Los canales formados por los receptores son principalmente permeables a Na^+ y K^+ , y generalmente, exhiben baja conductancia (Michaelis, 1998).

Receptores NMDA. En comparación con los receptores AMPA/KA, los receptores de NMDA responden al glutamato de manera más lenta, y se caracterizan por su lenta desensibilización, alta conductancia y alta permeabilidad al Ca^{2+} . Se piensa que la respuesta lenta de estos receptores se debe a que están tónicamente inhibidos por el Mg^{2+} presente en el ambiente extracelular de las neuronas. La completa activación de estos receptores requiere eliminar el bloqueo por Mg^{2+} . Como

esta inhibición es dependiente de voltaje, entonces la rápida activación de los receptores AMPA/KA, que conllevan a una despolarización de la membrana, disminuyen el efecto inhibitorio del Mg^{2+} permitiendo la activación de los receptores NMDA (Michaelis, 1998).

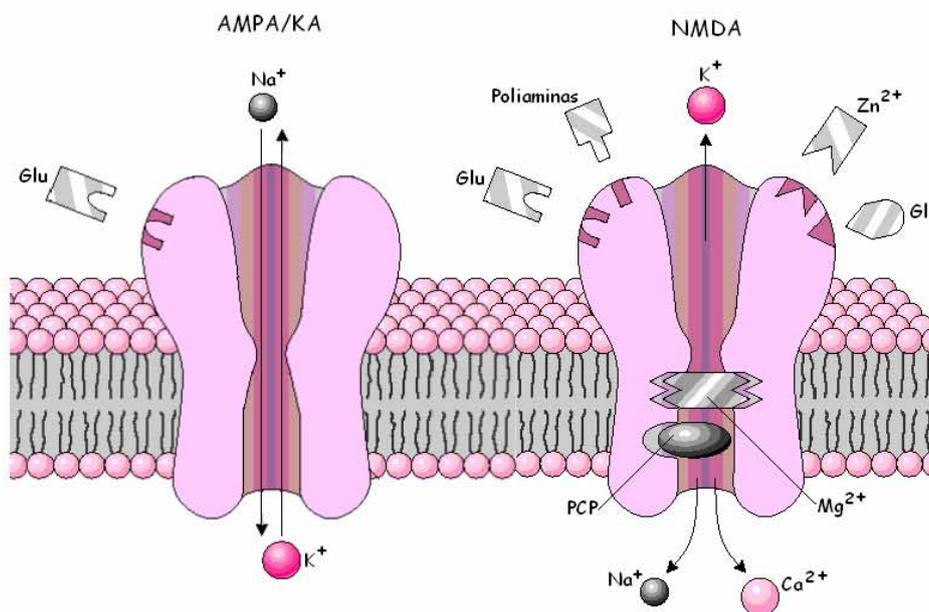


Figura 7. Esquema que representa a los receptores de tipo ionotrópico. Los receptores de AMPA/KA son permeables principalmente al Na^+ , mientras que los receptores de NMDA son permeables principalmente al Ca^{2+} . Glu, glutamato; Gli, glicina; PCP, fenciclidina. Modificado de Kandel, et al., 2000.

Los receptores de tipo NMDA componen una familia de siete subunidades: NR1 (de las cuales se han identificado 8 variantes funcionales NR1a-h y una no funcional, codificadas por un mismo gene), NR2A-D y NR3A y B, todos producto de genes separados (Kew y Kemp, 2005). La composición de los receptores NMDA no se conoce con precisión, sin embargo, se ha propuesto que in vivo dichos receptores son heterómeros que incluyen dos subunidades NR1, que forman el canal, y una o más subunidades NR2 y/o NR3 que modulan su actividad (Lee-Rivera y López-Colomé, 2005).

La subunidad NR1 se expresa de forma generalizada en las diferentes regiones del SNC, mientras que las subunidades NR2 y NR3 se expresan de forma diferencial en las diferentes áreas del sistema nervioso y en los diferentes períodos del desarrollo embrionario. Por ejemplo, NR2A se ha identificado en la corteza cerebral, hipocampo, corteza cerebelar, bulbo olfatorio y tubérculo. NR2B se expresa en el telencéfalo y, a bajos niveles, en el diencefalo y tallo cerebral. NR2C se expresa principalmente en la corteza cerebelar y en la retina, mientras que NR2D se expresa en el diencefalo y tallo cerebral, siendo prominente su expresión en el desarrollo temprano (Michaelis, 1998; Kew y

Kemp, 2005). Por último, mientras que la subunidad NR3A se expresa de forma generalizada en el SNC, la expresión en el adulto de la subunidad NR3B está restringida a las motoneuronas somáticas del tallo cerebral y la espina dorsal (Kew y Kemp, 2005; Lee-Rivera y López-Colomé, 2005).

En la corteza cerebral e hipocampo los receptores NMDA se localizan tanto en el soma como en las dendritas. En la médula espinal, núcleo acumbens y corteza visual se ubican en las terminales presinápticas, de las cuales se libera el glutamato como neurotransmisor, indicando que en algunos circuitos neuronales existen “autorreceptores” presinápticos involucrados en regular la liberación de este neurotransmisor (Michaelis, 1998).

Para su activación, los receptores NMDA requieren la presencia obligada de dos co-agonistas: glicina y glutamato, que se unen a las subunidades NR1 y NR2, respectivamente (Michaelis, 1998; Kew y Kemp, 2005).

Regulación de los receptores ionotrópicos

Tanto la edición del pre-mRNA, como la expresión de distintas subunidades y su arreglo en complejos heteroméricos, permiten obtener una amplia gama de receptores que tienen propiedades funcionales y farmacológicas distintas (Michaelis, 1998; Kew y Kemp, 2005).

Los receptores ionotrópicos están modulados por la concentración intracelular de ATP. Por ejemplo, la amplitud de la corriente inducida por los receptores KA se ve aumentada cuando la subunidad GluR6 se fosforila por la proteína cinasa A (PKA). Los receptores AMPA/KA también pueden ser fosforilados por la CaMKII y la PKC (Michaelis, 1998).

Por otro lado, la activación de los receptores NMDA conlleva a una entrada mayor de Ca^{2+} , lo que incrementa la activación por fosforilación de la CaMKII y la subsecuente fosforilación de los receptores AMPA/KA. Además, los receptores NMDA pueden ser fosforilados por la PKC o por proteínas tirosina cinasas, lo que aumenta su conductancia. El aumento en la respuesta de estos receptores inducido por la PKC está vinculado con la respuesta de los mGluRs del grupo I, que estimulan a la fosfolipasa C (PLC); el DAG producto de esta reacción activa a la PKC (Michaelis, 1998).

La activación de la PKA, que depende de los niveles de cAMP, causa un aumento en las corrientes de los tres tipos de receptores ionotrópicos en la retina y en las uniones sinápticas del cerebro (Michaelis, 1998).

Mientras que la fosforilación de los receptores aumenta su actividad, la desfosforilación de estas proteínas tiene el efecto contrario. Por ejemplo, la activación de fosfatasa, como la calcineurina y las fosfatasa de fosfotirosina, aumentan la tasa de desensibilización de los receptores NMDA, disminuyendo la respuesta del receptor a sus agonistas (Michaelis, 1998).

*Receptores metabotrópicos

Los receptores metabotrópicos (mGluRs) son miembros de la amplia familia C de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Todos los mGluRs poseen un largo dominio extracelular N-terminal bi-lobulado, que contiene el sitio de unión al glutamato. El dominio N-terminal está unido mediante una región rica en cisteínas a un dominio transmembranal heptahelical, típico de los GPCR, y que media la activación de la proteína G. El dominio C-terminal es intracelular y juega un papel importante en la regulación de la actividad del receptor (Kew y Kemp, 2005).

Los mGluRs componen una familia de 8 miembros (mGluR1-8), que ha sido subdividida en tres clases con base en la homología de sus secuencias, al segundo mensajero al que están acoplados, y a las propiedades farmacológicas que exhiben. El grupo I (mGluR1 y 5) se acopla principalmente vía G_q/G_{11} a la PLC. La activación de estos receptores conlleva a la conversión catalizada por la PLC del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato a IP_3 y DAG. Este último está involucrado en la activación de la PKC, mientras que el IP_3 aumenta la liberación intracelular de Ca^{2+} del retículo endoplasmático. Los grupos II (mGluR2 y 3) y III (mGluR4, 6, 7 y 8) parecen estar acoplados a proteínas G_i/G_o , e inhiben la actividad de la adenilato ciclasa. Además, se ha observado que los mGluRs pueden estimular otras vías de señalamiento a través de proteínas como la fosfodiesterasa del guanosín monofosfato cíclico, la fosfolipasa D, la fosfatasa 2A, y las MAPKs (Michaelis, 1998; Fagni, et al., 2004; Kew y Kemp, 2005).

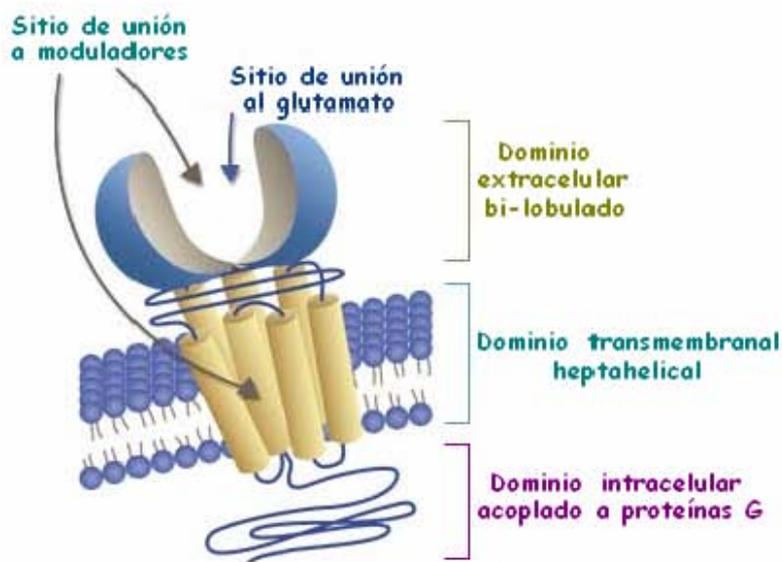


Figura 8. Esquema que representa a los receptores de tipo metabotrópico. Estos receptores están acoplados a una proteína G que activa una cascada de segundos mensajeros.

Mientras que el mGluR6 está confinado a la retina, todos los demás miembros de la familia de los mGluR se expresan en el SNC de los mamíferos tanto en células neuronales como en células gliales. Los miembros individuales de la familia también exhiben distintos patrones de expresión espacio-temporal: los mGluRs del grupo I se localizan típicamente en dominios somatodendríticos postsinápticos, mientras que los receptores pertenecientes a los grupos II y III son predominantemente presinápticos, localizados en terminales axónicas en donde pueden regular la liberación de los neurotransmisores (Fagni, et al., 2004; Kew y Kemp, 2005).

Generalmente, los mGluRs cumplen una función moduladora al regular la excitabilidad neuronal, la transmisión sináptica y la plasticidad (Kew y Kemp, 2005).

Se piensa que los mGluRs funcionales están formados por homodímeros. En la ausencia del ligando o cuando están ocupados por antagonistas competitivos, los dominios bi-lobulados extracelulares del homodímero están separados físicamente, en una conformación abierta. Después de la unión del agonista adoptan una conformación cerrada (Kew y Kemp, 2005).

Farmacología de los receptores de glutamato

En la Tabla 2 se incluyen los principales compuestos que se han identificado como agonistas, antagonistas o moduladores alostéricos para los iGluRs y para los mGluRs.

Tabla 2. Farmacología de los Receptores de Glutamato.

Receptor de Glutamato	Agonistas	Antagonistas	Moduladores alostéricos positivos
AMPA	ácido iboténico, ácido quisquálico, willardiina	Competitivos: principalmente derivados de las quinoxalinas como CNQX, DNQX, NBQX, PNQX No competitivos: benzodiazepinas (GYKI 52466, GYKI 53784) y quinazolinonas (CP-465,022, CP-526,427)	aniracetma, benzamidas (CX516, CX546), benzotiadiazidas (ciclotiazida), biaripropilsulfonamidas (LY392098, LY404187)
Kainato	domoato, análogos del AMPA (ATPA), análogos del glutamato (SYM2081, LY339434)	CNQX, NBQX, derivados de la willardiina (UBP296)	concavalina-A

Receptor de Glutamato	Agonistas	Antagonistas	Moduladores alostéricos positivos
NMDA	<p>En el sitio de reconocimiento al glutamato: L-aspartato, quinolinato, homocisteato</p> <p>En el sitio de reconocimiento a la glicina: D-serina, (ACPC)</p>	<p>En el sitio de reconocimiento al glutamato: derivados de los ácidos alfa-amino carboxílicos (D-AP5, CGS 19755, CPG 39653)</p> <p>En el sitio de reconocimiento a la glicina: ácido quinurénico y sus derivados (7-Cl-quinurenato, sulfo-Cl-quinurenato)</p> <p>Compuestos que bloquean el poro del canal iónico: anestésicos disociativos como cetamina, fenilciclidina, MK-801</p>	<p>poliaminas (espermina, espermidina), cuya activación se inhibe por el ifenprodil</p>
Metabotrópicos	(trans-ACDP)	AP-3, AP-4	

El glutamato y la regulación de la expresión génica

Se ha observado que el glutamato y sus agonistas como el NMDA y el KA incrementan la actividad de las MAPKs de manera dosis-dependiente (Haddad, 2005). Por ejemplo, la activación de los receptores a glutamato, especialmente de tipo NMDA, conllevan al aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular y a la estimulación de la PKC y la CaMKII. Ambas enzimas son capaces de activar la cascada de señalamiento de las MAPKs, con la subsecuente activación de genes tempranos como c-Jun, c-Myc, c-Fos, ATF-2, y Elk-1, que codifican factores de transcripción que finalmente regularán la expresión de genes tardíos (Lerea, 1997; Michaelis, 1998). Los receptores AMPA permeables al Ca^{2+} también están relacionados con la activación de la cascada de las MAPKs, proceso dependiente de la activación de la PI3K (Haddad, 2005).

Por otro lado, se ha observado en el SNC que los receptores iGluRs activan al factor de transcripción NFκB a través de la PI3K y la PKC. Estas enzimas activan a la cinasa IκB, cuya función es inactivar a la proteína inhibidora IκB, lo que permite la disociación del complejo IκB-NFκB y la subsecuente translocación de NFκB al núcleo, donde activa factores de transcripción que llevan a la célula a iniciar una cascada de procesos que la protejan ante un daño, o bien la conduzcan a la muerte (Michaelis, 1998; Kaltschmidt, et al., 2005; Méndez, 2005).

Glutamato y excitotoxicidad

La excitotoxicidad, que resulta de una activación excesiva de los receptores a glutamato, ha sido ligada a varios estados patológicos en el SNC (Michaelis, 1998). El aumento de Ca^{2+} intracelular es clave en estos procesos (Haddad, 2005), por ejemplo:

-Se asume que el incremento en la concentración de Ca^{2+} causa un estrés oxidativo en la mitocondria que conlleva a una fosforilación oxidativa excesiva y al incremento en la producción de ROS ($^{\circ}O_2^-$, H_2O_2 , $^{\circ}OH$). Se considera que la formación de ROS es una señal de estrés oxidativo que encamina a las células a morir por apoptosis (Michaelis, 1998).

