

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

Acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en células aisladas del epitelio pigmentario de la retina de pollo

TESIS

que para obtener el título de

BIOLOGO

presenta

Juan Rafael Riesgo Escovar

México, D. F.

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE

Introducción.....	pg. 3
1. El epitelio pigmentario de la retina.....	pg. 3
a) Embriología del epitelio pigmentario.....	pg. 3
b) Morfología y fisiología.....	pg. 6
1. Membranas y adhesión de la retina y el epitelio pigmentario.....	pg. 6
2. Interior celular.....	pg. 8
3. Fagocitosis.....	pg. 9
4. Cultivo.....	pg. 10
c) Propiedades eléctricas.....	pg. 11
d) Transporte de iones.....	pg. 12
2. El calcio.....	pg. 13
Objetivos.....	pg. 18
Materiales y Métodos.....	pg. 19
Animales.....	pg. 19
Aislamiento de las células.....	pg. 19
Acumulación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .....	pg. 20
Liberación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .....	pg. 21
Determinación de proteína.....	pg. 21
Determinación de melanina.....	pg. 21
Estadística.....	pg. 22

Resultados.....	pg. 24
Preparación.....	pg. 24
Efecto de la concentración de proteínas y del tiempo de incubación sobre la acumulación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .....	pg. 24
Acumulación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ durante el desarrollo en embri- ones de pollo.....	pg. 26
Acumulación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en distintas variedades de po- llos.....	pg. 26
Efecto de la iluminación sobre la acumulación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .....	pg. 27
Melanina.....	pg. 28
Gráficas y tablas.....	pg. 29
Discusión.....	pg. 37
1. Células pigmentadas.....	pg. 37
2. Caracterización del transporte.....	pg. 39
3. Posible significación funcional.....	pg. 42
4. Desarrollo.....	pg. 44
5. Relación con la pigmentación.....	pg. 45
Bibliografía.....	pg. 48
Índice de Figuras.....	pg. 57

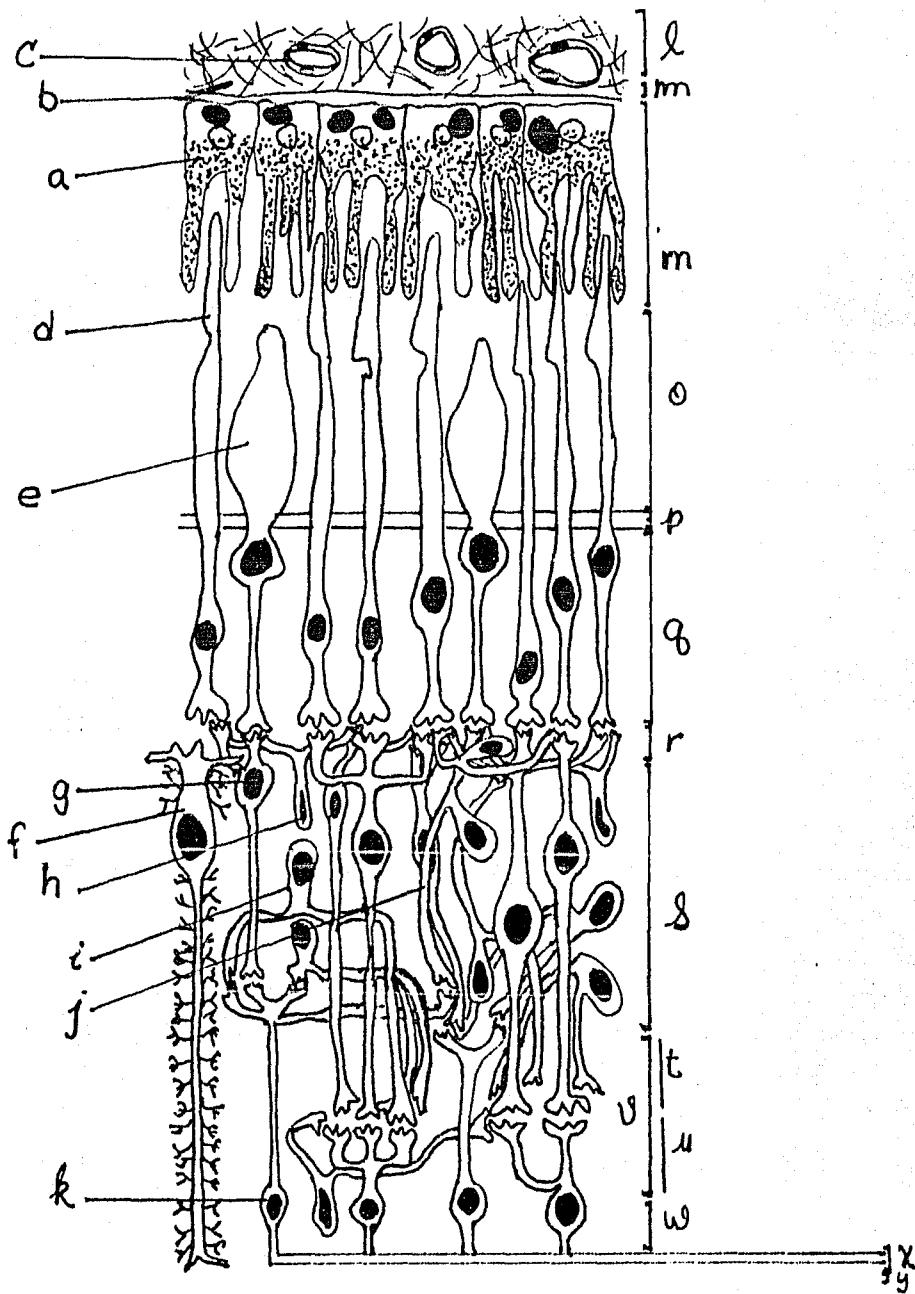
## INTRODUCCION

### 1. El epitelio pigmentario de la retina.

El epitelio pigmentario de la retina adulta es una monocapa de células cuboidales-columnares, localizadas entre la retina neural y la coroides en la parte posterior del globo ocular de los vertebrados. (Figura #1) Las células tienden a ser más alargadas y estrechas en la fovea y más anchas y cortas hacia la ora serrata, lugar donde termina la retina neural.

El epitelio pigmentario de la retina tradicionalmente se ha catalogado como un tejido auxiliar, con funciones de carácter secundario en el proceso de la visión. Recientemente ha surgido un interés creciente por el epitelio pigmentario, pues se ha descubierto su participación activa en multitud de procesos concomitantes al de la visión. Imbricado tanto física como funcionalmente con los fotorreceptores, permite la sobrevivencia de éstos y establece con ellos una multiforme y rica relación metabólica y de protección. Se necesita ver a la célula fotorreceptora no como una unidad independiente y autosuficiente, sino al binomio fotorreceptor-célula del epitelio pigmentario con la cual interactúa, como la unidad necesaria para el proceso primario del fenómeno visual.