-La entrada de Ca^{2+} puede conllevar a un aumento en la actividad de proteasas dependientes de Ca^{2+} , las caspasas, involucradas en la muerte neuronal por apoptosis (Michaelis, 1998).

-La entrada de Ca^{2+} también activa a la enzima fosfolipasa A_2 , que cataliza la formación de ácido araquidónico. El metabolismo de este ácido por las ciclooxigenasas genera $^{\circ}O_2^-$, que junto a otras ROS pueden constituirse como el estímulo inicial que desencadena la apoptosis neuronal (Michaelis, 1998).

-Otra enzima activada por el aumento del Ca^{2+} es la sintasa del óxido nítrico, cuya actividad implica la formación de peroxinitrito (ONOO $^-$). El peroxinitrito es un fuerte agente oxidante que causa la nitración de residuos de tirosinas en las proteínas y la oxidación de lípidos y DNA (Michaelis, 1998).

El glutamato y su función en el ojo

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en la retina de los vertebrados, y es utilizado desde los fotorreceptores hasta las células ganglionares para transmitir la información desde la retina hacia el cerebro (Mäenpää, et al., 2004; Lee-Rivera y López Colomé, 2005).

Se ha propuesto al glutamato y a otros aminoácidos (L-aspartato, taurina, glutamina) como los posibles mensajeros que llevan a la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores por el EPR de forma independiente de la luz, contribuyendo también a la adhesividad entre ambas estructuras (López-Colomé, et al., 1994).

En este contexto, está demostrada la presencia de receptores ionotrópicos y metabotrópicos en el EPR humano y del pollo. La activación de estos receptores estimula la formación de fosfatos de inositol, y la elevación del Ca^{2+} intracelular, lo que puede afectar a las funciones celulares (López-Colomé, et al., 1994).

Por otro lado, se sabe que el glutamato tiene efectos neurotóxicos cuando está presente a elevadas concentraciones extracelulares, por lo que su remoción del espacio intersináptico es esencial para una neurotransmisión normal en la retina. De los cinco transportadores de glutamato que han sido clonados: 1) GLAST (transportador de glutamato/aspartato dependiente de Na^+), 2) GLT1 (transportador de glutamato 1), 3) EAAC (acarreador de aminoácidos excitadores), 4) EAAT4 (transportador de aminoácidos excitadores) y 5) EAAT5; todos, con excepción de EAAT4, han sido encontrados en la retina. En el EPR también se han encontrado transportadores de glutamato, por lo que se piensa que el EPR toma parte, junto con las células de Müller, en la regulación de la concentración de este aminoácido en el espacio subretinal. Por ejemplo, en las líneas celulares de EPR humano ARPE19 y D407 se han identificado los transportadores EAAT4 y EAAC1 (Marc, et al., 1998; Mäenpää, et al., 2004).

Excitotoxicidad por glutamato y VRP

Se ha probado que los aminoácidos excitadores relacionados con el glutamato inducen la degeneración de las células de la retina cuando se administran sistémicamente a ratas recién nacidas o alternativamente, cuando se aplican intravitrealmente a animales maduros o a neuronas en cultivo primario. Estos hallazgos sugieren que la concentración de glutamato en el espacio subretinal debe mantenerse baja y finamente regulada para evitar la toxicidad retinal (López-Colomé, et al., 1993). Esta regulación se lleva a cabo principalmente por las células de Müller, que capturan al glutamato del ambiente extracelular y lo transforman en glutamina mediante la enzima glutamina sintetasa (Diederer, et al., 2006).

Se espera que ante algún tipo de estrés ocular (trauma, fotocoagulación, desprendimiento de la retina, isquemia e hipoxia), los niveles extracelulares de glutamato en la retina aumenten debido a la ruptura de los fotorreceptores y a la estimulación mecánica en masa de fotorreceptores y células bipolares (Marc, et al., 1998; Uchida, et al., 1998). Por ejemplo, se han encontrado concentraciones elevadas de glutamato en el vítreo de pacientes con desprendimiento regmatógeno retiniano y con retinopatía diabética proliferativa (Diederer, et al., 2006).

En un modelo de desprendimiento retinal en gato, se observaron las variaciones intracelulares de glutamato en células del EPR, y se encontró que: al inicio (día 3) la concentración de glutamato alcanza un pico máximo, para luego descender a niveles basales (semana 4). Estos datos sugieren que

el EPR percibe e intenta regular la composición del espacio subretinal, junto con las células de Müller (Marc, et al., 1998).

El estudio de Uchida, et al. (1998) mostró que al estimular los receptores de tipo NMDA con glutamato, se inducía la proliferación de células del EPR de rata en cultivo. Estos datos sugieren que bajo condiciones de estrés ocular, cuando se acumula un alto nivel de glutamato en el espacio extracelular, las células del EPR pueden activarse y proliferar, contribuyendo con ello a la patogénesis de la VRP.

Por último, es interesante notar que los receptores NMDA son sensibles al estiramiento mecánico u osmótico de las membranas neuronales. El estiramiento incrementa la probabilidad de que se abran los canales, y si el estímulo se sostiene, la respuesta aumenta aun más debido a que disminuye el bloqueo por Mg^{2+} . Esto conlleva a un aumento en la entrada de Ca^{2+} al interior celular, proceso que ha sido propuesto como el inicio en el evento de daño neuronal. También es posible que la deformación de la membrana inicie otros eventos moleculares como la activación de cinasas sensibles a la adhesión focal macromolecular, y a la fosforilación de receptores NMDA (Michaelis, 1998).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se ha mencionado, entre las funciones del EPR se cuenta la de secretar una gran variedad de factores de crecimiento y citocinas. Cuando la secreción de dichos factores cambia como respuesta a un daño, se pueden desarrollar enfermedades retinianas; por tanto, conforme se conozcan las interacciones de estos factores se podrán diseñar estrategias terapéuticas para el tratamiento y/o prevención de las enfermedades correspondientes (Marmor, 1998b; Strauss, 2005).

Particularmente, el EPR es una fuente importante de TGF- β tanto *in vivo* como *in vitro* (Tanihara et al., 1993; Kvanta, 1994; Pfeffer, et al., 1994; Campochiaro, 1998; Tezel y Del Priore, 1999; Hirase, et al., 2005; Saika, 2006). Variaciones de la concentración de esta citocina en el polo posterior del ojo pueden contribuir a la función visual normal, pero también estar implicados en la patogénesis de enfermedades fibróticas asociadas a la reparación de tejidos, entre las que se incluyen la VRP y la retinopatía diabética proliferativa (Connor et al., 1989; Matsumoto, et al., 1994; Pfeffer, et al., 1994; Obata, et al., 1999; Saika, 2006).

Además del TGF- β , otro factor que se libera cuando ocurre algún tipo de estrés ocular es el glutamato, el principal neurotransmisor excitador en la retina de los vertebrados. En este contexto, se observan concentraciones elevadas de glutamato en el vítreo de pacientes con desprendimiento regmatógeno de retina y con retinopatía diabética proliferativa (Marc, et al., 1998; Uchida, et al., 1998; Lee-Rivera y López Colomé, 2005; Diederer, et al., 2006).

El glutamato puede actuar no sólo como neurotransmisor, sino también como factor trófico en células gliales y neuronales al inducir la liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y del TGF- β (Bruno, et al., 1998; D'Onofrio, et al., 2001; Balazs, 2006). El TGF- β se libera en el SNC como un agente neuroprotector ante una gran variedad de agentes inductores de muerte, entre los que se incluye el glutamato, cuya elevación produce excitotoxicidad (Prehn, et al., 1993, Flanders et al., 1997; Dobbertin, et al., 2000; Dhandapani y Brann, 2003). Por otra parte, se ha observado que el glutamato induce la proliferación de las células del EPR en cultivo (Uchida, et al., 1998). Dado que estas células epiteliales expresan receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos de glutamato (López-Colomé; et al., 1993; López-Colomé, et al., 1994; Mäenpää, et al., 2004), es posible que su administración ocasione la liberación de TGF- β , o bien que la inhiba.

Aunque estudios previos han demostrado la expresión de los receptores de TGF- β en el EPR de humano (Kociok, et al., 1998; Bochaton-Piallat, et al., 2000; Mitsuhiro et al., 2003) y de rata (Obata, et al., 1999), no se ha investigado si dicha expresión cambia como respuesta a la estimulación con algún compuesto neuroactivo. Por otro lado, cambios en la expresión de los T β Rs se asocian con la progresión de enfermedades fibroproliferativas (Sun y Chen, 1997; Roulot, et al.,

1999; Kim, et al., 2000; Goldberg, et al., 2002; Chang, et al., 2002; Fee, et al., 2004; Huang y Huang, 2005; Turley, et al., 2007; Yamane, et al., 2007), por lo que es factible pensar que el glutamato, al inducir la proliferación de las células del EPR, modifique la expresión de dichos receptores.

HIPÓTESIS

El glutamato modifica la liberación de TGF- β y/o la expresión de sus receptores en células cultivadas de EPR de pollo, de rata y de la línea ARPE-19, siendo ambas moléculas importantes en el desarrollo de enfermedades retinianas, como la VRP.

OBJETIVOS

1. Identificar a las células en cultivo utilizando la proteína RPE65 como marcador específico de las células del EPR mediante ensayos de inmunofluorescencia.
2. Determinar si el glutamato modifica la liberación de TGF- β en cultivos celulares de EPR de pollo, de rata y de la línea ARPE-19 mediante ensayos de ELISA.
3. Determinar la expresión génica de los receptores de TGF- β en cultivos celulares de EPR de pollo, de rata y de la línea ARPE-19 mediante ensayos de RT-PCR.
4. Determinar si el glutamato modifica la expresión de los receptores de TGF- β en cultivos celulares de EPR de pollo, de rata y de la línea ARPE-19 mediante ensayos de RT-PCR.

METODOLOGÍA

Cultivo primario de EPR de pollo. Para realizar el cultivo se extrajo el globo ocular de embriones de pollo de 7-8 días de gestación. Los ojos se cortaron por la parte media, y después de remover la retina, se extrajo el EPR en medio RKB (Ringer Kreb's Bicarbonato: NaCl 118 mM; KH_2PO_4 1.2 mM; KCl 4.7 mM; CaCl_2 2.5 mM; MgSO_4 1.17 mM; NaHCO_3 34.5 mM; y glucosa 5.6 mM). El tejido se lavó 5-7 veces con medio RKB, y se incubó por 12 minutos a 37°C con 0.13% de tripsina en amortiguador de fosfatos en solución salina (PBS). La tripsina fue eliminada y el tejido se lavó 3 veces más con medio L-MEM (Invitrogen Corporation, California) con 1% de albúmina de suero bovino (BSA, Calbiochem, California). Las células se resuspendieron en medio Opti-MEM (Invitrogen Corporation, California; suplementado con antibióticos: 0.01% de penicilina; 0.01% de estreptomycin; 0.02% de neomicina; 0.02% de gentamicina; y 0.01% de nistatina) con 4% de suero fetal bovino (FBS, Invitrogen Corporation, California), y fueron filtradas a través de una malla de nylon de 50 μm de poro. Para los ensayos de cinética de activación por glutamato las células se sembraron a una densidad de 500 000 células por pozo en cajas de cultivo con 6 pozos (Corning Incorporated, New York). Para los ensayos de inmunofluorescencia las células se sembraron a una densidad de 10 000 células por pozo en portaobjetos con 8 pozos (Nalge Nunc Internacional, Illinois). Las células permanecieron hasta su uso en un ambiente humidificado de aire al 95% y CO_2 al 5%, a 37°C.

Cultivo primario de EPR de rata. Para realizar el cultivo se extrajo el globo ocular de ratas Long Evans de 8-10 días de edad, previamente anestesiadas con cloroformo. Los ojos se incubaron por 30 minutos a 37°C con 2% de dispasa en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Invitrogen Corporation, California; pH 7.4; suplementado con antibióticos: 0.0125% de penicilina; 0.0125 % de estreptomycin; 0.0250% de neomicina; 0.0250% de gentamicina; y 0.01% de nistatina). Después de retirar el tejido adyacente al globo ocular, éste se cortó por la parte media. El fondo del ojo se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} ; pH 8), se retiró la retina y se aisló el EPR. El tejido se recuperó por centrifugación (5 minutos a 2 000 rpm) y fue resuspendido en HBSS con 0.1% de tripsina. El EPR se incubó por 5 minutos a 37°C, y para finalizar la acción de la tripsina se agregó un exceso de medio Opti-MEM con 4% de FBS. Después de centrifugar el tejido durante 5 minutos a 2 000 rpm, se eliminó el sobrenadante, y las células fueron resuspendidas en Opti-MEM con 4% de FBS. La suspensión celular se filtró a través de una malla de nylon de 50 μm de poro para finalmente sembrar las células. Para los ensayos de cinética de activación por glutamato las células se sembraron a una densidad de

500 000 células por pozo en cajas de cultivo con 6 pozos (Corning Incorporated, New York). Para los ensayos de inmunofluorescencia las células se sembraron a una densidad de 40 000 células por pozo en portaobjetos con 8 pozos (Nalge Nunc Internacional, Illinois). Las células permanecieron hasta su uso en un ambiente humidificado de aire al 95% y CO₂ al 5%, a 37°C.

Subcultivo de ARPE-19. ARPE-19 es una línea celular de EPR humano surgida espontáneamente durante el cultivo primario (Dunn, et al., 1996). El subcultivo se realizó de la siguiente manera: las células se disociaron con tripsina-EDTA (Invitrogen Corporation, California) por 7 minutos a 37°C. La acción de esta enzima fue detenida al agregar un exceso de medio L-MEM con 1% de BSA. Las células se centrifugaron por 5 minutos a 2 000 rpm, y después de eliminar el medio, se resuspendieron en medio DMEM : F12 Nutrient Mixture (Invitrogen Corporation, California; proporción 1:1) con 4% de FBS. Para los ensayos de cinética de activación por glutamato las células se sembraron a una densidad de 350 000 células por pozo en cajas de cultivo con 6 pozos (Corning Incorporated, New York). Para los ensayos de inmunofluorescencia las células se sembraron a una densidad de 25 000 células por pozo en portaobjetos con 8 pozos (Nalge Nunc Internacional, Illinois). Las células permanecieron hasta su uso en un ambiente humidificado de aire al 95% y CO₂ al 5%, a 37°C.

Inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia se realizó en cultivos primarios de EPR de rata y de EPR de pollo, y en los pasajes 6-8 de ARPE-19 al 50% de confluencia. Después de realizar 2 lavados con PBS por 5 minutos, las células fueron fijadas con 2% de para-formaldehído por 20 minutos. Al término de este tiempo las células se lavaron 2 veces con PBS por 5 minutos, y se permeabilizaron con 0.1% de Tritón X-100 en PBS por 5 minutos. Las células se lavaron 4 veces más con PBS (2 lavados de 1 minuto y 2 lavados de 5 minutos). Para evitar el pegado inespecífico del anticuerpo, se incubó con el buffer de bloqueo (0.5% de leche en PBS) por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las células se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, diluido 1:200 en el buffer A (0.5% de leche y 0.1% de saponina en PBS) durante toda la noche a 4°C. Se utilizaron 2 anticuerpos monoclonales de ratón: anti-RPE65 (Novus Biologicals, Colorado) y pan-citoqueratina CII (Santa Cruz Biotechnology, California). En los controles negativos se omitió el uso del anticuerpo primario. Pasado el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, las células se lavaron 4 veces con el buffer B (1% de BSA en PBS) por 5 minutos, y se incubaron con el anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG (H+L) FITC conjugated (Zymed Laboratorios, San Francisco), diluido 1:200 en el buffer A, durante 2 horas, en la obscuridad. Finalmente se realizaron 4 lavados con el buffer B por 5 minutos, para montar la preparación.

Las preparaciones se observaron y fotografiaron en un microscopio confocal Olympus FluoView FV1000 (Olympus Corporation, Tokio), y se analizaron con el programa Olympus Fluoview 1.4a.

Cinética de activación por glutamato. En todos los experimentos, antes de comenzar con la estimulación el medio de crecimiento correspondiente se reemplazó por un medio libre de suero, para evitar la intervención de factores de crecimiento y citocinas contenidas en éste. Para analizar la liberación de TGF- β mediante ELISA (inmunoensayo unido a una enzima), las células se trataron durante 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas (excepto en cultivos de EPR de pollo, en los cuales se omitió la hora 96 debido a que estas células se despegan de la caja de cultivo ante un período prolongado) con ácido glutámico 1 mM (sal monosódica; Sigma, Missouri). Al término de la estimulación el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso. Para determinar la expresión de los receptores al TGF- β , las células se trataron durante 0, 6, 12, 24, 48 y 72 horas con ácido glutámico 1 mM. Al término de la estimulación se extrajo el RNA total.

La cinética de activación se analizó en cultivos primarios confluentes de EPR de rata y de EPR de pollo, y en los pasajes confluentes 2-7 de ARPE-19.

Inmunoensayo unido a una enzima (ELISA). La concentración de TGF- β total en el medio de cultivo se determinó mediante ELISA. Cajas de cultivo con 96 pozos (Nalge Nunc International, Illinois) fueron sensibilizadas durante toda la noche a 4°C agregando 50 μL de la muestra y 50 μL del siguiente estándar: TGF- β 2 recombinante humano (R&D Systems, Minneapolis) a una concentración de 2 000-32 000 pg/mL. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 1 minuto con el buffer A (200 μL de Tween²⁰ al 0.1% en PBS). Para evitar el pegado inespecífico se agregó a la caja de cultivo 200 μL de 1% de BSA en PBS por 2 horas. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con el buffer A por 1 minuto. Las muestras se incubaron con 50 μL del anticuerpo primario anti-TGF- β 1, - β 2, - β 3 (R&D Systems, Minneapolis) diluido 1:250 en el buffer B (medio de cultivo correspondiente sin suero : buffer de carbonatos, proporción 1:1) durante toda la noche a 4°C . Al término de este periodo se realizaron 5 lavados con el buffer A por 1 minuto, y las muestras se incubaron con 50 μL del anticuerpo secundario goat anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugated (Zymed Laboratories, San Francisco), diluido 1:1000 en el buffer B durante 2 horas. Se realizaron 5 lavados más con el buffer A por 1 minuto, y después las muestras se incubaron con 100 μL de TMB OneSolution (Promega, Wisconsin) durante 20 minutos. La lectura se realizó a 630 nm en el detector de absorbancia Opsys MR (Dynex Technologies, Virginia), acoplado al programa Dynex Revelation 4.24. La

concentración final de TGF- β en las muestras se calculó utilizando el estándar de TGF- β 2 recombinante humano.

Para normalizar los niveles de liberación de TGF- β , se dividió la cantidad de TGF- β (pg/mL) obtenida en cada muestra entre la cantidad correspondiente de proteína total.

Los resultados de la cinética de activación por glutamato se analizaron con una prueba de Anova (análisis de variancia de una vía) en el programa GraphPad Prism 4.0.

Extracción de RNA. Se extrajo el RNA total utilizando Trizol® Reagent (Invitrogen Corporation, California) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente: después de retirar el medio de cultivo de los pozos, el tejido se homogeneizó por 5 minutos con Trizol. Las muestras se transfirieron a tubos eppendorf estériles y se agregó cloroformo. Después de centrifugar las muestras a 12 500 rpm por 15 minutos a 4°C, se recuperó la fase acuosa y el RNA fue precipitado agregando isopropanol por 15 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 13 000 rpm por 15 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante. La pastilla de RNA se lavó con etanol al 80% en agua de DEPC (dietil-pirocarbonato) al 0.1% (Sigma, Missouri), centrifugando los tubos a 13 000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el RNA se resuspendió en agua de DEPC al 0.1%. Para evitar una posible contaminación con DNA, el RNA se incubó con DNase I (Invitrogen Corporation, California) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Esta enzima se inactivó incubando las muestras con EDTA 2.5 mM durante 10 minutos a 65°C (Invitrogen Corporation, California). Finalmente se adicionaron 20 U de RNaseOUT (Invitrogen Corporation, California).

La concentración del RNA total se calculó por absorbancia a 260 nm, y su integridad se determinó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con 1 μ g/mL de bromuro de etidio. El RNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

Retrotranscripción y Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 2 μ g de RNA total utilizando 80 pmol de hexámeros al azar. Las muestras de RNA se incubaron 15 minutos a 80°C, y la síntesis de cDNA se llevó a cabo durante 1 hora a 42°C utilizando 200 U de transcriptasa reversa M-MLV ó SuperScript (Invitrogen Corporation, California). La solución en la que se disolvió la transcriptasa reversa contenía: 0.25 mM de cada dNTP; 10 U de RNaseOUT (Invitrogen Corporation, California), y el buffer recomendado por el fabricante (Tris-HCl 50 mM a pH 8.3; KCl 75 mM; MgCl₂ 3 mM; y DTT 10 mM; Invitrogen Corporation, California). La transcriptasa reversa se inactivó al incubando las muestras durante 15

minutos a 75°C. Finalmente las muestras se incubaron con 0.4 U de RNase H (Invitrogen Corporation, California) por 30 minutos a 37°C.

El cDNA obtenido se dividió en 4 para amplificar con oligonucleótidos específicos cada uno de los receptores al TGF- β y β -actina como control. Los oligonucleótidos para los T β Rs se diseñaron mediante el programa MacVector 6.5.3, de acuerdo a zonas de alta homología entre las secuencias correspondientes a cada receptor a TGF- β en la rata, el pollo y el humano y se analizaron con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para confirmar su especificidad (Tabla 3.). Los oligonucleótidos para β -actina fueron descritos previamente (Lee-Rivera, et al., 2003).

La PCR se llevo a cabo utilizando la siguiente mezcla de reacción: 5 μ L del cDNA; 2.5 U de *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen Corporation, California); 0.4 μ M de cada oligonucleótido; 0.2 mM de cada dNTP; y 1.5 mM de MgCl₂, disueltos en el buffer recomendado por el fabricante (Tris-HCl 20 mM a pH 8.4; y KCl 50 mM; Invitrogen Corporation, California).

La amplificación se realizó en un Termociclador Eppendorf (Waltham, Massachusetts) con el siguiente protocolo: 2 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial, seguido de 31 ciclos (30 segundos a 94°C; 30 segundos a 53°C; 30 segundos a 72°C) para cada uno de los receptores al TGF- β y 27 ciclos con el mismo protocolo para β -actina, para finalmente someterse a un período de extensión final de 10 minutos a 72°C.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la PCR

Oligonucleótido	Secuencia (5' \rightarrow 3')	Tamaño (pb)
TβR I		
Left	GACAACAAAGACAATGGTAC	389
Right	GTTTCATATTTATGGAATCATC	
TβR II		
Left	GCCAACAACATCAACCACAA	400
Right	TGATCACTGTGCAGATGGGC	
TβR III		
Left	AGAATGTCTGATTACACCAT	283
Right	TGCATCATGGCCAAGATCAT	
β-actina		
Left	GCTCGTCGTCGACAACGGCT	328
Right	CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC	

Electroforesis de cDNA. Las muestras amplificadas por PCR se cargaron en geles de agarosa al 1.5% con 1 µg/mL de bromuro de etidio. La electroforesis se llevó a cabo durante 1 hora 15 minutos a 100 Volts. Los geles se observaron en el transiluminador, y mediante una escalera estándar de peso molecular (100 bp DNA Ladder; Invitrogen Corporation, California) se comprobó que el producto amplificado correspondiera al peso molecular de cada receptor a TGF-β y β-actina, preestablecido cuando se diseñaron los oligonucleótidos.

Los geles se digitalizaron en el escáner Typhoon Scanner Control 8600 (Molecular Dynamics, California). Las imágenes digitalizadas de los geles se analizaron con el programa Image Quant 5.1. Para determinar los niveles de expresión en la muestra, se normalizó la intensidad de cada banda correspondiente a los receptores de TGF-β en relación con la banda correspondiente de β-actina (cuya expresión permanece constante durante el desarrollo (Lee-Rivera, et al., 2003)).

Los resultados de la cinética de activación por glutamato se analizaron con una prueba de Anova (análisis de variancia de una vía) en el programa GraphPad Prism 4.0.

RESULTADOS

Morfología de las células del EPR en cultivo

En este trabajo se utilizaron células del EPR provenientes de 3 especies diferentes: pollo, rata y humano. Como se observa en la Figura 9 (A, B), las células en cultivo primario (EPR de pollo y de rata) presentan características semejantes a las células del EPR *in vivo*, manteniendo una morfología homogénea, poligonal y pigmentada. Por otro lado, las células pertenecientes a la línea ARPE-19 (línea celular de EPR humano) presentan una morfología fusiforme (Figura 9C).

Inmunofluorescencia para RPE65 y citoqueratina

Para confirmar el origen epitelial de las células en cultivo se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para la proteína RPE65, que se expresa de manera casi exclusiva en el EPR de los vertebrados, por lo que se utiliza como marcador bioquímico de estas células. Como se observa en la Figura 9 (D-E), la proteína RPE65 se expresa en cultivos primarios de EPR de pollo y de rata; sin embargo, no se pudo detectar en células de la línea ARPE-19. Por esta razón se decidió utilizar como marcador de origen epitelial a la proteína citoqueratina, la cual se observa claramente en las células de ARPE-19 (Figura 9F).

Efecto del glutamato sobre la liberación de TGF- β en el EPR

Los resultados muestran que aunque las células de EPR de pollo, de rata y de la línea ARPE-19 secretan TGF- β de manera constitutiva, el glutamato no modifica la liberación de esta citocina (Tabla 4). En la Figura 10 se observan las gráficas que corresponden a los valores normalizados de TGF- β liberado.

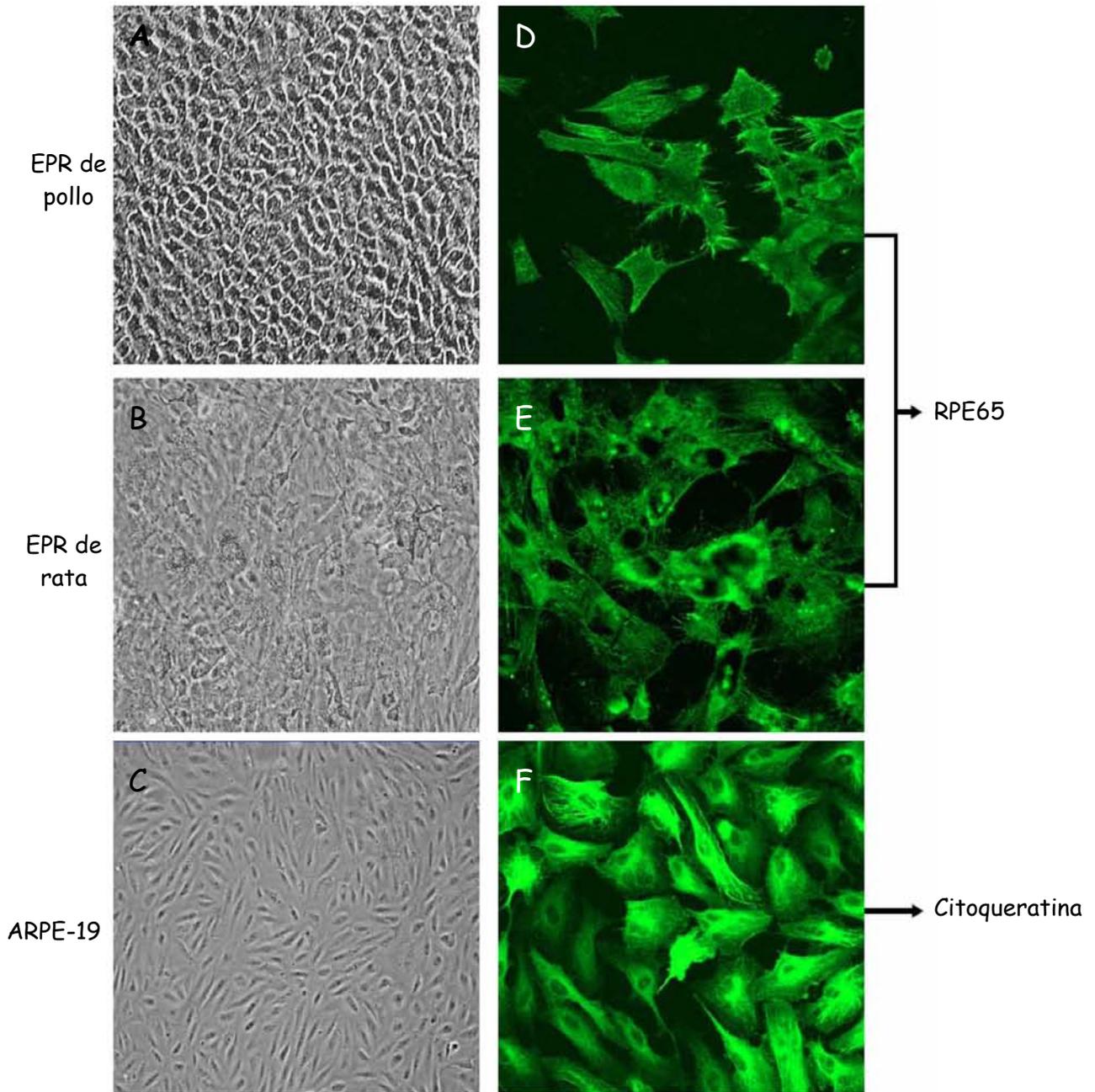


Figura 9. Morfología de las células del EPR en cultivo e inmunofluorescencia para RPE65 y citoqueratina. A-C: microfotografía de contraste de fases que muestra a las células del EPR en las diferentes especies (Ampliación X10). **D-F:** microfotografía confocal en la que se observa a las proteínas RPE65 (D, E) y citoqueratina (F), ambas utilizadas como marcadores bioquímicos del EPR (Ampliación X40).

Tabla 4. El glutamato no afecta la liberación de TGF- β en el EPR

Glutamato 1 mM (horas)	TGF- β (pg/mL)		
	EPR de pollo	EPR de rata	ARPE-19
0	383.79 \pm 4.99	237.12 \pm 115.03	558.68 \pm 58.47
12	334.43 \pm 149.07	307.19 \pm 188.97	453.44 \pm 90.56
24	285.18 \pm 148.21	201.07 \pm 119.58	461.38 \pm 193.69
48	282.47 \pm 148.73	254.57 \pm 121.62	482.36 \pm 159.37
72	413.25 \pm 102.26	368.49 \pm 244.27	570.23 \pm 330.23
96		421.04 \pm 278.47	521.27 \pm 69.19

Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes, los valores representan el promedio \pm la desviación estándar. La prueba de Anova indica que no hay diferencias significativas entre el control y los tratamientos, respectivamente.