Embriología del epitelio pigmentario.- Se ha podido localizar a las células que dan origen al epitelio pigmentario y a la retina neural aún antes de la inducción de estos tejidos en una porción frontal de la placa neural. Al formarse el tubo neural en el embrión estas zonas forman una ligera depresión a ambos lados de



la porción más rostral de esta estructura -las placas ópticas- y migran hacia la parte frontal del embrión como vesículas ópticas primarias, en donde, en contacto ya con el ectodermo, ocurre la inducción recíproca de la retina neural y del cristalino del ojo. La porción anterior de la vesícula óptica se invagina hasta entrar en contacto con la porción más posterior y prácticamente oblitera el espacio interno de la vesícula -el espacio subretiniano- y forma la copa óptica. La parte posterior de la vesícula óptica por su parte, se induce a diferenciarse en epitelio pigmentario al quedar en contacto con el mesénquima periorcular. El epitelio pigmentario, a su vez, induce la formación de la coroides. El contacto entre la retina neural y el epitelio pigmentario durante la diferenciación de ambas estructuras es necesario, ya que los fotorreceptores no son capaces de desarrollarse correctamente en ausencia del epitelio pigmentario, y éste puede transdiferenciarse en retina neural, al menos en algunas especies, si falta la retina neural. Las células del epitelio pigmentario de la retina son de las primeras que salen del ciclo mitótico y se diferencian. La diferenciación va acompañada por la formación de gránulos de pigmento, y en el pollo se inicia a partir del tercer día de desarrollo. (99 y citado en 115)

Los gránulos de pigmento se forman a partir de premelanosomas, que son organelos rodeados por una membrana y de interior fibrilar. Los premelanosomas se forman por la fusión de vesículas del Golgi, que contienen las enzimas que sintetizan a la melanina, con vesículas del retículo endoplásmico liso. La síntesis de melanina, que es un polímero estructuralmente poco definido com-

puesto de unidades de indol -5,6- quinonas, se inicia en el interior de los mismos. Una vez finalizada la síntesis de melanina, los melanosomas pierden su apariencia fibrilar y se vuelven opacos a los electrones. Estos melanosomas pueden ser translocados a diferentes partes de la célula en respuesta a las condiciones de iluminación. (11, 15, 48, 115) El epitelio pigmentario absorbe energía en el espectro visible y en el ultravioleta por medio de los gránulos de melanina y evita la dispersión excesiva de los fotones incidentes. La energía absorbida por la melanina se irradia en forma de calor. En conjunción con otras células pigmentadas del ojo, evita que la luz excesiva dañe los fotorreceptores. Los animales albinos, que no sintetizan melanina, son más susceptibles que los pigmentados al daño fótico. (59, 60, 61, 62, 63, 64, 85, 90, 91 y 115) El epitelio pigmentario también puede sufrir daños por efecto de la luz (58).

El crecimiento posterior de este tejido se da preferentemente en el tamaño de las células, aunque siguen presentándose algunas divisiones mitóticas. El epitelio pigmentario fagocita los gránulos de pigmento que expulsan algunas de las células de la retina neural durante la diferenciación. También se ha demostrado una actividad fagocítica cíclica en fetos (43 y 103). Así, al término del desarrollo del ojo, el epitelio pigmentario de la retina cubre todo el hemisferio posterior del mismo, desde el ora serrata hasta el nervio óptico. (115)



Morfología y Fisiología.-.

Membranas y adhesión de la retina y el epitelio pigmentario. La membrana plasmática de las células del epitelio pigmentario puede dividirse en dos zonas claramente diferenciadas: la membrana apical, que ve hacia la retina neural y está en estrecho contacto con los segmentos externos de los fotorreceptores, y la membrana basolateral, que mira hacia la coroides. Ambas membranas están separadas por un complejo de barra terminal, que forma uniones estrechas y desmosomas de banda. Intracelularmente, es posible identificar una estructura circular de microfilamentos que se localiza por debajo de las uniones estrechas y desmosomas de banda, y que corresponde a parte de esta estructura. (40 y 81) Estas uniones dividen también, efectivamente, a los compartimientos subretiniano del coroidal, e impiden el paso de solutos y de iones de un compartimiento a otro si no es por la vía celular. (55 y 66) Esta barrera forma parte de la barrera hematorretiniana, de características similares a la barrera hematoencefálica. La membrana basal está fuertemente interdigitada, forma túbulos intracitoplásmicos así como gran cantidad de digitaciones, al parecer por influencia de los capilares coroidales, y con evidentes funciones de absorción y transporte. (54, 56, 57 y 115) Estas membranas basales presentan hemidesmosomas con la membrana basal del epitelio, lo que explica en parte la gran adhesividad existente entre el epitelio pigmentario y la coroides.

Existe una membrana translúcida acelular entre las células del epitelio pigmentario y la coroides, llamada membrana de Bruch. La membrana de Bruch está constituida por cinco capas:

la primera es la membrana basal del epitelio pigmentario, y está constituida por filamentos finos; la siguiente está formada por fibras de colágena (capa de colágena interna), una capa central de fibras elásticas de diversos tamaños y calibres (capa elástica media), la capa de colágena externa, de menor grosor que la interna, y finalmente en aquellos lugares en donde existen capilares coroideos, la membrana basal de las células endoteliales de los capilares. (115) Recientemente se ha reportado la existencia de lamininas, integrina y fibronectinas en esta membrana basal. (42, 83 y 86) Las células del epitelio pigmentario depositan material residual en esta membrana, depósito que aumenta con la edad (70), que en condiciones aumentan notablemente. (45 y 115)

Las membranas laterales presentan algunos desmosomas de punto. En condiciones patológicas los capilares pueden invadir las e inducir la formación de interdigitaciones. La membrana apical está orientada hacia el espacio subretiniano, espacio que comparten con los segmentos externos de los fotorreceptores. Las células del epitelio pigmentario son las responsables de las fuerzas de adhesión existentes entre la retina neural y el propio epitelio, producidas en parte por la absorción neta de fluidos hacia la coroides a través del espacio subretiniano. Esta absorción de fluidos es un fenómeno activo y está asociado a un transporte de bicarbonato y protones e influido por los niveles de AMPc en la rana. (74, 75 y 115). Se han identificado receptores a varias sustancias neuroactivas ligadas a AMPc en el epitelio

pigmentario del pollo (51). En menor grado contribuyen a la adhesión de la retina, la matriz interfotorreceptor secretada en parte por las células del epitelio pigmentario, la interdigitación de sus microvellosidades apicales y los segmentos externos de los fotorreceptores. Las células del epitelio pigmentario secretan enzimas hidrolíticas a este espacio (1).

Las microvellosidades de la membrana apical del epitelio pigmentario son alargadas y delgadas, con citoplasma más o menos denso, con retículo endoplásmico liso, mitocondrias y gránulos de pigmento o bien planas, anchas y con citoplasma translúcido a los electrones.

Interior celular. En el citoplasma existen los organelos típicos de células eucariontes. El núcleo es basal y las células pueden poseer más de uno. El retículo endoplásmico liso existe en grandes cantidades y tiende a concentrarse en la parte apical de las células y en algunas microvellosidades. Este retículo endoplásmico liso presenta varios subtipos: estructuras laminadas, tubulares, cisternas paralelas o cisternas anilladas. Una estructura derivada del retículo endoplásmico liso son los cuerpos mieloides, grupos de sacos membranosos presentes en las células del epitelio pigmentario de todos los vertebrados menos los mamíferos, implicados tal vez en fenómenos de migración de pigmentos (115) y relacionados con el metabolismo de la vitamina A al igual que los microcuerpos, organelos que también parecen derivarse del retículo endoplásmico liso, pues exhiben continuidad con este último. Las células del epitelio pigmentario transportan y metabolizan la vitamina A, precursor de los pigmentos

visuales. Se ha demostrado la presencia de proteínas atrapadoras de vitamina A solubles, unidas a membranas y extracelulares, en el espacio subretiniano. (12, 107, 108 y 115 ) El retículo endoplásmico rugoso está presente en menor cantidad que el liso. El citoesqueleto de las células del epitelio pigmentario contiene como componente mas abundante a la actina, aunque se ha identificado a microtúbulos y filamentos intermedios compuestos de vimentina. (22, 28 y 115)

Fagocitosis. Una de las funciones mas sobresalientes del epitelio pigmentario es su actividad fagocítica. La capacidad fagocítica de las células del epitelio pigmentario es muy alta; Young y Bok (citado en 115) calculan que son las células que fagocitan la mayor cantidad de material en los vertebrados. La fagocitosis se presenta de manera periódica, y según las especies, puede ser circádica. Se ha demostrado que existe un reconocimiento entre los segmentos externos y las células del epitelio pigmentario para la fagocitosis, aunque las células del epitelio pigmentario pueden fagocitar otros materiales. Este fenómeno es muy importante, porque permite el continuo recambio de los segmentos externos de los fotorreceptores. En condiciones patológicas, se observa que su falta o disminución traen como consecuencia la degeneración de los fotorreceptores y la pérdida de la función visual. (2, 7, 8, 9, 21, 22, 31, 39, 41, 43, 52, 65, 71, 72, 73, 80, 87, 94, 95, 103, 104, 109 y 115)

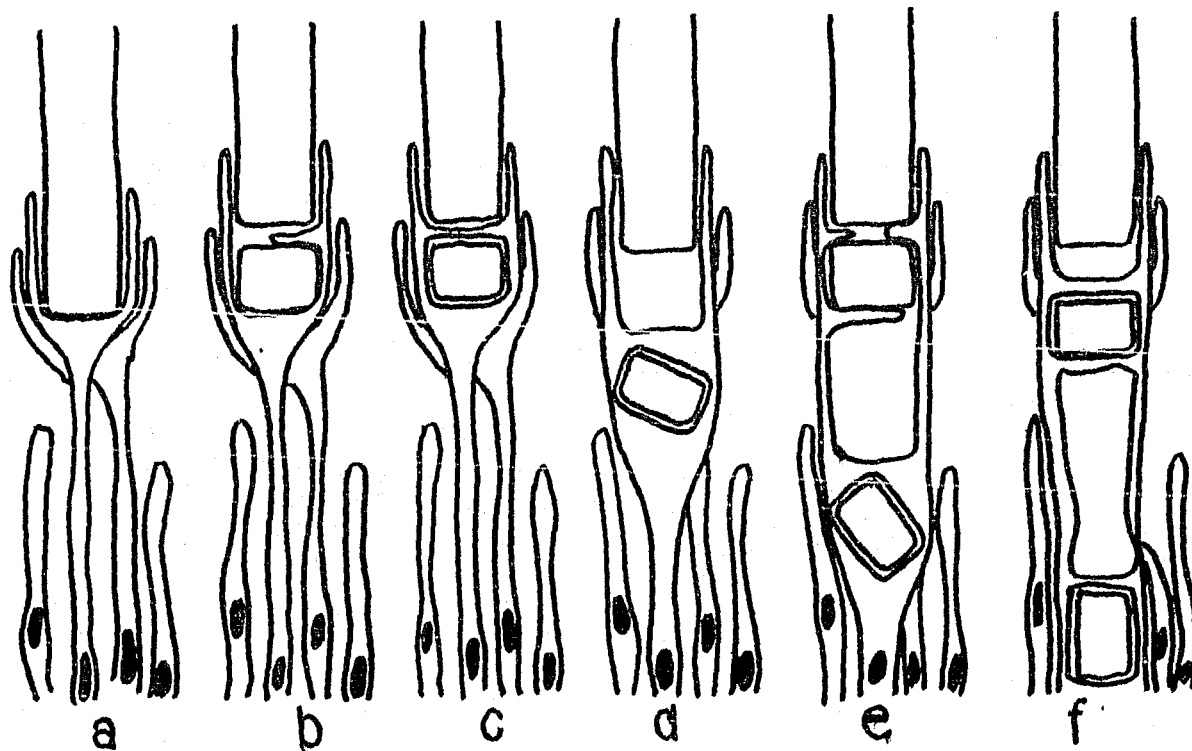
Se han descrito dos maneras en las que puede llevarse a cabo la fagocitosis. En una, las prolongaciones citoplásmicas

lisas y anchas activamente engloban y estrangulan los paquetes de discos, e invaginan la membrana plasmática de los segmentos externos. (71 y 115) Alternativamente, los paquetes distales de discos de los segmentos externos de los fotorreceptores pueden escindirse y secundariamente ser englobados por las células del epitelio pigmentario. (109) (Ver figura #2)

Como consecuencia de su actividad fagocítica, el interior del epitelio pigmentario presenta una gran cantidad de fagosomas que migran hacia las partes basales de la célula, se fusionan a lisosomas, y se convierten en fagolisosomas. -sólo ocasionalmente pueden unirse a melanosomas-, y finalmente los fagosomas secundarios se vuelven estructuras de interior homogéneo y de tamaño reducido. Los residuos no digeridos pasan a cuerpos residuales, estructuras que típicamente presentan una apariencia laminada en forma de círculos concéntricos o a gránulos de lipofucsina, que acumulan grandes cantidades de lípidos.

Cultivo.- Se ha logrado cultivar a las células del epitelio pigmentario. (12, 22, 31, 36, 39, 41, 49, 50, 69, 72 y 80) En el cultivo, es posible observar su diferenciación, expresión de actividades enzimáticas típicas, formación de melanosomas, fagocitosis y exocitosis. En co-cultivos de células embrionarias del epitelio pigmentario y de retina se observa una mayor estratificación y expresión de actividades enzimáticas paralelas a las encontradas durante el desarrollo *in vivo*, y en general, un mayor grado de diferenciación de las células retinales, que en cultivos de células embrionarias de retina neural sin células del epitelio

Figura 112. Fagocitosis de paquetes de discos de los extremos apicales de los fotorreceptores por el epitelio pigmentario. En a) las microvellosidades apicales del epitelio pigmentario rodean a los segmentos externos de los fotorreceptores; en b) y c) ocurre el englobamiento del paquete de discos, que es transportado hacia la parte basal de la célula epitelial d), e) y f). Modificado de la referencia 115.



pigmentario. ( 110, 111, 112 y 113)

Propiedades eléctricas. El electroretinograma es la respuesta eléctrica de la retina a la iluminación, y consta de varias partes. (Figura H3) Las ondas a, b, y c son rápidas, ocurren en pocos segundos, y van seguidas del pico de luz varios minutos después y alternativamente de oscilaciones que se extinguen al cabo de dos horas, o de un nivel estable de depolarización que dura mientras la retina esté iluminada. Al dejar de iluminar la retina ocurre una hiperpolarización que finaliza al alcanzarse el nivel basal. El epitelio pigmentario participa en algunas de estas respuestas. La melanina es capaz de responder a la luz directamente, sobretudo a niveles de iluminación excesivamente elevados. Esta respuesta es la única que se debe enteramente al epitelio pigmentario, pero a niveles fisiológicos de iluminación es muy pequeña y contribuye mínimamente en la fase rápida de la onda a del electroretinograma, que es una onda de hiperpolarización debida mayormente a la respuesta de los fotorreceptores. La onda c del electroretinograma es la respuesta de la retina y de una depolarización apical del epitelio pigmentario, probablemente causada por la disminución en la concentración de potasio en el espacio subretiniano. Al iluminar repetidas veces el ojo y obtener varias ondas c se ha visto que éstas presentan una periodicidad en los cambios de amplitud de las mismas: característica que parece deberse al epitelio pigmentario. (115) El pico de luz es una onda de depolarización lenta que necesita de la integridad del epitelio pigmentario y de la retina neural. El pico de luz es sensible a la aplicación de dopamina en el epitelio pigmen-