Expresión de los T β Rs en el EPR

Se observa que el perfil de expresión de los T β Rs en el pollo y en el humano es muy similar, predominando la expresión del T β RI, seguida por la del T β RII y finalmente la del T β RIII (T β RI > T β RII > T β RIII). En el EPR de rata no se observó diferencia significativa entre la expresión del T β RI y del T β RII, mientras que el receptor de menor expresión es el T β RIII, como ocurre en el pollo y en el humano (Figura 11). En la Tabla 5 se muestran los valores obtenidos para cada receptor.

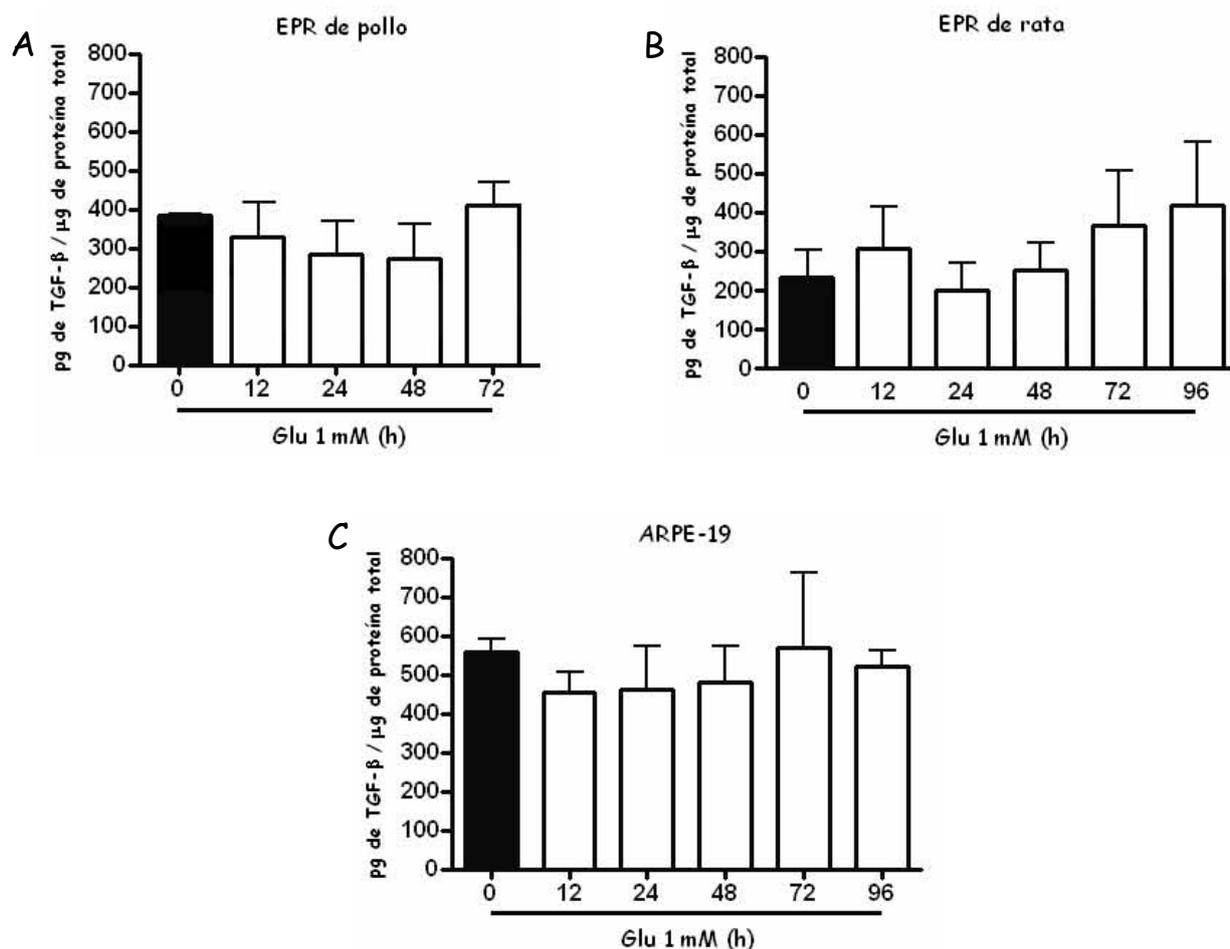


Figura 10. Valores normalizados de TGF-β liberado en células del EPR tratadas con glutamato. A-C: análisis cuantitativo de la secreción de TGF-β en el EPR de pollo (A), de rata (B), y en la línea celular ARPE-19 (C). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes, los valores en cada columna representan el promedio \pm la desviación estándar. (Glu: glutamato; h: horas).

Tabla 5. Expresión general de los TβRs en el EPR

	EPR de pollo	EPR de rata	ARPE-19
TβRI	0.90 \pm 0.09	0.80 \pm 0.07	0.87 \pm 0.06
TβRII	0.41 \pm 0.02	0.68 \pm 0.09	0.47 \pm 0.03
TβRIII	0.27 \pm 0.05	0.36 \pm 0.04	0.19 \pm 0.01

Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes, se expresan como el promedio \pm la desviación estándar.

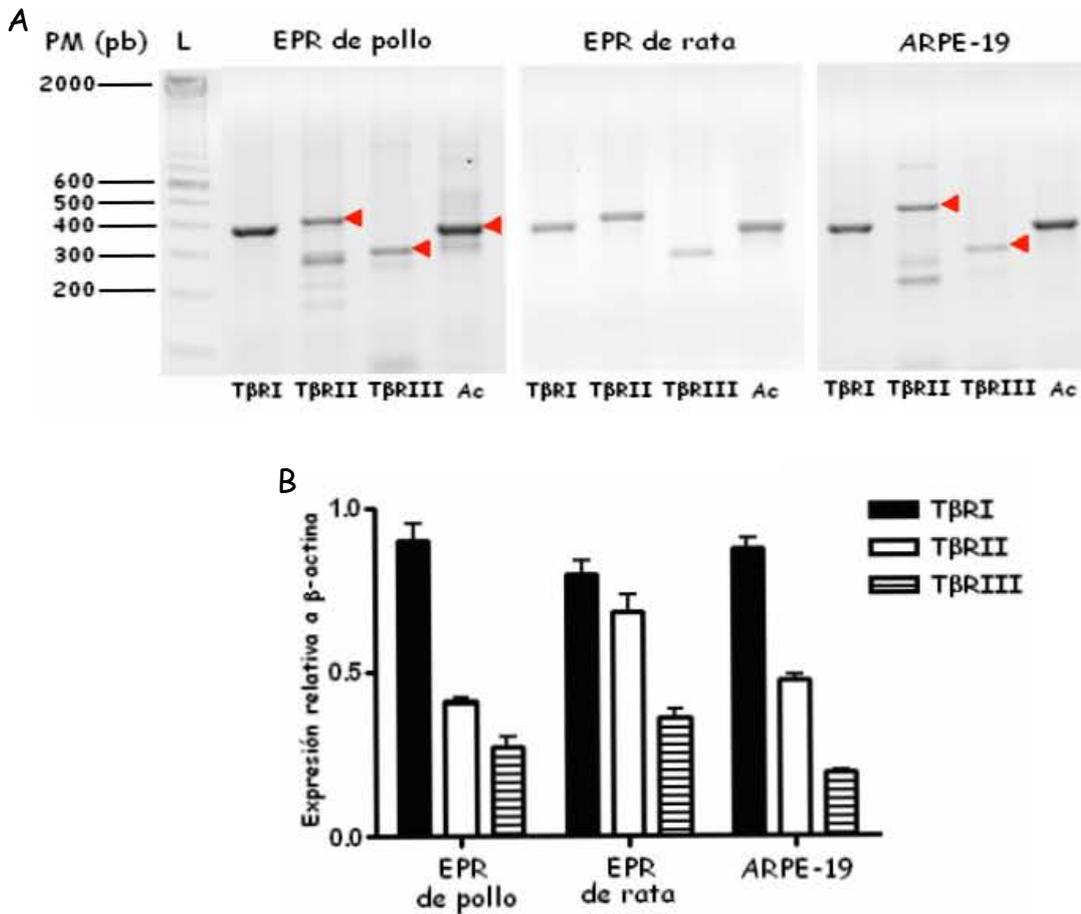


Figura 11. Expresión de los receptores de TGF- β en el EPR de pollo, de rata y en la línea celular ARPE-19. **A:** productos de la PCR en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio, con un marcador de peso molecular. **B:** Análisis cuantitativo de la expresión del T β RI (389 pb), del T β RII (400 pb) y del T β RIII (283 pb) con respecto a β -actina (328 pb). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores en las barras representan el promedio \pm la desviación estándar. (PM: peso molecular, pb: pares de bases, L: estándar de peso molecular, Ac: β -actina).

Efecto del glutamato sobre la expresión de los T β Rs en el EPR

El glutamato induce un aumento significativo en la expresión de los receptores de TGF- β de tipo II y III en el EPR de pollo a partir de las horas 12 y 6, respectivamente, misma que se mantiene en ambos casos hasta la hora 72 (Figura 12). La expresión del T β RII aumentó 1.58 veces en la hora 12, 1.77 veces en la hora 24, y 1.79 veces en las horas 48 y 72, mientras que la expresión del T β RIII aumentó 1.77 veces en la hora 6, 2.04 veces en la hora 12, 2.27 veces en la hora 24, 2.32 veces en la hora 48, y 2.24 veces en la hora 72. El T β RI en el EPR de pollo no presentó cambios significativos.

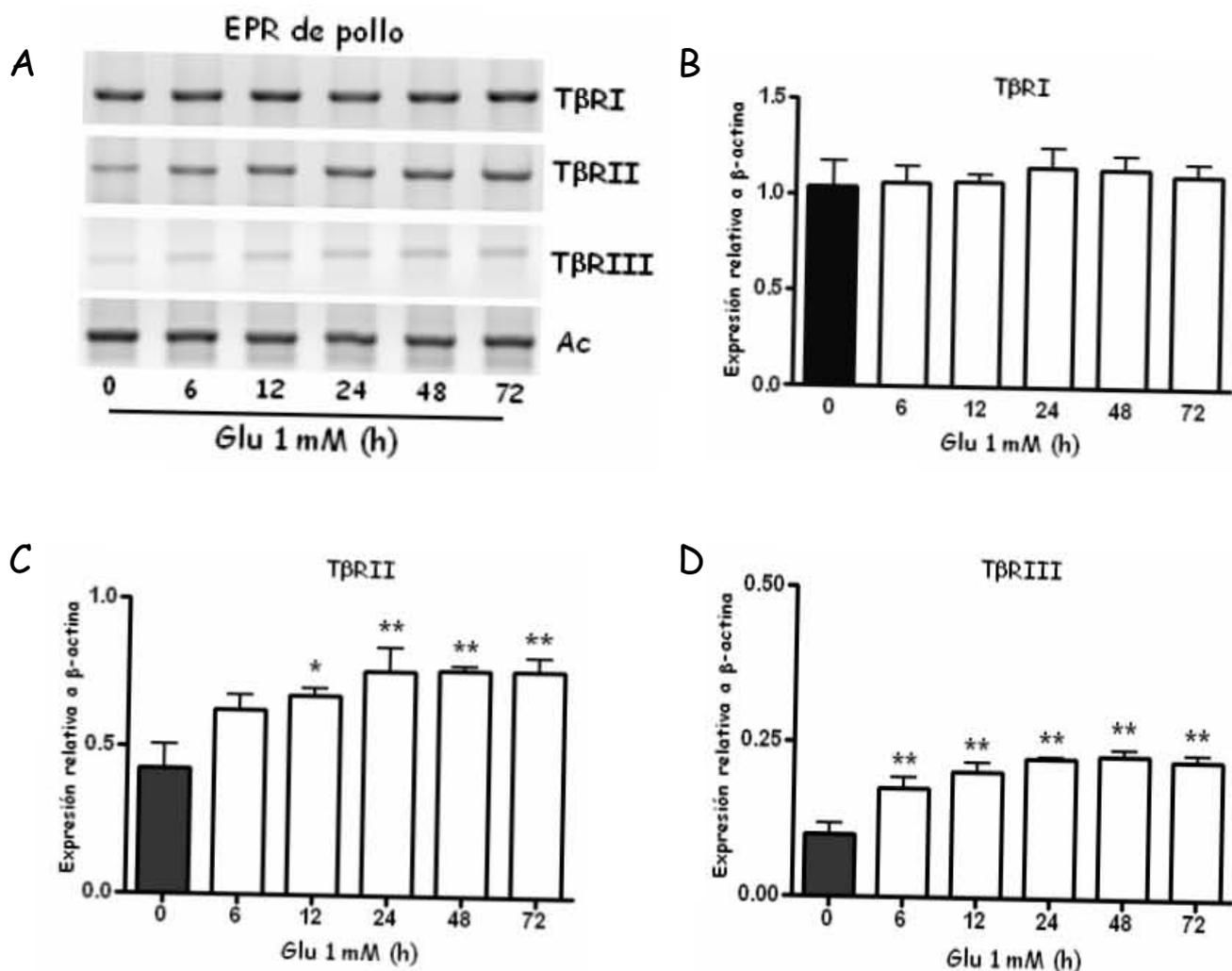


Figura 12. Efecto del glutamato sobre la expresión de los TβRs en el EPR de pollo. **A:** productos de la PCR en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. **B-D:** análisis cuantitativo de la expresión de los TβRs con respecto a β-actina. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores en las barras representan el promedio ± la desviación estándar. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (Glu: glutamato; h: horas; Ac: β-actina).

En el EPR de rata el glutamato no modificó la expresión de ninguno de los TβRs (Figura 13).