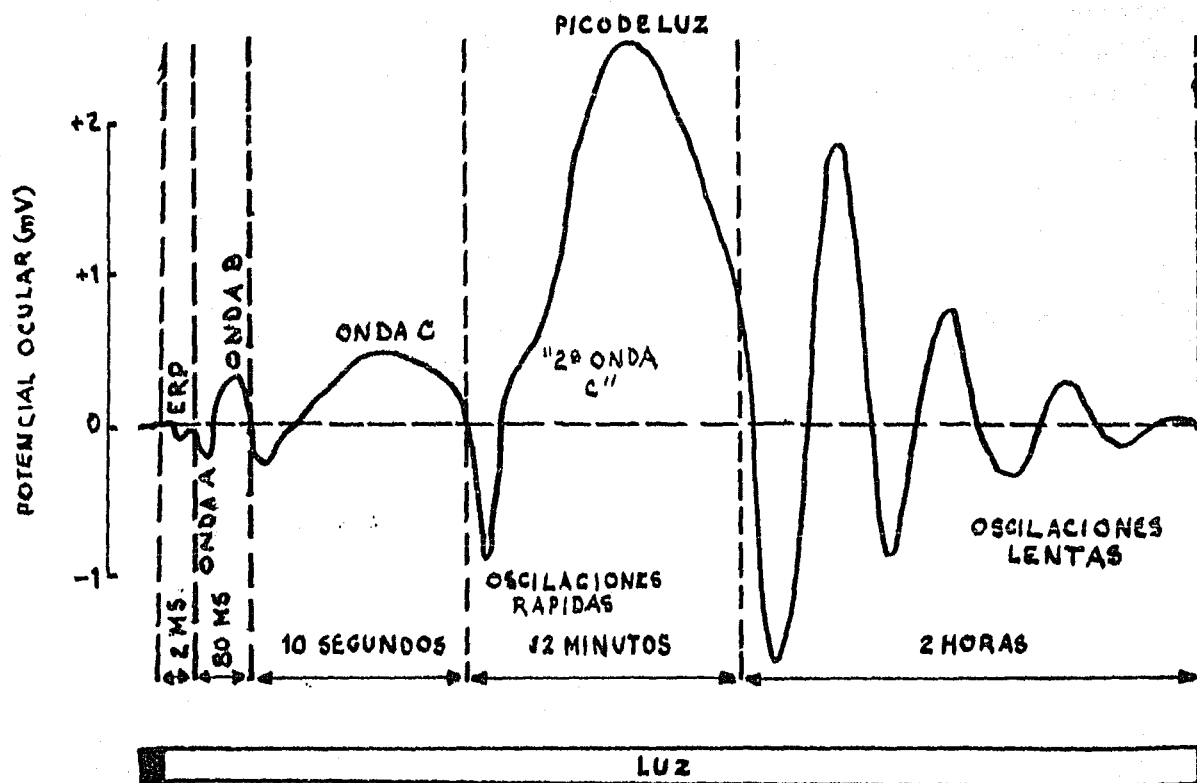


Figura #3. Electroretinograma de un mamífero. En la figura se muestran todas las ondas de que se compone así como la duración de las mismas. El epitelio pigmentario interviene en la onda c, el pico de luz y el potencial de base. Modificado de la referencia 115.



rio. En apoyo a lo anterior, se ha demostrado la presencia de receptores B-adrenérgicos en el epitelio pigmentario. (26 v 115) El epitelio pigmentario también participa en la generación del potencial de base del electroretinograma.

Transporte de iones. El transporte de iones a través del epitelio pigmentario ha sido estudiado primordialmente en anfibios. Existe una ATPasa de Na-K en las membranas apicales que expulsa sodio hacia el espacio subretiniano y cuya actividad parece ser modulada por las concentraciones de potasio, por lo que existe un flujo neto de sodio hacia la retina neural y un contraflujo de potasio. Tanto la membrana apical como la basolateral presentan una alta conductancia al potasio, por lo que se ha propuesto una regulación de los niveles de potasio en el espacio subretiniano por las células del epitelio pigmentario (16, 24, 27, 44, 74, 75, 76, 97, 98 y 115). Existe también un flujo de cloro en sentido inverso al del sodio, es decir, de la retina neural a la coroides. Estos dos flujos son los responsables en gran parte de la diferencia de potencial transepitelial, que en la rana es de alrededor de 10 mV (-88mV en la membrana apical y -77 mV en la basolateral). Existe también en la rana, un flujo neto de calcio hacia la retina de  $5.9 \text{ nmolas/cm}^2/\text{hora}$  (74). Este flujo es comparable al que existe en otras estirpes celulares especializadas en el transporte de calcio. En las células embrionarias del epitelio pigmentario del pollo existe una ATPasa  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  y un cotransporte de sodio, potasio y cloro en la membrana apical de las mismas (34). Los niveles elevados de AMPc son capaces de alterar estos flujos cuando se miden en conformación

de circuito abierto o de corto circuito. El transporte de iones a través del epitelio pigmentario reviste especial importancia porque está implicado en la regulación iónica del espacio subretiniano, así como en el aporte de iones a la retina neural. Los segmentos externos de los fotorreceptores también regulan la composición iónica de este medio: se sabe que con la iluminación liberan calcio, se cierran sus canales de sodio y la corriente oscura de sodio se interrumpe y aumenta la concentración de sodio; asimismo se sabe que la concentración extracelular de potasio disminuye. Se ha demostrado que estos cambios alteran el transporte de potasio en el epitelio pigmentario. (53, 79 y 115) El epitelio pigmentario también transporta aminoácidos y otros solutos como la glucosa. (74 y 115)

## 2. El calcio.-

La mayor parte del calcio presente en los organismos vivos está en forma de carbonatos y fosfatos y forma las estructuras de sostén de los mismos. (17, 19 y 20) Además, el calcio también está presente en los fosfolípidos ya que estabiliza las membranas, y en el glucocalix, pues los residuos de ácido siálico son sitios de baja afinidad para el calcio (23). Esta poza constituye del 3 al 5% del calcio celular total (17). Además, el calcio se une a las proteínas y ácidos nucleicos dentro del núcleo celular, en donde alcanza concentraciones de 1 mM (17). En otros organelos puede alcanzar altas concentraciones: mitocondrias (en donde se almacena en forma de hidroxapatita), retículo sarcoplásmico o endoplásmico (calcio que constituye la poza libe-

rable por el sistema de segundo mensajero del inositol trifosfato (32 y 38)), algunos organelos típicos de varias estirpes celulares, como son los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores (47) y los gránulos de pigmento, como los melanosomas. Hay células que tienen depósitos de calcio intracelular en forma de oxalato de calcio (18). Los trabajos pioneros de Ringer establecieron el papel crucial del calcio en la fisiología celular. (30)

Todas las células regulan la concentración de calcio libre interno. El gradiente de calcio existente entre el exterior (1 a 3 mM) y el interior (100 nM) de las células es, tal vez, el más grande en los sistemas biológicos. La difusión a través de las membranas celulares es bastante limitada para el calcio; en ocasiones en las que la integridad estructural de las membranas se pierde los gradientes de calcio creados a través de ellas tienden a desaparecer y esto conlleva a una entrada masiva de calcio. (14, 17, 19, 20 y 32)

El calcio, aparentemente por sus características físico-químicas (estructura atómica, tamaño, número de coordinación y geometría espacial), ha sido el ión de elección para servir de segundo mensajero celular en una miríada de procesos celulares a través de una variada y rica gama de proteínas con las que interactúa, como proteínas que fijan calcio (calmodulina, calsecuestrina), enzimas, receptores, acarreadores y canales iónicos. Existe una "señal de calcio" en las células que transmite su mensaje por medio de cambios transitorios en la concentración de

calcio libre intracelular. Se ha demostrado que la concentración de calcio libre intracelular en el epitelio pigmentario humano en cultivo se modula por receptores muscarínicos (36). Por otro lado, se sabe que los fosfatos de calcio son muy poco solubles en agua, y en un metabolismo dominado por fosfatos, una alta concentración de calcio sería incompatible con la vida, pues reaccionaría con los fosfatos, precipitaría y mataría a las células. Igual resultado se obtendría con una señal de calcio no controlada.