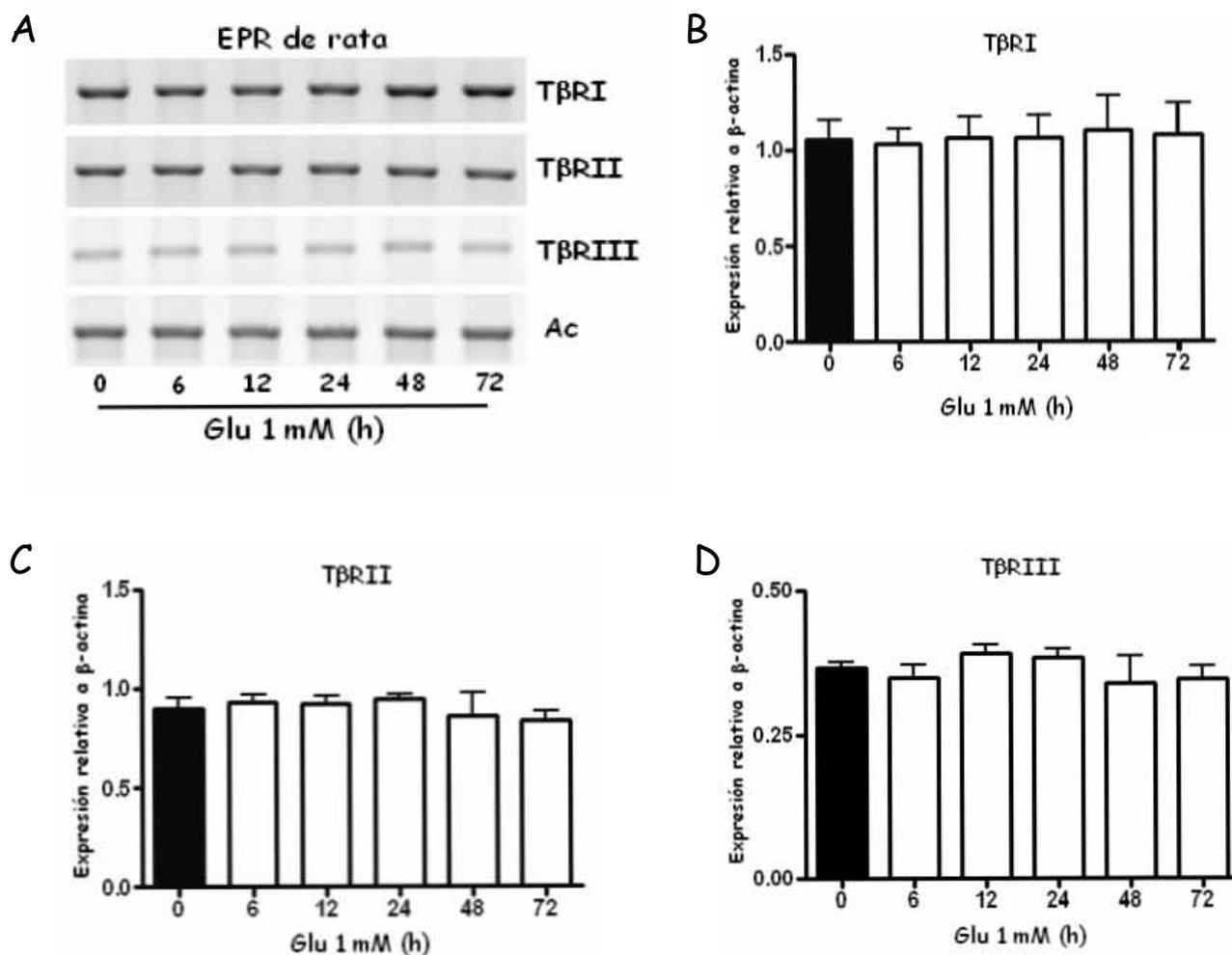


Figura 13. Efecto del glutamato sobre la expresión de los TβRs en el EPR de rata. **A:** productos de la PCR en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. **B-D:** análisis cuantitativo de la expresión de los TβRs con respecto a β-actina. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores en las barras representan el promedio ± la desviación estándar. (Glu: glutamato; h: horas; Ac: β-actina).

Al igual que en el caso anterior, el glutamato no modificó la expresión de ninguno de los TβRs en la línea ARPE 19 (Figura 14).

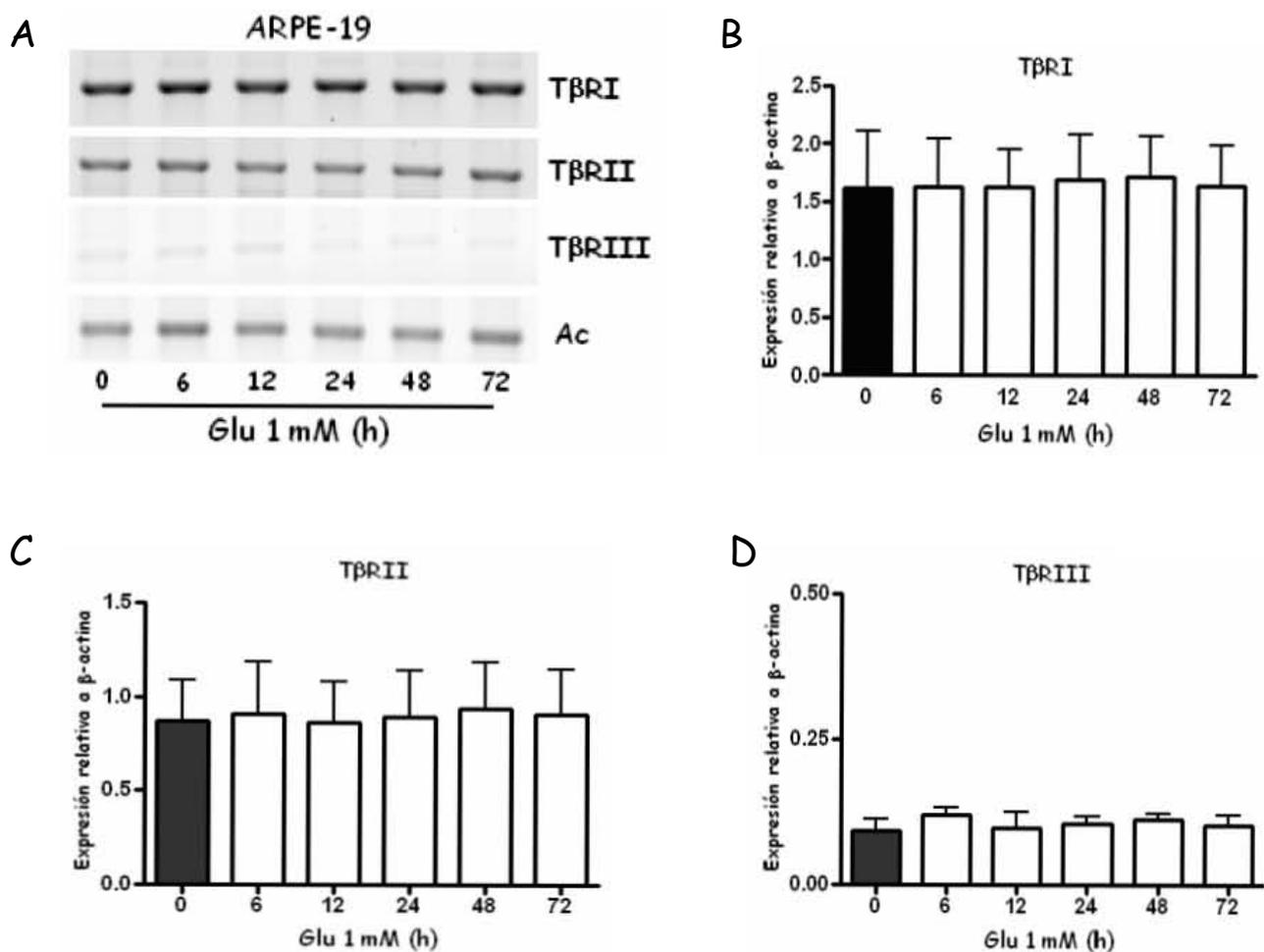


Figura 14. Efecto del glutamato sobre la expresión de los TβRs en la línea celular ARPE-19. A: productos de la PCR en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio. **B-D:** análisis cuantitativo de la expresión de los TβRs con respecto a β-actina. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. Los valores en las barras representan el promedio ± la desviación estándar. (Glu: glutamato; h: horas; Ac: β-actina).

Factores de transcripción asociados a la región 5'-UTR del TβRII y del TβRIII en el pollo

Para determinar los posibles factores de transcripción involucrados en regular la expresión del TβRII y del TβRIII en el pollo, se analizó la región 5'-UTR de cada receptor (3.0 kb río arriba de la metionina inicial) con el programa Gene2Promoter (<http://genomatix.de/>). Las secuencias de estas

regiones se obtuvieron de la base de datos del centro nacional de información biotecnológica (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/_genome/guide/chicken), con referencia en el GenBank de NW_001471633.1 para el TGFBR2, y de NW_001471740.1 para el TGFBR3. El análisis determinó la región promotora dentro de las primeras 601 pb y en ésta se encontraron numerosos sitios de unión para factores nucleares, mismos que se enlistan en la Tabla 6.

Tabla 6. Factores de transcripción asociados a la región 5'-UTR en el pollo

TGFBR2				
AHR/ARNT	EVI1	LYL1/E12	p53	TH1/E47
AP-1	GABPB1	MAZ	PBX1	TIEG
AP-2	GAGA	MAZR	PLAG1	VDR/RXR
AP-4	GC	MOK2	PU.1	WT1
AREB6	GCM1	MTATA	RFX1	ZBP89
ATF-6	GKLF	MTF-1	RP58	ZBRK1
BACH2	HIC-1	MyoD	RU49	ZF9
BRACH	HIF-1	MYT1	SMAD3	ZID
CDE	HNF-1, -4	MZF1	SP1	ZNF202
c-ETS1/P54	HOXA9	NEUROG	SP2	ZNF219
CKROX	HOXB9	NFE	SPI1	
COMP1	INSM1	NGFI-C	TAL1- α /E47	
E2F	IRF-3, -4	NMP4	TATA	
EGR-1, -2, -3	KKLF	NRSE	TGIF	
TGFBR3				
AHR/ARNT	FLI	MAZ	NXF/ARNT	USF
ATF	GC	MAZR	PAX1, 3, 5, 9	VDR/RXR
ATF-6	GCM1	MOK2	PLAG1	VMYB
CDE	GLI1	MTBF	PURAA α	WHN
CKROX	GZF1	MYC/MAX	RORA	WT1
CP2	HELT	MZF1	SMAD4	ZBP89
CREB	HES1	NF1	SP1	ZF5
DEC2	HIC-1	NFY	SP2	ZF9
E4F	HMX3	NGFI-C	SPI1	ZNF219
EGR-1, -3	INSM1	NRF1	SZF1	
EKLF	KKLF	NUDR	TAX/CREB	

Los factores sombreados podrían ser activados por el glutamato.

DISCUSIÓN

Expresión de la proteína RPE65 en cultivos primarios del EPR y no en la línea celular ARPE-19

La RPE65 es una proteína altamente conservada en las especies estudiadas, que se expresa de manera abundante, aunque no exclusiva, en el EPR de los vertebrados. Esta proteína se asocia a las membranas microsomales del EPR, y desempeña un papel clave en el metabolismo de los retinoides durante el ciclo visual. La importancia de la función de la proteína RPE65 se confirma por el hecho de que ratones knockout para la misma presentan degeneración de los fotorreceptores de la retina, y acumulación de *all-trans*-retinil ésteres en el EPR (Hamel, et al., 1993; Ma, et al., 2001; Boulanger y Redmond, 2002; Znoiko, et al., 2002; Gollapani, et al., 2003; Moiseyev, et al., 2005). Recientemente se ha propuesto que esta proteína es la isómerohidrolasa del ciclo visual, que convierte los *all-trans*-retinil ésteres a *11-cis*-retinol (Moiseyev, et al., 2005; Takahashi, et al., 2006).

Nuestro análisis utilizando la técnica de inmunofluorescencia demuestra que la proteína RPE65, utilizada como marcador bioquímico de estas células, se expresa claramente en los cultivos primarios de EPR de pollo y de rata. Sin embargo, utilizando la misma técnica, no se logró detectar la presencia de la proteína RPE65 en células de la línea ARPE-19, derivada de EPR humano.

Aunque reportes previos han demostrado la presencia del mensajero que codifica para la proteína RPE65 en células de la línea ARPE-19, se ha observado que su expresión disminuye en los subcultivos (Dunn, et al., 1996; Boulanger y Redmond, 2002). Por otro lado, la ausencia de la proteína RPE65 podría deberse no a la falta de transcripción, sino de traducción, lo que concuerda con un estudio realizado por Hamel et al (1993), en el que la expresión de la proteína RPE65 en células de EPR de bovino disminuyó progresivamente conforme avanzó el día de cultivo y no así la expresión del mRNA. Es posible que los pasajes sucesivos, que resultan en la transformación mesenquimática de las células o la falta de interacción entre las células del EPR con componentes del ambiente *in vivo*, impidan la traducción de esta proteína (Hamel, et al., 1993; López-Colomé, et al., 1994; Grisanti y Guidry, 1995; Dunn, et al., 1996).

Para confirmar el origen epitelial de las células de la línea celular ARPE-19 se utilizó como marcador bioquímico a la proteína citoqueratina (Kociok, et al., 1998; Uchida, et al., 1998), la cual se detectó de manera abundante en estas células mediante ensayos de inmunofluorescencia.

El glutamato no modifica la liberación del TGF- β en el EPR

En este trabajo se demuestra, por primera vez, que las células de EPR de pollo y de rata en cultivo secretan TGF- β de manera constitutiva. Lo mismo se observa en la línea celular ARPE-19, lo que concuerda con numerosos reportes previos en los que esta citocina se libera del EPR humano tanto *in vivo* como *in vitro* (Tanihara et al., 1993; Kvanta, 1994; Pfeffer, et al., 1994; Campochiaro, 1998; Holtkamp, et al., 1999; Tezel y Del Priore, 1999; Hirase, et al., 2005).

La cantidad de TGF- β total secretada por las células de la línea ARPE-19 (~ 450 – 570 pg/mL) es comparable con las cantidades detectadas en trabajos previos, en los que se reporta para el TGF- β 1 una concentración que va de 4 a 362 pg/mL, mientras que para la isoforma - β 2 se observa en un rango de 50 a 604 pg/mL (Holtkamp, et al., 1999; Nagineni, et al., 2002; Nagineni, et al., 2007). La cantidad de TGF- β total liberada por las células de EPR de pollo (~ 282 – 413 pg/mL) y de rata (~ 200 – 420 pg/mL) también se encuentran dentro del rango detectado para el humano.

Varios estudios han demostrado un aumento en la concentración del TGF- β en el medio como consecuencia de una lesión. La secreción de esta citocina contribuye a la reparación normal de los tejidos, mientras que su sobreexpresión se ha asociado con el desarrollo de procesos fibróticos (Roulot, et al., 1999; McCaffrey, 2000; Wen, et al., 2004; Saika, et al., 2004; Thompson, et al., 2006). En este contexto, la concentración del TGF- β en el espacio subretinal, generalmente la de la isoforma - β 2, aumenta en pacientes con VRP, retinopatía diabética proliferativa, desprendimiento regmatógeno de retina, neovascularización coroidal y en ojos que han sido sometidos al proceso de fotocoagulación (Connor et al., 1989; Matsumoto, et al., 1994; Ogata, et al., 2001; Saika, et al., 2004; Hirase, et al., 2005; Gamulescu, et al., 2006; Zacks, et al., 2006).

De igual forma, en el SNC la concentración del TGF- β , particularmente la de la isoforma - β 1, aumenta significativamente alrededor de las áreas en las que ha ocurrido una lesión por trauma, hipoxia, isquemia, excitotoxicidad y daño oxidativo. El TGF- β liberado actúa, generalmente, como un agente neuroprotector; sin embargo, algunos reportes han demostrado un efecto negativo del TGF- β sobre la sobrevivencia neuronal, ya que puede potenciar la excitotoxicidad inducida por la exposición crónica al neurotransmisor glutamato. El efecto bifásico del TGF- β podría desempeñar un papel importante en la extensión del daño y el grado de recuperación funcional del tejido, ya que podría incrementar la sobrevivencia neuronal después de un estímulo excitotóxico, o bien potenciar la muerte neuronal inducida por la actividad neurotóxica de los aminoácidos excitadores (Prehn, et al., 1993; Prehn y Krieglestein, 1994; Kane, et al., 1996; Flanders, et al., 1998; Brown, 1999; D'Onofrio, et al., 2001; Williams, et al., 2002; Dhandapani y Brann, 2003; Prehn, et al., 2004; Luo, et al., 2006).

Con respecto a la relación entre el glutamato y el TGF- β , un estudio realizado en neuronas de rata en cultivo (Dobbertin, et al., 2000) demostró que la activación prolongada de los iGluRs resulta en la disminución de TGF- β 2 en el medio y, por el contrario, el tratamiento con antagonistas de estos receptores produce un aumento en el nivel del TGF- β 2 liberado. Asimismo, se ha reportado que la estimulación selectiva de los mGluRs pertenecientes al grupo II en astrocitos induce la liberación de TGF- β debido a la activación de las vías de señalamiento tanto de las MAPKs como la de PI3K. El TGF- β secretado al medio actúa como agente neuroprotector contra el efecto excitotóxico del NMDA (Bruno, et al., 1998; D'Onofrio, et al., 2001).

En el ojo, el glutamato se libera de las neuronas de la retina como respuesta a varios tipos de estrés, como el trauma, la fotocoagulación, el desprendimiento de la retina, la isquemia, la hipoxia, etc. (Marc, et al., 1998; Uchida, et al., 1998; Diederer, et al., 2006). La evidencia anterior indica que en estas condiciones el TGF- β podría liberarse de las células gliales y de las células del EPR para actuar como un agente neuroprotector. Por otro lado, se ha demostrado que el glutamato induce la proliferación de las células del EPR en cultivo (Uchida, et al., 1998). Dado que se conoce el efecto inhibitorio del TGF- β sobre la proliferación de numerosos tipos celulares entre los que se encuentra el EPR (Moustakas y Heldin, 2005; Obata, et al., 1999; Shi y Massagué, 2003), es factible que el glutamato pudiera contrarrestar el efecto antiproliferativo del TGF- β a través de la inhibición de su secreción. Sin embargo, nuestro estudio no detectó cambios en la secreción del TGF- β por las células del EPR estimuladas con glutamato. Aunque no se observaron los cambios esperados, será interesante en estudios futuros analizar la relación entre el glutamato y el TGF- β , dado que el EPR expresa receptores para ambos compuestos neuroactivos, para lo cual se contempla:

**Estimular de manera selectiva los diferentes tipos de receptores de glutamato.* Estudios previos han mostrado que la estimulación de los iGluRs resulta en la inhibición de la secreción del TGF- β ; mientras que la estimulación de los mGluRs resulta en un aumento en su liberación (Dobbertin, et al., 2000; D'Onofrio, et al., 2001).

**Analizar la secreción del TGF- β maduro VS el TGF- β latente.* La conversión de la forma latente a la forma activa representa un importante mecanismo de control durante el señalamiento (Campochiaro, 1998; McCaffrey, 2000; Zamiri, et al., 2004); sin embargo, en este estudio se midió la liberación de TGF- β total.

**Analizar la secreción de las diferentes isoformas del TGF- β .* El anticuerpo utilizado en este trabajo reconoce a las 3 isoformas del TGF- β , y determinar si existen modificaciones en la expresión de cada isoforma sería importante ya que éstas poseen diferente actividad biológica dependiendo del tipo celular y del estadio de desarrollo embrionario. Se ha observado, por ejemplo, que en células del EPR humano el IFN- γ regula de manera positiva la secreción de TGF- β 1, mientras que regula de

manera negativa la liberación de TGF- β 2 (Kane, et al., 1996; Campochiaro, 1998; Lai, et al., 2000; Nagineni, et al., 2007).

Análisis de la expresión de los T β Rs en el EPR

En este trabajo se demostró que las células del EPR de pollo, de rata, y de humano expresan el mRNA que codifica a los tres tipos de receptores del TGF- β . Aunque la expresión génica de los T β Rs ya ha sido demostrada en el EPR humano (Kociok, et al., 1998; Mitsuhiro et al., 2003), es la primera vez que se reporta en el EPR de pollo y en el de rata.

La importancia de este resultado radica en que el mecanismo de regulación de la respuesta celular a las citocinas involucra la modulación del nivel de expresión de sus receptores en la membrana. Cambios en el perfil de expresión de los T β Rs pueden alterar significativamente la actividad del TGF- β , al modular tanto la intensidad de la respuesta celular como su duración (Ji, et al., 1999; Roulot, et al., 1999; Kim, et al., 2000; Chang, et al., 2002; Goldberg, et al., 2002; Dernyck y Zhang, 2003; Fee, et al., 2004; Huang y Huang, 2005; Yamane, et al., 2007). A continuación se mencionan algunos casos en los que cambios en la expresión de los T β Rs determinan la respuesta celular al TGF- β :

La vía de señalamiento del TGF- β se reconoce como una vía supresora de tumores, por lo que la interrupción en alguno de los componentes de esta vía se asocia con la transformación maligna de las células. La resistencia al TGF- β ocasionada por la inactivación de alguno de sus receptores por procesos como la mutación somática, la delección génica o la represión transcripcional, ha sido reportada en numerosas líneas tumorales (Bae, et al., 1995; Kim, et al., 2000; Kim, et al., 2002; Heather y Peng, 2006; Yamamoto, et al., 2006; Yamane, et al., 2007).

Adicionalmente, la transducción de señales iniciada por el TGF- β interviene en el desarrollo de procesos fibróticos y cambios en la expresión de sus receptores favorecen la fibrogénesis. Así, en modelos animales de nefropatía diabética se observa un aumento en la expresión del T β RII, mientras que la expresión de este receptor se ve atenuada en modelos animales con fibrosis hepática. En fibroblastos esclerodermáticos aumenta la expresión tanto del T β RI como del T β RII (Roulot, et al., 1999; Goldberg, et al., 2002; Yamane, et al., 2007).

Cambios en la expresión relativa de los T β Rs constituyen también un mecanismo para regular la actividad del TGF- β (Chang, et al., 2002), como sucede en células de músculo liso en las que la disminución de la expresión del T β RII con respecto al T β RI genera resistencia a los efectos antiproliferativos del TGF- β 1, como se observa en la lesión arterioesclerótica avanzada (McCaffrey, 2000). Lo mismo ocurre en pacientes con hepatitis C crónica y en un modelo animal de fibrosis hepática (Roulot et al., 1999), en los que la disminución en la expresión del T β RII favorece la

proliferación celular, mientras que la señal profibrogénica del TGF- β se mantiene a través de la síntesis de componentes de la matriz extracelular. Estos datos indican una disociación entre los efectos antiproliferativos y los efectos profibrogénicos del TGF- β , misma que parece estar modulada mediante la expresión diferencial de sus receptores. Otros estudios en este sentido demuestran cambios diferenciales significativos en la expresión del T β RII en células microvasculares durante la fase crónica del trauma cerebral, no así en la expresión del T β RI (Fee, et al., 2004), así como durante el proceso de diferenciación osteoblástica (Chang, et al., 2002).

Regulación de la expresión génica de los T β Rs

Aunque se conoce poco acerca de los factores involucrados en la regulación de la transcripción de los T β Rs (Ji, et al., 1999), algunos de ellos se mencionan a continuación:

-El IFN- γ disminuye la expresión del T β RI en monocitos humanos, mientras que el TGF- β 1 aumenta la expresión del T β RI en fibroblastos de pulmón, en células lisas del cuerpo cavernoso, y en células pancreáticas afectadas por el cáncer. Asimismo, se observó la regulación positiva de la expresión del T β RII por el EGF en fibroblastos dérmicos humanos (Yamane, et al., 2007).

-La interacción de la integrina α 2 β 1 con la colágena de tipo I disminuye la expresión de los T β Rs; mientras que la integrina α 5 β 1 unida a la fibronectina aumenta la expresión del T β RII (Yamane, et al., 2007).

-Las hormonas esteroideas y el ácido retinóico promueven la transcripción del T β RIII en células óseas, en células de músculo esquelético y en células granulosa ováricas; por el contrario, proteínas como la BMP-2 y el TGF- β reducen el nivel de expresión de este receptor (Nakayama, et al., 1994; Ji, et al., 1999; López-Casillas, et al., 2003; Omori, et al., 2005).

El análisis de las regiones promotoras de los T β Rs en la rata y el humano revela que, aunque carecen de una caja TATA para el inicio de la transcripción, cuentan con numerosos sitios de unión para factores nucleares (Bae, et al., 1995; Ji, et al., 1999; Chang, et al., 2002). Por ejemplo, el promotor del T β RII humano contiene cinco regiones reguladoras, que incluyen dos elementos reguladores positivos y dos elementos reguladores negativos. Los elementos reguladores positivos tienen secuencias de reconocimiento potenciales para los factores de transcripción AP-1 (proteína activadora), CRE/ATF, y SP1 (proteína estimuladora); así como para complejos proteicos que parecen ser nuevos factores de transcripción (Bae, et al., 1995). Recientemente se ha descubierto que miembros de la familia ETS también regulan la expresión del T β RII humano (Hahm, et al., 1999; Kim, et al., 2000; Oikawa, 2004). Con respecto al T β RIII, se ha reportado que la región promotora en la rata y el ratón presenta sitios de unión para los factores nucleares SP1, C/EBP (proteína de

unión al potenciador CCAAT), AP-2, CRE, Smad 3, Smad 4, MyoD (factor determinantes de mioblastos), MEF-2 (factor de transcripción potenciador de miocitos), BMP-2, y RXR (receptor de ácido retinóico) (Feng, et al., 1999; Ji, et al., 1999; López-Casillas, et al., 2003; Omori, et al., 2005).

El glutamato modifica la expresión del T β RII y del T β RIII en el EPR de pollo

Respecto a la expresión de los T β Rs en el EPR, no se sabe si ésta cambia en respuesta a factores externos. Los resultados de este trabajo muestran que el glutamato no modifica la expresión de los T β Rs en células del EPR de rata y en células de la línea ARPE-19. Sin embargo, este neurotransmisor induce un aumento significativo en la expresión del T β RII y del T β RIII en el EPR de pollo. Sin bien la función biológica que tendría una mayor expresión de estos receptores en las células del EPR se desconoce, el aumento en la expresión del T β RIII contribuiría con el señalamiento al promover la unión del TGF- β con su receptor de tipo II, mientras que el aumento en la expresión de este último potenciaría el señalamiento. Para determinar si los cambios observados en el mRNA de estos receptores son fisiológicamente relevantes, se podría analizar la activación de los componentes implicados en la vía de transducción de señales del TGF- β , como la fosforilación de las proteínas Smads o la transcripción a alguno de sus genes blanco. Finalmente, es importante mencionar que el aumento en la transcripción génica no necesariamente significa que ocurra lo mismo a nivel proteico (Gilbert, 2000; Alberts, et al., 2002).

El cambio observado en el pollo, y no en la rata ni el humano, podría deberse a factores como el estadio de desarrollo embrionario o el ambiente extracelular que rodea a las células del EPR. Por ejemplo, durante el desarrollo del SNC el glutamato promueve la diferenciación de las neuronas al modular procesos como la migración neuronal, el crecimiento axonal y la formación de sinapsis (Michaelis, 1998; Lee-Rivera y López-Colomé, 2005). No se sabe si este neurotransmisor interviene en el desarrollo del EPR, pero su actividad en el tejido embrionario podría diferir de la misma en el tejido adulto. Aunque el EPR de los vertebrados es muy similar tanto anatómica como embriológicamente (Marmor, 1998c), existen diferencias importantes entre el tejido ocular de las aves y el de los mamíferos. Entre ellas, mientras que la retina de los mamíferos está vascularizada, las aves poseen una retina avascular. Para cubrir el aporte de sangre necesario, las aves cuentan con un sistema de circulación interno denominado pecten oculi, un órgano glial altamente vascularizado localizado dentro del vítreo. La presencia o ausencia de vasos sanguíneos, a su vez, determina la presencia de astrocitos en las retinas vascularizadas (localizados en los sitios de contacto entre los vasos sanguíneos y el tejido nervioso), y su ausencia de las retinas avasculares, en las que la glía radial de Müller es el único tipo de célula glial (Buttery, et al., 1991; Schuck, et al., 2000).

Análisis de los posibles factores de transcripción involucrados en regular la expresión génica del T β RII y del T β RIII en el pollo

Como se ha mencionado previamente, la estimulación de los receptores de glutamato resulta en la activación de diversas vías intracelulares de señalamiento, entre las que se incluyen la vía de las MAPKs (ERK, JNK y p38) y la vía de PI3K, que finalmente regularán la expresión génica. Generalmente, se induce la transcripción de genes tempranos inmediatos que se traducen a proteínas que funcionan como nuevos factores de transcripción, regulando así la expresión de genes tardíos (López-Colomé, et al., 1994; Lerea, 1997; Michaelis, 1998; Ferrer, et al., 2001; Yoneda, et al., 2001; Kew y Kemp, 2005; Balazs, 2006; Haddad, 2005; Gerber, et al, 2007).

Con base en lo anterior, la evidencia indica que en las neuronas la administración de glutamato o de sus agonistas induce: a) la activación del complejo AP-1 a través de un rápido aumento en la transcripción de genes como c-fos, fosB, c-jun y junB, cuyos productos proteicos se dimerizan para conformar a dicho factor, y de su posterior fosforilación (Kaminska, et al., 1994; Bading, et al., 1995; Schwarzschild, et al., 1997; Herdegen y Leah, 1998; Yoneda, et al., 2001; Chen, et al., 2003), b) la fosforilación de CREB (proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP), y como consecuencia, el aumento en su actividad transcripcional (Herdegen y Leah, 1998; Ferrer, et al., 2001; Yoneda, et al., 2001; Licata y Pierce, 2003; Thomas y Huganir, 2004; Wang, et al., 2004; Haddad, 2005), c) la expresión de los genes de respuesta temprana al crecimiento (EGR): egr-1, -2, -3, y NGFI-C (proteína C inducida por el factor de crecimiento de nervios) (Bading, et al., 1995; Herdegen y Leah, 1998; Honkaniemi y Sharp, 1999; Yoneda, et al., 2001), d) la expresión y subsecuente activación por fosforilación de la proteína p53 (Grilli y Memo, 1999; Li, et al., 2002; Chen, et al., 2003), y e) el aumento en la unión del factor SP1 con el DNA (Feng, et al., 1999).

Es probable que el aumento en la transcripción del T β RII se deba a la activación de factores como AP-1, EGR-1, -2, -3 (también denominados Krox), NGFI-C, p53, y/o SP1; mientras que el aumento en la transcripción del T β RIII se deba a la activación de factores como CREB, EGR-1, -3, NGFI-C, y/o SP1. En el futuro se podrían clonar las regiones promotoras de ambos receptores, y mediante delección génica, obtener construcciones de diferentes longitudes para determinar con certeza el área encargada de regular la actividad transcripcional. Posteriormente se podrían realizar ensayos de retraso de movilidad electroforética (EMSA) para investigar qué factores de transcripción se encuentran unidos al DNA. Por último, la activación o inhibición farmacológica de los diferentes tipos de receptores de glutamato nos permitiría dilucidar el tipo de receptor involucrado, para tener una referencia de qué vías de señalamiento pueden estar involucradas.