Este gradiente de calcio de las células es mantenido por medio de varios mecanismos de transporte de calcio de diferentes características: ATPasas de calcio, acarreadores de calcio, intercambiadores de calcio, como el intercambiador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ , y poros (o canales) de calcio (19 y 20). Las ATPasas de calcio se han localizado en tres tipos diferentes de membranas celulares: en la mitocondria existe una capaz de translocar iones calcio hacia el interior de las mismas, otra en las membranas plasmáticas capaces de expulsar calcio al medio intracelular y otra en el retículo sarcoplásmico, capaz de translocar iones calcio hacia el interior del organelo. (20) Existe un intercambiador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria y otro en las membranas plasmáticas. (20 y 32) Este intercambiador es muy semejante en ambas membranas, pero no parece ser la misma molécula. (19) El intercambiador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  es capaz de translocar grandes cantidades de calcio en poco tiempo por medio de los gradientes de sodio a través de las membranas, aunque con una menor afinidad para el calcio que la demostrada por las bombas de calcio. (20) El

intercambiador  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática del axón gigante de calamar parece ser electrogénico, con una estequiometría de 3  $\text{Na}^+$  por un  $\text{Ca}^{2+}$ . Bajo condiciones especiales es capaz de meter calcio y sacar sodio, actividad que depende de ATP y magnesio intracelular, por lo que no parece ser la reversa cinética del proceso de expulsión de calcio (32). Se ha descrito un intercambiador  $\text{Ca}^{2+} - \text{H}^+$  en la mitocondria, responsable de la acumulación de grandes cantidades de calcio en el interior de las mismas (17). El intercambiador  $\text{Ca}^{2+} - \text{Ca}^{2+}$  es equivalente para algunos autores con la difusión de calcio a través de las membranas. Existen al menos tres tipos de poros de calcio, algunos sensibles a voltaje, T, L y M. Estos poros T, L y M están presentes en diferentes tejidos, con diferentes abundancias relativas en aquellos tejidos en los que se presenta más de un tipo, y con distinta distribución subcelular. Las propiedades farmacológicas de estos tres tipos de poros son diferentes, en especial su sensibilidad a las dihidropiridinas, lo que ha servido para caracterizarlos. (77 y 106) Además, existen poros de sodio que presentan una baja especificidad iónica, por lo que pueden translocar también iones calcio. (53 y 114) Es fácil diferenciar a los poros de los acarreadores y las ATPasas de calcio por la mayor velocidad de traslocación que presentan los poros, y por su independencia del ATP.

Entre los variados procesos en los que el calcio interviene cabe mencionar el movimiento celular: quimiotaxis, desplazamiento de tipo amiboideo, cilios, flagelos y cambios de forma de las células, contracción muscular (4, 5, 17, 19, 20, 30 y 32); per-

meabilidad y estabilidad membranal; eventos eléctricos, el calcio participa en los potenciales de acción de las células excitables, en los que se ha logrado identificar varias corrientes de calcio (30); en la secreción de neurotransmisores (77), hormonas, factores de crecimiento, etc.; en la división celular (tanto en la mitosis como en la meiosis ya que el calcio es imprescindible para que se lleve a cabo la anafase) (46); en la transformación celular; en la fecundación, ya que la reacción de los gránulos corticales libera calcio que impide la poliespermia, induce la formación de la membrana de fecundación y estimula varias actividades enzimáticas que permiten el paso a los eventos más tardíos de la fecundación (37); en la comunicación intercelular modulan el estado de apertura y cierre de las conexiones (32); en la regulación de respuestas celulares a estímulos externos, como en el número o el estado fisiológico de los receptores de las células (retroalimentación, fosforilación de receptores, etc.) (32); en la fagocitosis y pinocitosis de muchos tipos celulares (10 y 84) y en procesos asociados al de la visión (47, 93 y 100).

## OBJETIVO

Se conoce muy poco acerca de la función que desempeña el calcio en el epitelio pigmentario de la retina. Se sabe que este tejido acumula grandes cantidades de este catión, al parecer en los gránulos de melanina (29 y 82) y que existe un transporte neto de calcio desde la coroides hasta la retina a través de estas células (74). Sin embargo, se desconocen los mecanismos que permiten el transporte y acumulación de este ión por completo. Es evidente que las células del epitelio pigmentario deben regular la concentración de calcio interno, en especial la de calcio libre, ya que este ión desempeña múltiples papeles en la fisiología celular (17, 19, 20 y 32). Es posible que el epitelio pigmentario sirva de almacén de calcio para la retina neural. Asimismo la fagocitosis que efectúan las células del epitelio pigmentario podría necesitar de calcio, como ocurre en otros tipos celulares. (10) El hecho de que los segmentos externos de los fotorreceptores liberen calcio al espacio subretiniano en condiciones de iluminación (53) sugiere que el epitelio pigmentario podría participar en la regulación de la concentración subretiniana de calcio, de manera análoga a como participa en la regulación de la concentración de otros iones.

Con base en lo anterior, el presente trabajo pretende caracterizar el mecanismo de acumulación de calcio en células aisladas del epitelio pigmentario de la retina de pollo, como prerrequisito para explorar las posibles funciones que este ión pueda tener en la fisiología de esta estirpe celular y en consecuencia en la fisiología general de la retina.

## MATERIALES Y METODOS

Animales.- Se utilizaron pollos blancos (White Leghorn), rojos (Rirr y Barr) y negros (Sexy Link) de 1 a 10 días después de la eclosión y embriones de pollo blanco de diferentes edades. Los animales se mantuvieron en el bioterio bajo condiciones normales de luz-oscuridad y se les dio de comer y beber ad libitum.

Aislamiento de las células.- Todos los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de iluminación normal y a temperatura ambiente a menos que se indique otra condición. Los animales se adaptaron a la oscuridad por una a dos horas antes de sacrificarlos por decapitación. Se separaron los ojos, se seccionaron ecuatorialmente y se descartó la parte anterior de los mismos incluyendo la retina. Las copas ópticas (6 a 10) se incubaron en 20 a 30 ml. de un Ringer Krebs-bicarbonato de la siguiente composición (mM): NaCl, 118; KCl, 4.7;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.17;  $\text{MgSO}_4$ , 1.17; glucosa, 5.6; ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), 1 y  $\text{NaHCO}_3$ , 35, pH 7.4 durante treinta minutos a 37 °C.

Las células del epitelio pigmentario de la retina se aislaron de las copas ópticas en Ringer por medio de una agitación suave con un pincel. Las células en suspensión se dejaron sedimentar, se cambió dos veces el Ringer y luego se centrifugaron en una centrifuga CRU 5000 (International Equipment Co., Needham Heights, MA) a 40 x g por cinco minutos. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 ml de Ringer Krebs-



bicarbonato que contenía 0.2 mgr/ml de estreptomicina,  $\text{CaCl}_2$  (2.5 mM) y se le eliminó el EDTA (medio normal). Las células en suspensión se mantuvieron durante sesenta minutos en la oscuridad y después se centrifugaron a 40 x g por cinco minutos, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en medio normal bajo luz roja tenue. La viabilidad de las células se determinó con la prueba del azul tripano y se cuantificó la pureza de la preparación por medio de un hemocitómetro.

Las células de embriones de pollo de 7 a 10 días de incubación se disociaron al pasar las copas ópticas a un Ringer sin calcio y con EDTA de 3 a 6 veces a través de una jeringa con aguja de 1.6 mm de diámetro. La suspensión resultante se trató como se describió anteriormente.

Acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Los experimentos se llevaron a cabo a 37 °C a diferentes tiempos de incubación bajo luz roja tenue, excepto cuando se indique otra condición. Las células (a razón de 25 a 125 µgr de proteína / 0.5 ml de medio) se incubaron en 1.5 ml de Ringer normal que contenía 0.1 a 0.2 µCi de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Al finalizar la incubación, se tomaron alícuotas de 440 microlitros y se centrifugaron durante 20 segundos a 10,000 rpm en una microfuga Beckman. Se decantaron los tubos, se lavó superficialmente el botón celular con agua bidestilada fría y el paquete de células se digirió con 0.2 ml de NaOH 1N. Las muestras se neutralizaron con 0.2 ml de HCl 1N, se les agregó 5 ml de tritosol (35) y se contaron en un contador de centelleo líquido.

Cuando se estudió el efecto de diferentes drogas o inhibi-

dores, éstos se agregaron al mismo tiempo que el  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Cuando se probó el efecto del sodio sobre la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , el cloruro de sodio se sustituyó por cloruro de colina a la misma concentración.

Liberación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Las células se incubaron en Ringer normal con  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (0.1 a 0.2  $\mu\text{Ci}$ ) durante diez minutos a 37 °C. Al finalizar la incubación se centrifugaron a 40 x g por cinco minutos y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de Ringer de diferente composición y se incubaron a 37 °C. A los tiempos indicados las células se sedimentaron por centrifugación a 10,000 rpm y la radioactividad remanente en el tejido se determinó como se describió anteriormente.