Comparando los factores de transcripción obtenidos en este estudio con aquellos descritos en reportes previos para el humano, la rata y el ratón, encontramos varios elementos en común como:

AP-1, AP-2, ATF, miembros de la familia ETS (SPI1, PU.1, CETS1P54, GABPB), MyoD, RXR, Smad 3 y 4, y SP1. Entonces, dependiendo de la vía de señalamiento activada y del tejido, es muy probable que estos factores también intervengan en la regulación de los T β Rs II y III en el pollo.

Este estudio presenta datos funcionales sobre la regulación de la transcripción del T β R^{II} y del T β R^{III} en el pollo. El análisis de la región 5'-UTR en ambos receptores muestra un alto grado de heterogeneidad, ya que la región promotora propuesta contiene sitios de reconocimiento para una gran variedad de factores de transcripción. Esto refleja que la expresión de los T β Rs está modulada de manera tejido-específica, y que factores como el desarrollo embrionario, la respuesta ante un daño, la influencia de las hormonas, etc., determinan el nivel de expresión de estos receptores.

CONCLUSIONES

Entre varios compuestos, el TGF- β y el glutamato participan en regular las funciones normales del EPR. Cuando cambia la concentración de ambas moléculas en el espacio subretinal en respuesta a un daño, las células del EPR comienzan a proliferar y a desdiferenciarse, procesos claves en el establecimiento de desórdenes fibroproliferativos en la retina. Este estudio se llevó a cabo para determinar si el glutamato modifica la liberación de TGF- β , o la expresión de sus receptores en células del EPR, ya que se ha observado que ambas vías interactúan en otras áreas del SNC. Los resultados de este trabajo muestran que:

◆ La proteína RPE65 se expresa de manera abundante en cultivos primarios de EPR de pollo y de rata, no así en subcultivos de la línea celular ARPE-19.

◆ El EPR de las especies estudiadas secreta de manera constitutiva TGF- β , es la primera vez que se reporta que esto ocurra en el EPR de pollo y de rata. Dicha secreción no es modulada por el tratamiento con glutamato.

◆ El EPR de las especies estudiadas expresa a nivel de mRNA los tres tipos de receptores del TGF- β . Es el primer trabajo en el que se reporta su expresión génica en el EPR de pollo y de rata.

◆ El glutamato no modifica la expresión de los T β Rs en el EPR de rata ni en la línea celular ARPE-19.

◆ El glutamato induce de manera significativa la expresión de los T β Rs de tipo II y III en el EPR de pollo. Este aumento en la expresión se debe posiblemente a la activación de factores como AP-1, EGR-1, -2, -3, NGFI-C, p53, y/o SP1 para el T β RII; y a la activación de factores como CREB, EGR-1, -3, NGFI-C, y/o SP1 para el T β RIII.

Aunque no se observaron los cambios esperados, es muy posible que el glutamato y el TGF- β interactúen en un nivel diferente de la vía de transducción de señales, involucrando proteínas como las Smads o las MAPKs.

REFERENCIAS

- Abe Y, Minegishi T, Leung P. (2004) Activin receptor signaling. *Growth Factors*. **22**:105-110.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega. Barcelona, España. Pp. 429-500.
- Bading H, Segal MM, Sucher NJ, Dudek H, Lipton SA, Greenberg ME. (1995) 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*. **64**:653-664.
- Bae HW, Geiser AG, Kim DH, Chung MT, Burmester JK, Sport MB, Roberts AB, Kim SJ. (1995) Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor- β type II receptor gene. *The Journal of Biological Chemistry*. **270**:29460-29468.
- Balazs R. 2006. Trophic effect of glutamate. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **6**:961-968.
- Barnett JV, Moustakas A, Lin W, Wang XF, Lin HY, Galper JB, Maas RL. (1994) Cloning and developmental expression of the chick type II and type III TGF beta receptors. *Developmental Dynamics*. **199**:12-27.
- Blobe GC, Schiemann WP, Pepin M, Beauchemin M, Moustakas A, Lodish HF, O'Connor-McCourt M. (2001) Functional roles for the cytoplasmic domain of the type III transforming growth factor β receptor in regulating transforming growth factor β signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**:24627-24637.
- Bochaton-Piallat ML, Kapetanios AD, Donati G, Redard M, Gabbiani G, Pournaras CJ. (2000) TGF- β 1, TGF- β receptor II and ED-A fibronectin expression in myofibroblast of vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **41**:2336-2342.

Boulanger A, Redmond TM. (2002) Expression and promoter activation of the *Rpe65* gene in retinal pigment epithelium cell lines. *Current Eye Research*. **24**:368-375.

Boulton M. 1998. Melanin and the retinal pigment epithelium. En: The Retinal Pigment Epithelium. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. New York, USA. Pp. 68-85.

Brown DR. (1999) Dependence of neurons on astrocytes in a coculture system renders neurones sensitive to transforming growth factor β 1-induced glutamate toxicity. *Journal of Neurochemistry*. **72**:943-953.

Bruno V, Battaglia G, Casabona G, Copani A, Caciagli F, Nicoletti F. (1998) Neuroprotection by glial metabotropic glutamate receptors is mediated by transforming growth factor- β . *The Journal of Neuroscience*. **18**: 9594-9600.

Burnside B, Bost-Usinger L. 1998. The retinal pigment epithelial cytoskeleton. En: The Retinal Pigment Epithelium. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. USA. Pp. 41-67.

Buttery RG, Hinrichsen CFL, Lee-Weller W, Haight JR. (1991) How thick should a retina be? A comparative study of mammalian species with and without intraretinal vasculature. *Vision Research*. **31**:169-187.

Campochiaro PA. 1998. Growth factors in the retinal pigment epithelium and retina. En: The Retinal Pigment Epithelium. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. USA. Pp. 459-477.

Chang, W., Parra, M., Ji, C., Liu, Y., Eickelberg, O., McCarthy, T.L., Centrella, M. (2002) Transcriptional and post-transcriptional regulation of transforming growth factor β type II receptor expression in osteoblasts. *Gene*. **299**:65-77.

Chen RW, Qin ZH, Ren M, Kanai H, Chalecka-Franaszek E, Leeds P, Chiang DM. (2003) Regulation of c-Jun N-terminal kinase, p38 kinase and AP-1 DNA binding in cultured brain neurons:

roles in glutamate excitotoxicity and lithium neuroprotection. *Journal of Neurochemistry*. **84**:566-575.

Choi SG, Yi Y, Kim YS, Kato M, Chang J, Chung HW, Hahm KB, Yang HK, Rhee HH, Bang YJ, Kim SJ. (1998) A novel ets-related transcription factor, ERT/ESX/ESE-1, regulates expression of the transforming growth factor- β type II receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**:110-117.

Connor TB, Roberts AB, Sport MB, Danielpour D, Dart LL, Michels RG, de Bustros S, Enger C, Kato H, Lansing M, Hayashi H, Glaser BM. (1989) Correlation of fibrosis and transforming growth factor- β type 2 levels in the eye. *The Journal of Clinical Investigation*. **83**:1661-1666.

Copland JA, Luxon BA, Ajani L, Maity T, Campagnaro E, Guo H, LeGrand SN, Tamboli P, Wood CG. (2003) Genomic profiling identifies alterations in TGF β signaling through loss of TGF β receptor expression in human renal cell carcinogenesis and progression. *Oncogene*. **22**:8053-8062.

De Caestecker M. (2004) The transforming growth factor- β superfamily of receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. **15**:1-11.

Dernyck R, Zhang YE. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature Publishing Group*. **425**:577-584.

Dhandapani KM, Brann DW. (2003) Transforming growth factor- β – a neuroprotective factor in cerebral ischemia. *Cell Biochemistry and Biophysics*. **39**:13-22.

Diederer RMH, La Heij EC, Deutz NEP, Kijlstra A, Kessels AGH, van Eijk HMH, Liem ATA, Dieudonné S, Hendrikse F. (2006) Increased glutamate levels in the vitreous of patients with retinal detachment. *Experimental Eye Research*. **83**:45-50.

Dobbertin A, Gervais A, Mallat M. (2000) Activation of ionotropic glutamate receptors reduces the production of transforming growth factor-beta2 by developing neurons. *The European Journal of Neuroscience*. **12**:4589-4593.

Dong M, How T, Kirkbride KC, Gordon KJ, Lee JD, Hempel N, Kelly P, Moeller BJ, Marks JR, Blobel GC. (2007) The type III TGF-beta receptor suppresses breast cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation*. **117**:206-217.

D'Onofrio M, Cuomo L, Battaglia G, Ngomba RT, Storto M, Kingston AE, Orzi F, De Blasi A, Di Dorio P, Nicoletti F, Bruno V. (2001) Neuroprotection mediated by glial group-II metabotropic glutamate receptors requires the activation of the MAP kinase and the phosphatidylinositol-3-kinase pathways. *Journal of Neurochemistry*. **78**:435-445.

Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. (1996) ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental Eye Research*. **62**:155-169.

Fagni L, Ango F, Perroy J, Bockaert J. (2004) Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins. *Cell and Developmental Biology*. **15**:289-298.

Fee DB, Sewell DL, Andresen K, Jacques TJ, Piaskowski S, Barger BA, Hart MN, Fabry Z. (2004) Traumatic brain injury increases TGFβRII expression on endothelial cells. *Brain Research*. **1012**:52-59.

Feng Z, Chang RC, Bing G, Hudson P, Tiao N, Jin L, Hong JS. (1999) Long-term increase of Sp-1 transcription factors in the hippocampus after kainic acid treatment. *Brain Research. Molecular Brain Research*. **69**:144-148.

Ferrer I, Blanco R, Carmona M. (2001) Differential expression of active, phosphorylation-dependent MAP kinases, MAPK/ERK, SAPK/JNK and p38, and specific transcription factor substrates following quinolinic acid excitotoxicity in the rat. *Molecular Brain Research*. **94**:48-58.

Fisher SK, Anderson DH. 1998. Cellular responses of the retinal pigment epithelium to retinal detachment and reattachment. En: *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. USA. Pp. 406-419.

Flanders KC, Ren RF, Lipka CF. (1997) Transforming growth factor-βs in neurodegenerative disease. *Progress in Neurobiology*. **54**:71-85.

Gamulescu MA, Chen Y, He S, Spee C, Jin M, Ryan SJ, Hinton DR. (2006) Transforming growth factor β 2-induced myofibroblastic differentiation of human retinal pigment epithelial cells: regulation by extracellular matrix proteins and hepatocyte growth factor. *Experimental Eye Research*. **83**:212-222.

Gerber U, Gee CE, Benquet P. (2007) Metabotropic glutamate receptors: intracellular signaling pathways. *Current Opinion in Pharmacology*. **7**:56-61.

Gilbert SF. 2000. *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA. Pp. 109-138.

Goldberg HJ, Huszár T, Mózes MM, Rosivall L, Mucsi I. (2002) Overexpression of the type II transforming growth factor- β receptor inhibits fibroblast proliferation and activates extracellular signal regulated kinase and c-Jun N-terminal Kinase. *Cell Biology International*. **26**:165-174.

Gollapani DV, Maiti P, Rando RR. (2003) RPE65 operates in the vertebrate visual cycle by stereospecifically binding all-*trans*-retinyl esters. *Biochemistry*. **42**:11824-11830.

Grilli M, Memo M. Possible role of NF- κ B and p53 in the glutamate-induced pro-apoptotic neuronal pathway. *Cell Death and Differentiation*. **6**:22-27.

Grisanti S, Guidry C. (1995) Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **36**:391-405.

Gundersen D, Orłowski J, Rodriguez-Boulan E. (1991) Apical polarity of Na,K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*. **112**:863-872.

Haddad JJ. (2005) N-methyl-D-aspartate (NMDA) and the regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways: a revolving neurochemical axis for therapeutic intervention? *Progress in Neurobiology*. **77**:252-282.

Hageman GS, Kuehn MH. 1998. Biology of the interphotoreceptor matrix-retinal pigment epithelium-retina interface. En: *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. USA. Pp. 361-391.

Hahm KB, Cho K, Lee C, Im YH, Chang J, Choi SG, Sorensen PHB, Thiele CJ, Kim SJ. (1999) Repression of the gene encoding the TGF- β type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nature Genetics*. **23**:222-227.

Hall MO. 1998. Rodent models of retinal pigment epithelial disease. En: *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. USA. Pp. 247-259.

Hamel CP, Tsilou E, Pfeffer BA, Hooks JJ, Detrick B, Redmond TM. (1993) Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*. **268**:15751-15757.

He WW, Gustafson ML, Hirobe S, Donahoe PK. (1993) Developmental expression of four novel serine/threonine kinase receptors homologous to the activin/transforming growth factor-beta type II receptor family. *Developmental Dynamics*. **196**:133-142.

Heather G, Peng C. (2006) Activin receptor-like kinases: structure, function and clinical implications. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders – Drug Targets*. **6**:45-58.

Hirase K, Sugiyama T, Ikeda T, Sotozono C, Yasuhara T, Koizumi K, Kinoshita S. (2005) Transforming growth factor β_2 increases in subretinal fluid in rhegmatogenous retinal detachment with subretinal strands. *Ophthalmologica*. **219**:222-225.

Hiscott P, Sheridan CM. 1998. The retinal pigment epithelium, epiretinal membrane formation, and proliferative vitreoretinopathy. En: *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. USA. Pp. 478-491.

Hempel N, How T, Dong M, Murphy SK, Fields TA, Blobel GC. (2007) Loss of betaglycan expression in ovarian cancer: role in motility and invasion. *Cancer Research*. **67**:5231-5238.

Herdegen T, Leah JD. (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Research Reviews*. **28**:370-490.

Holtkamp GM, De Vos AF, Peek R, Kijlsta A. (1999) Analysis of the secretion pattern of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and transforming growth factor-beta 2 (TGF-b2) by human retinal pigment epithelial cells. *Clinical & Experimental Immunology*. **118**:35-40.

Honkaniemi J, Sharp FR. (1999) Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene mRNAs and decreased protein synthesis following kainic acid seizures. *The European Journal of Neuroscience*. **11**:10-17.

Huang SS., Huang JS. (2005) TGF- β control of cell proliferation. *Journal of Cellular Biochemistry*. **96**:447-462.

Hughes BA, Gallemore RP, Miller SS. 1998. Transport mechanisms in the retinal pigment epithelium. En: *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. New York, USA. Pp. 103-134.

Ji C, Chen Y, McCarthy TL, Centrella M. (1999) Cloning the promoter for transforming growth factor- β type III receptor. *The Journal of Biological Chemistry*. **274**:30487-30494.

Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. (2005) Signaling via NF- κ B in the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1745**:287-299.

Kaminska B, Filipkowski RK, Zurkowsawa G, Lason W, Przewlocki R, Kaczmarek L. (1994) Dynamic changes in the composition of the AP-1 transcription factor DNA-binding activity in rat brain following kainate-induced seizures and cell death. *The European Journal of Neuroscience*. **6**:1558-1566.

Kane CJM, Brown G, Phelan KD. (1996) Transforming growth factor- β 2 increases NMDA receptor-mediated excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons independently of glia. *Neuroscience Letters*. **204**: 93-96.

Kandel ER, Schawrtz JH, Jessell TM. 2000. Principles of Neural Science. McGraw-Hill. USA. Pp. 507-522.

Kew JNC, Kemp JA. (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*. **179**:4-29.