Proteína. La proteína se determinó de acuerdo a Lowry, etal (68) con albúmina de suero bovino como estándar.

Determinación de melanina. Se siguió el método reportado por Siegrist y Eberle (96). Las suspensiones de células del epitelio pigmentario (150 a 750  $\mu\text{gr}$ . de proteína) previamente congeladas y descongeladas se extrajeron tres veces con ácido tricloroacético al 5%, dos veces a 4 °C con una mezcla de etanol y eter etílico en una proporción de 3:1 y una vez con eter frío y los sobrenadantes se eliminaron por centrifugación. El material precipitado resultante fue disuelto en 0.4 ml de agua bidestilada, y se le agregó 1.5 ml de hidróxido de potasio 0.85 N. Las muestras se incubaron diez minutos a 100 °C y se leyó la absorbancia de las mismas a 400 nm. Los valores se compararon con una curva estándar de melanina sintética disuelta en hidróxido de

potasio 0.85 N.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y se adquirieron de fuentes comerciales convencionales.

Estadística.- La significancia de los datos experimentales se calculó por medio de la prueba de "t" de Student, tanto para esquemas con datos pareados como para casos de dos muestras con varianzas iguales (18). También se emplearon pruebas de Anovar (análisis de varianza) modificadas para esquemas desbalanceados y las pruebas de Duncan, Scheffe, Gabriel y Sidak, mediante la quinta versión del paquete SAS de estadística (92).

Se emplearon las pruebas de "t" de Student con base en los supuestos de las mismas: tanto en el esquema de datos pareados, como en la modalidad para dos poblaciones con varianzas iguales; en ambos casos los niveles de análisis fueron dos (diferencias entre repeticiones y diferencias entre una condición y otra dentro de la misma repetición). Para ello se hicieron pruebas de comparación de varianzas y se encontró que éstas eran iguales para los casos en los que se usaron las pruebas. También se hicieron pruebas para estimar la normalidad de los datos, hallándose que se ajustan razonablemente a esta distribución, ya que las curvas de frecuencia / datos experimentales son unimodales y relativamente simétricas (18).

Las pruebas de anovar modificada tienen varios niveles de análisis: diferencias entre repeticiones, entre condiciones y entre subconjuntos de condiciones. diferenciando el porcentaje de

variabilidad que se debe a diferencias intragrupalas del que se debe a diferencias extragrupalas. Para poder usar las pruebas de anovar modificadas se deben de cumplir ciertos supuestos: a) que las unidades experimentales sean seleccionadas al azar; b) que los distintos tratamientos sean al azar; c) que las distribuciones de las frecuencias sean normales; d) que las varianzas sean iguales y e), que exista independencia de un dato con respecto de otro. Todos estos puntos se cumplen para nuestros datos. De hecho, la anovar modificada pierde potencia con respecto al análisis para esquemas balanceados, por lo que se vuelve mas conservadora; así, las diferencias encontradas tienen una probabilidad menor de ser espurias que con un esquema balanceado. Para las pruebas de Scheffe, Duncan, Gabriel y Sidak (92) se usó la media armonica de los datos, ya que se trataba de esquemas desbalanceados, lo que puede conllevar a resultados un poco liberales, por lo que se tomaron como significativas sólo aquellas diferencias comunes a todas las pruebas o aquellas señaladas por la prueba mas conservadora de todas las empleadas, la de Scheffe.

## RESULTADOS

Preparación.- La suspensión celular corresponde a una preparación enriquecida en células del epitelio pigmentario (75%). (Figura #4) La contaminación celular más importante en dicha preparación son los eritrocitos, que constituyen el 24% de la misma; en menor grado se encuentran algunos fragmentos celulares. Los segmentos externos de los fotorreceptores constituyen menos del 0.1% de la preparación, y existe una cantidad que no puede ser cuantificada por sus dimensiones, de gránulos de melanina. La viabilidad de las células del epitelio pigmentario de la retina determinada por la prueba de exclusión del azul tripano fue del 80%.

Efecto de la concentración de proteína y del tiempo de incubación sobre la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .- La acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  fue proporcional a la concentración de proteína dentro de una escala de 25 a 125 microgramos de proteína, en donde se observó una  $r$  de 0.8067. (Gráfica 1). Todos los experimentos se realizaron dentro de este rango de concentraciones. La acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  fue lineal con respecto al tiempo de incubación, se observa una curva de saturación entre los dos y cinco minutos de incubación, con una actividad máxima de 1.80  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  / mgr de proteína. (Gráfica 2).

La acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  fue inhibida en un 60% cuando la incubación se llevó a cabo a 4°C. El cianuro de potasio (1mM) no inhibió la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Por otra parte, la ouabaina



fig. 4

Células del epitelio pigmentario aisladas. Se observan sus prolongaciones citoplásmicas y gran cantidad de pigmento.

(0.1mM) aumentó significativamente la acumulación de  $^{45}\text{Ca}$ , en un 100% a los dos minutos, nivel de acumulación que se mantuvo hasta los diez minutos, por lo que a este tiempo sólo equivalió a un 50% por encima del valor de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  encontrado en el control. Para investigar la presencia de poros de calcio, se probó el efecto del verapamil a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , pero no se encontraron diferencias significativas dentro de los tiempos estudiados. La presencia de dinitrofenol (1 mM) aumentó notablemente los niveles de acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , incremento que fue significativo únicamente a tiempos cortos de incubación ya que este nivel de acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  se mantuvo constante a cinco y diez minutos de incubación, mientras que los niveles de acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  se elevaron en el control a esos tiempos ( $p < 0.05$ ) (Tabla #1).

Con el objeto de estudiar la cinética de la acumulación del  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , ésta se midió en presencia de diferentes concentraciones de calcio (0.03 - 2.5 mM). Bajo estas condiciones la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  fue saturable. Se observó un solo sistema de transporte en la gráfica de Lineweaver-Burke ( $r=0.8482$ ), con  $K_m$  aparente de 100  $\mu\text{M}$ . La  $V_{max}$  fue de 0.25  $\mu\text{molas Ca}^{2+}$  / mgr proteína / min (Gráfica 3).

En los experimentos en los que el sodio se substituyó por colina, la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  se vio notablemente modificada (50% inhibición;  $p < 0.01$ ). (Tabla #1) Para investigar la existencia de un intercambiador  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ , se estudió la liberación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . El porcentaje de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  retenido por las células es

igual en presencia o ausencia de sodio. Por el contrario, en un medio con bajo calcio se observó un aumento en la liberación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (50% comparado con 20% en medio con calcio), lo que sugiere que esta liberación es debida a fenómenos de difusión. Sin embargo, la liberación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no se vio afectada por la presencia de dinitrofenol. (Gráfica 4).

Acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  durante el desarrollo en embriones de pollo. Se estudió la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en células aisladas del epitelio pigmentario de embriones de pollos blanco (White Leghorn) de 6 a 21 días de incubación. Dicha acumulación no presentó cambios importantes durante los diferentes días estudiados y se encontró un valor promedio de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  acumulado en diez minutos de 1.38  $\mu\text{molas Ca}^{2+}$  / mgr proteína. (Gráfica 5) Dicha acumulación fue inhibida en un 60% a 4 °C.

Acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en distintas variedades de pollos. Se estudió la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en las células del epitelio pigmentario obtenido de tres variedades de pollos con distinto grado de pigmentación somática: blancos, rojos y negros de 1 a 10 días después de la eclosión. La cantidad de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  acumulado en promedio en los pollos blancos fue de 1.626  $\mu\text{molas Ca}^{2+}$  / mgr proteína / 10 minutos, muy similar a la de los rojos, de 1.507  $\mu\text{molas Ca}^{2+}$  / mgr proteína / 10 minutos. Sin embargo, los valores de acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en las células del epitelio pigmentario de los pollos negros fueron significativamente distintos ya que se obtuvo un valor de 2.746  $\mu\text{molas Ca}^{2+}$  / mgr proteína / 10 minutos, diferencia que fue confirmada con la prueba de anovar



modificada ( $PR > F = 0.0001$ ) y con las pruebas de Scheffe, Duncan, Gabriel y Sidak (92). Además se observó que la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  tiende a disminuir significativamente con la edad de los pollos en las tres variedades, siendo menor a partir de los cinco días postnatales, aunque en los negros esto es menos notorio (prueba de anovar modificada,  $PR > F = 0.0001$ ; pruebas de Scheffe, Duncan, Gabriel y Sidak, (92)). Las pruebas antes mencionadas también demostraron una diferencia altamente significativa ( $PR > F = 0.0001$ ) en la interacción variedad de pollo / edad. Por medio de una prueba de "t" pareada se observó que en los pollos blancos existe una diferencia significativa en la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  de los días 2 y 4 con respecto a los demás días ( $p < 0.5$ ; (18)). (Gráfica 6)

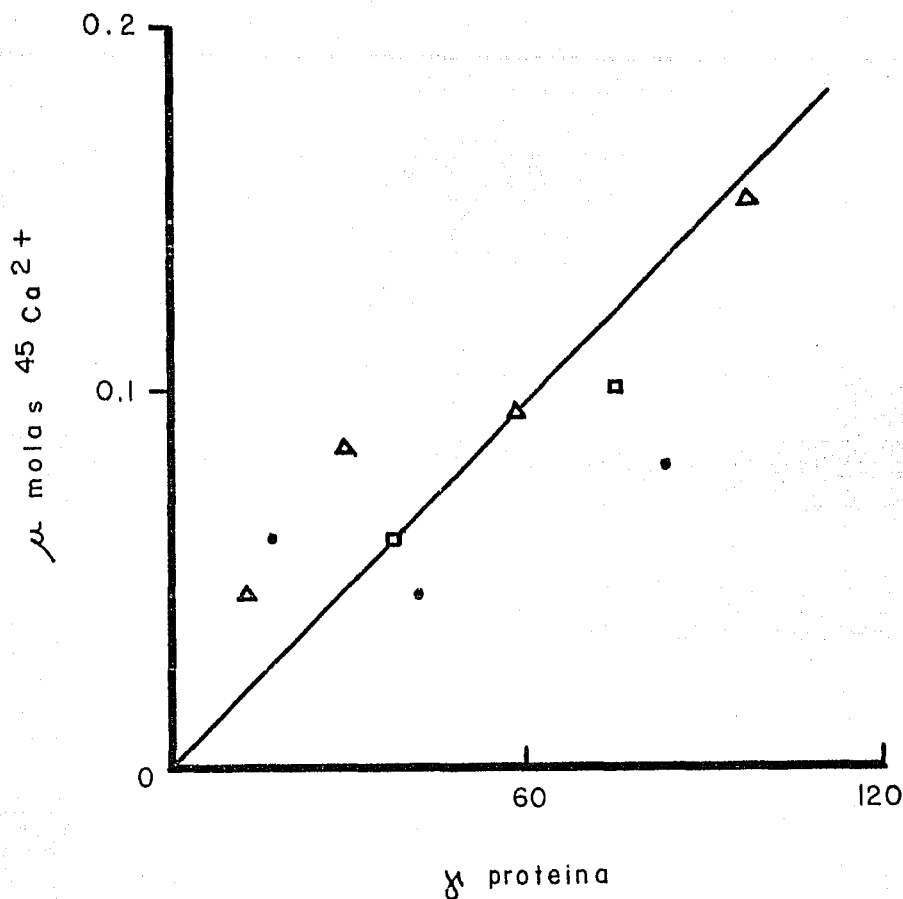
#### Efecto de la iluminación sobre la acumulación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .

El efecto de la luz sobre la acumulación de calcio se estudió en las células de los embriones de pollo blanco y en las células del epitelio pigmentario de las tres variedades de pollos después de la eclosión. Cuando las células del epitelio pigmentario de las tres variedades de pollos se incubaron en condiciones normales de iluminación, no se encontró ninguna diferencia en la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  con respecto a la acumulación observada en condiciones de oscuridad (gráfica 6), (pruebas de Anovar modificada, de Scheffe, Duncan, Gabriel y Sidak (92)). En los embriones de diferentes edades (gráfica 5), no se encontraron tampoco cambios significativos en la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en las células incubadas en la oscuridad o en la luz, excepto en el día de la eclosión, edad en la que la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  se incrementó

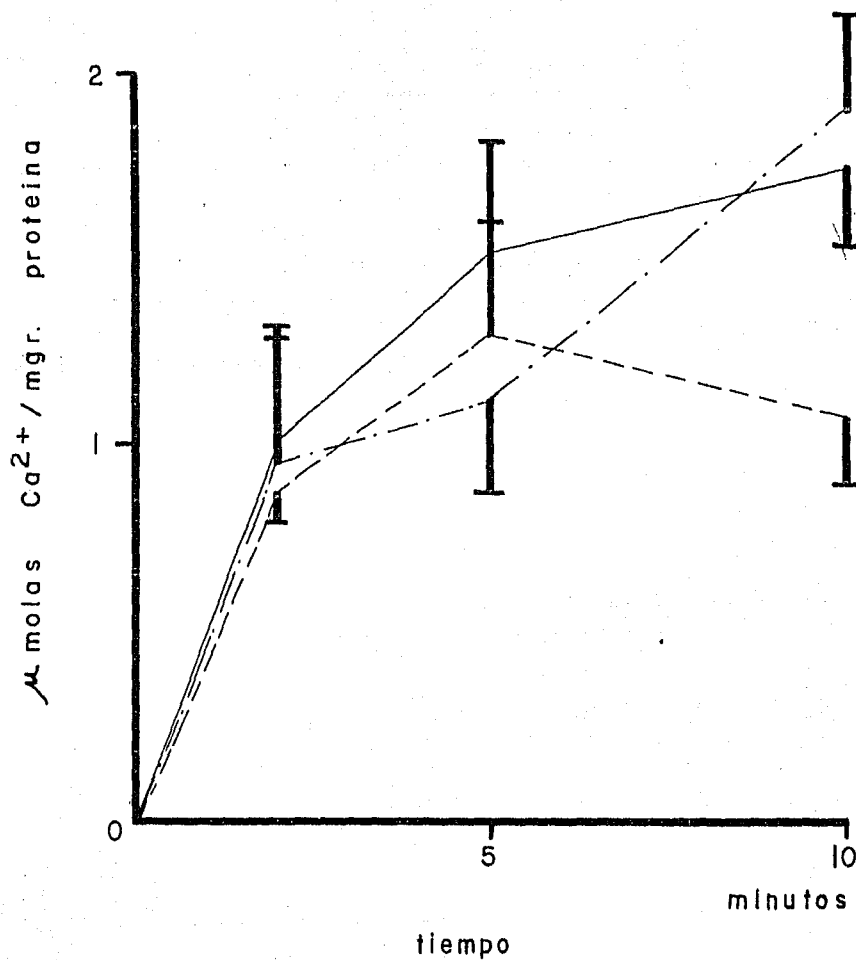
significativamente (100%) cuando las células se incubaron bajo la iluminación normal del laboratorio (prueba de "t";  $p < 0.5$ ; (19)).

La presencia de potasio 25 mM en el medio de incubación no causó diferencias significativas en los niveles de acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en ninguna de las edades ni variedades de pollos estudiados. (Gráficas 5 y 6)

Melanina. - Con el propósito de identificar si la acumulación de calcio está relacionada con la concentración de melanina, se cuantificó el nivel de melanina en el epitelio pigmentario de pollos blancos, rojos y negros a diez días postnatales. Las células del epitelio pigmentario de los pollos negros poseen más melanina que las de los rojos y éstas, a su vez, poseen más melanina que las de los blancos, pero las diferencias sólo fueron significativas entre los niveles de melanina en el epitelio pigmentario de pollos negros y rojos con respecto a los blancos ( $p < 0.05$ ). (Tabla II). El nivel de melanina no varía significativamente en las células del epitelio pigmentario de los pollos negros a cinco y diez días después de la eclosión, como tampoco en las células del epitelio pigmentario de los pollos rojos a cinco y diez días de incubación, ni en los pollos blancos entre embriones de 20 días de incubación y pollos de diez días postnatales.