Kim IK, Arroyo JG. (2002) Mechanisms in proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology Clinics of North America*. **15**:81-86.

Kim JH, Wilder PJ, Hou J, Nowling T, Rizzino A. (2002) Activation of the murine type II transforming growth factor- β receptor gene. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**: 17520-17530.

Kim SJ, Im YH, Markowitz SD, Bang YJ. (2000) Molecular mechanisms of inactivation of TGF- β receptors during carcinogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **11**:159-168.

Kociok N, Heppekausen H, Schraermeyer U, Esser P, Thumann G, Grisanti S, Heimann K. (1998). The mRNA expression of cytokines and their receptors in cultured iris pigment epithelial cells: a comparison with retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research*. **67**:237-250.

Kvanta, A. (1994) Expression and secretion of transforming growth factor-beta in transformed and nontransformed retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Research*. **26**:361-367.

Lai YT, Beason KB, Brames GP, Desgrosellier JS, Cleggett C, Shaw MV, Brown CB, Barnett JV. (2000) Activin receptor-like kinase 2 can mediate atrioventricular cushion transformation. *Developmental Biology*. **222**:1-11.

Le Roy C, Wrana JL. (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **6**:112-126.

Lee-Rivera I, López-Colomé AM. (2005) Relación de la estructura de los receptores NMDA con su función en la retina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. **8**:61-71.

Lee-Rivera I, Zarain-Herzberg A, López-Colomé AM. (2003) Developmental expression of N-Methyl-D-Aspartate glutamate receptor 1 splice variants in the chick retina. *Journal of Neuroscience Research*. **73**:369-383.

Lerea LS. (1997) Glutamate receptors and gene induction: signaling from receptor to nucleus. *Cell Signal*. **9**:219-226.

Li Y, Schlamp CL, Poulsen GL, Jackson MW, Griep AE, Nickells RW. (2002) p53 regulates apoptotic retinal ganglion cell death induced by N-methyl-D-aspartate. *Molecular vision*. **8**:341-350.

Licata SC, Pierce RC. (2003) The roles of calcium/calmodulin-dependent and Ras/mitogen-activated protein kinases in the development of psychostimulant-induced behavioral sensitization. *Journal of Neurochemistry*. **85**:14-22.

Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. (1992) Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell*. **68**:775-785.

López-Casillas F, Cheifetz S, Doody J, Andres JL, Lane WS, Massagué J. (1991) Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell*. **67**:785-795.

López-Casillas F, Riquelme C, Pérez-Kato Y, Ponce Castañeda MV, Osses N, Esparza-López J, Gonzáles-Núñez G, Cabello-Verrugio C, Mendoza V, Troncoso V, Brandan E. (2003) Betaglycan expression is transcriptionally up-regulated during skeletal muscle differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**:382-390.

López-Colomé AM, Salceda R, Fragoso G. (1993) Specific interaction of glutamate with membranes from cultured retinal pigment epithelium. *Journal of Neuroscience Research*. **34**:454-461.

López-Colomé AM, Fragoso G, Wright CE, Sturman JA. (1994) Excitatory amino acid receptors in membranes from cultured human retinal pigment epithelium. *Current Eye Research*. **13**:553-560.

Luo J, Lin AH, Masliah E, Wyss-Coray T. (2006) Bioluminescence imaging of Smad signaling in living mice shows correlation with excitotoxic neurodegeneration. *PNAS*. **103**:18326-18331.

Ma JX, Zhang J, Othersen KL, Moiseyev G, Ablonczy Z, Redmond TM, Chen Y, Crouch RK. (2001) Expression, purification, and MALDI analysis of RPE65. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **42**:1429-1435.

Mäenpää H, Gegelashvili G, Tähti H. (2004) Expression of glutamate transporter subtypes in cultured retinal pigment epithelial and retinoblastoma cells. *Current Eye Research*. **28**:159-165.

Marc RE, Murry RF, Fisher SK, Linberg KA, Lewis GP. (1998) Amino acid signatures in the detached cat retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **39**:2694-1702.

Marmor MF. 1998a. Mechanisms of retinal adhesiveness. En: The Retinal Pigment Epithelium. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. USA. Pp. 392-405.

Marmor MF. 1998b. Structure, function, and disease of the retinal pigment epithelium. En: The Retinal Pigment Epithelium. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. USA. Pp. 3-9.

Marmor MF. 1998c. Comparative and evolutionary aspects of the retinal pigment epithelium. En: The Retinal Pigment Epithelium. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. USA. Pp. 23-37.

Massagué J. (2000) How cells read TGF- β signals. *Nature Reviews – Molecular Cell Biology*. **1**:169-178.

Matsumoto M, Yoshimura N, Honda Y. 1994. Increased production of transforming growth factor- β 2 from cultured human retinal pigment epithelial cells by photocoagulation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **35**:4245-4252.

Mayer ML. (2005) Glutamate receptor ion channels. *Current Opinion in Neurobiology*. **15**:282-288.

Mao X, Yang SH, Simpkins JW, Barger SW. (2007) Glutamate receptor activation evokes calpain-mediated degradation of Sp3 and Sp4, the prominent Sp-family transcription factors in neurons. *Journal of Neurochemistry*. **100**:1300-1314.

McCaffrey, T.A. (2000) TGF- β s and TGF- β receptors in atherosclerosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **11**:103-114.

Méndez JA, López-Bayghen E, Ortega A. (2005) Glutamate activation of Oct-2 in cultured chick Bergmann glial cells: involvement of NF κ B. *Journal of Neuroscience Research*. **81**:21-30.

Mey J, Thanos S. (2000) Development of the visual system of the chick I. Cell differentiation and histogenesis. *Brain Research Reviews*. **32**:343-379.

Michaelis EK. (1998) Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*. **54**:369-415.

Mitsuhiro MRKH, Eguchi S, Yamashita H. (2003) Regulation mechanisms of retinal pigment epithelial cell migration by the TGF- β superfamily. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. **81**:630-638.

Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, Wu BX, Ma JX. (2005) RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *PNAS*. **102**:12413-12418.

Moren A, Ichijo H, Miyazono K. (1992) Molecular cloning and characterization of the human and porcine transforming growth factor-beta type III receptors. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. **189**:356-362.

Moustakas A, Heldin CH. (2005) Non-Smad TGF- β signals. *Journal of Cell Science*. **118**:3573-3584.

Nagineni CN, Detrick B, Hooks JJ. (2002) Transforming growth factor- β expression in human retinal pigment epithelial cells is enhanced by *Toxoplasma gondii*: a possible role in the immunopathogenesis of retinochoroiditis. *Clinical & Experimental Immunology*. **128**(2):372-378.

Nagineeni CN, Cherukuri KS, Kutty V, Detrick B, Hooks JJ. (2007) Interferon- γ differentially regulates TGF- β 1 and TGF- β 2 expression in human retinal pigment epithelial cells through JAK-STAT pathway. *Journal of Cellular Physiology*. **210**:192-200.

Nakayama H, Ichikawa F, Andres JL, Massagué J, Noda M. (1994) Dexamethasone enhancement of betaglycan (TGF- β type III receptor) gene expression in osteoblast-like cells. *Experimental Cell Research*. **211**:301-306.

Nohno T, Sumitomo S, Ishikawa T, Ando C, Nishida S, Noji S, Saito T. (1993) Nucleotide sequence of a cDNA encoding the chicken receptor protein kinase of the TGF- β receptor family. *DNA Sequence*. **3**:393-396.

Obata H, Kaji Y, Yamada H, Kato M, Tsuru T, Yamashita H. (1999) Expression of transforming growth factor-beta superfamily receptors in rat eyes. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. **77**:151-156.

Ogata N, Ando A, Uyama M, Matsumara M. (2001) Expression of cytokines and transcription factors in photocoagulated human retinal pigment epithelial cells. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. **239**:87-95.

Oikawa T. (2004) ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Science*. **95**:626-633.

Omori Y, Nakamura K, Yamashita S, Matsuda H, Mizutani T, Miyamoto K, Minegishi T. (2005) Effect of follicle-stimulating hormone and estrogen on the expression of betaglycan messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. **146**:3379-3386.

Pastor JC, Rodríguez de la Rúa E, Martín F. (2002) Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Progress in Retinal and Eye Research*. **21**:127-144.

Pfeffer BA, Flanders KC, Guérin CJ, Danielpour D, Anderson DH. (1994) Transforming growth factor beta 2 is the predominant isoform in the neural retina, retinal pigment epithelium-choroid and vitreous of the monkey eye. *Experimental Eye Research*. **59**:323-333.

Prehn JHM, Peruche B, Unsicker K, Kriegstein J. (1993) Isoform-specific effects of transforming growth factor-beta on degeneration of primary neuronal cultures induced by cytotoxic hypoxia or glutamate. *Journal of Neurochemistry*. **60**:1665-1672.

Prehn, JHM, Kriegstein J. (1994) Opposing effects of transforming growth factor- β 1 on glutamate neurotoxicity. *Neuroscience*. **60**:7-10.

Prehn, JHM, Bindokas VP, Marcuccilli CJ, Krajewski S, Reed JC, Millar RJ. (1994) Regulation of neuronal Bcl2 protein expression and calcium homeostasis by transforming growth factor type β confers wide-ranging protection on rat hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**:12599-12603.

Roulot, D., Sevcsik, A.M., Coste, T., Strosberg, A.D., Marullo, S. (1999) Role of Transforming Growth Factor β Type II Receptor in Hepatic Fibrosis: Studies of Human Chronic Hepatitis C and Experimental Fibrosis in Rats. *Hepatology*. **29**:1730-1738.

Saika S. (2006) TGF β pathobiology in the eye. *Laboratory Investigation*. **86**:106-115.

Saika S, Kono-Saika S, Tanaka T, Yamanaka O, Ohnishi Y, Sato M, Muragaki Y, Ooshima A, Yoo J, Flanders KC, Roberts AB. (2004) Smad3 is required for dedifferentiation of retinal pigment epithelium following retinal detachment in mice. *Laboratory Investigation*. **84**:1245-1258.

Schraermeyer U, Heimann K. (1999) Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Research*. **12**:219-236.

Schuck J, Gerhardt H, Wolburg H. (2000) The peripapillary glia of the optic nerve head in the chicken retina. *The Anatomical Record*. **259**:263-275.

Schwarzschild MA, Cole RL, Hyman SE. (1997) Glutamate, but no dopamine, stimulates stress-activated protein kinase and AP-1 mediated transcription in striatal neurons. *The Journal of Neuroscience*. **17**:3455-3466.

Sharifi N, Hurt EM, Kawasaki BT, Farrar WL. (2007) TGFBR3 loss and consequences in prostate cancer. *Prostate*. **67**:301-311.

Shi Y, Massagué J. (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. **113**:685-700.

Spaide RF, Yannuzzi LA. 1998. Manifestations and pathophysiology of serous detachment of the retinal pigment epithelium and retina. En: *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor MF, Wolfensberg TJ. Oxford University Press. USA. Pp. 439-455.

Strauss O. (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*. **85**:845-881.

Sun L, Chen C. (1997) Expression of transforming growth factor beta type III receptor suppresses tumorigenicity of human breast cancer MDA-MB- 231 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**:25367-25372.

Takahashi Y, Moiseyev G, Chen Y, Ma JX. (2006) The roles of three palmitoylation sites of RPE65 in its membrane association and isomerohydrolase activity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **47**:5191-5196.

Tanihara H, Yoshida M, Matsumoto M, Yoshimura N. 1993. Identification of transforming growth factor- β expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **34**:413-419.

Tezel, T.H., Del Priore, L.V. (1999) TGF beta secretion modulates the density-dependent growth of pig retinal pigment epithelium in vitro. *Ophthalmic Research*. **31**:192-202.

Thomas GM, Hugnair RL. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Reviews. Neuroscience*. **5**:173-183.

Thompson HGR, Mih JD, Krasieva TB, Tromberg BJ, George SC. (2006) Epithelial-derived TGF- β 2 modulates basal and wound-healing subepithelial matrix homeostasis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. **291**:L1277-L1285.

Tsuchida K, Lewis KA, Mathews LS, Vale WW. (1993) Molecular characterization of rat transforming growth factor- β type II receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **191**:790-795.

Turley RS, Finger EC, Hempel N, How T, Fields TA, Blobe GC. (2007) The type III transforming growth factor-beta receptor as a novel tumor suppressor gene in prostate cancer. *Cancer Research*. **67**:1090-1098.

Uchida N, Kiuchi Y, Miyamoto K, Uchida J, Tobe T, Motoso T, Shioda S, Nakai Y, Koide R, Oguchi K. (1998) Glutamate-stimulated proliferation of rat retinal pigment epithelial cells. *European Journal of Pharmacology*. **343**:265-273.

Vellucci VF, Reiss M. (1997) Cloning and genomic organization of the human transforming growth factor- β type I receptor gene. *Genomics*. **46**:278-283.

Venkatasubbarao K, Ahmed MM, Mohiuddin M, Swiderski C, Lee E, Gower WR, Salhab KF, McGrath P, Strodel W, Freeman WJ. (2000). Differential expression of transforming growth factor beta receptors in human pancreatic adenocarcinoma. *Anticancer Research*. **20**:43-51.

Wang JQ, Tang Q, Parelkar NK, liu Z, Smadani S, Choe ES, Yang L, Mao L. (2004) Glutamate signaling to Ras-MAPK in striatal neurons. *Molecular Neurobiology*. **29**:1-14.

Wang XF, Lin HY, Ng-Eaton E, Downward J, Lodish HF, Weinberg RA. (1991) Expression cloning and characterization of the TGF- β type III receptor. *Cell*. **67**:797-805.

Wen FQ, Liu X, Kobayashi T, Abe S, Fang Q, Kohyama T, Ertl R, Terasaki Y, Manouilova L, Rennard SI. (2004) Interferon- γ Inhibits Transforming Growth Factor- β Production in Human Airway Epithelial Cells by Targeting Smads. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **30**:816-822.

Williams S, Souchelnytskyi S, Danik M. (2002) TGF β 2 mediates rapid inhibition of calcium influx in identified cholinergic basal forebrain neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **290**:1321-1327.

Yamamoto N, Imai J, Watanabe M, Hirio N, Sugano S, Yoshino G. (2006) Restoration of transforming growth factor- β type II receptor reduces tumorigenicity in the human adrenocortical carcinoma SW-13 cell line. *Hormone & Metabolic Research*. **38**:159-166.

Yamane K, Asano Y, Tamaki K, Ihn H. (2007) Epidermal growth factor up-regulates transforming growth factor- β receptor type II in human dermal fibroblasts via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochemical and Biophysical Communications*. **352**:69-77.

Yoneda Y, Kuramoto N, Kitayama T, Hinoi E. (2001) Consolidation of transient ionotropic glutamate signals through nuclear transcription factors in the brain. *Progress in Neurobiology*. **63**:697-719.

Zamiri P, Masli S, Kitaichi N, Taylor AW, Streilen JW. (2005) Thrombospondin plays a vital role in the immune privilege of the eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **46**:908-919.

Zacks DN, Han Y, Zeng Y, Swaroop, A. (2006) Activation of signaling pathways and stress-response genes in an experimental model of retinal detachment. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **47**:1691-1695.

Znoiko SL, Crouch RK, Moiseyev G, Ma JX. (2002) Identification of the RPE65 protein in mammalian cone photoreceptors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **43**:1604-1609.