GRAFICA #1.- Acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  a diferentes concentraciones de proteina a diez minutos de incubación en células aisladas del epitelio pigmentario de la retina de pollos rojos de cinco días de edad. Los datos graficados corresponden a tres experimentos independientes. La curva se trazó a mano. Entre 25 y 120  $\mu\text{g}$  de proteina los datos se ajustaron a un modelo de una recta con una  $r=0.8067$ .



GRAFICA #2.- Acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en células aisladas del epitelio pigmentario de pollos rojos de cinco días contra tiempo de incubación. La línea continua representa la acumulación en la oscuridad; la línea punteada la acumulación en presencia de alto potasio y la línea formada por guiones y puntos representa la acumulación en presencia de la iluminación normal del laboratorio. Los datos son el promedio de al menos tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar.

TABLA I

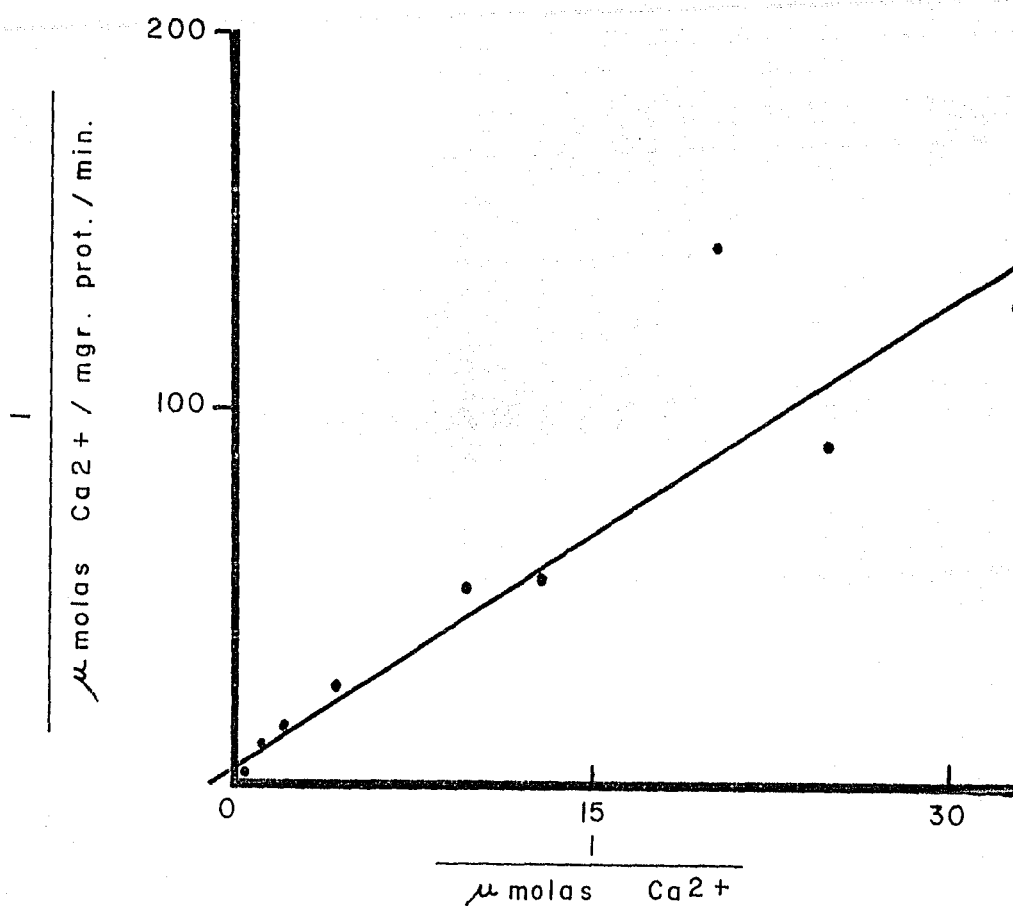
tiempo  
(minutos) % del control a c/ tiempo.

cianuro de potasio (KCN) 1 mM	2	90.5 ± 29.5 (3)
	5	111.4 ± 51 (3)
	10	67.2 ± 9.4 (3)
ouabaina 0.1 mM	2	196 ± 16.1* (3)
	5	137 ± 13.8 (3)
	10	155 ± 21* (3)
dinitrofenol (DNP) 1 mM	2	579 ± 29* (3)
	5	372 ± 78.9 (3)
	10	274 ± 44.8 (3)
verapamil 10 μM	2	107 ± 7.2 (3)
	5	127 ± 16.8 (3)
	10	119 ± 10.6 (3)
4°C	2	49.5 ± 13.2* (3)
	5	33.4 ± 10.08* (3)
	10	34.5 ± 10.06* (3)
bajo sodio (35 mM)	2	68.96 ± 6.83 (5)
	5	55.76 ± 9.13 † (5)
	10	47.37 ± 5.94 ‡ (5)

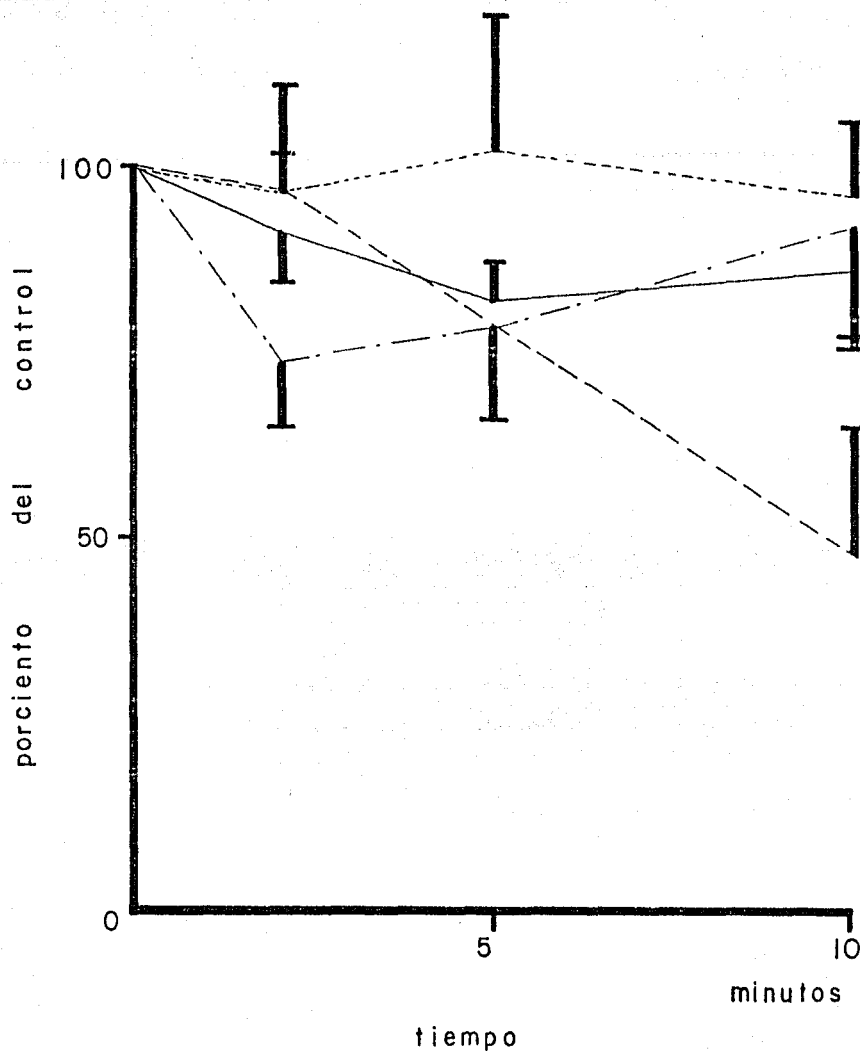
\* = p &lt; 0.05

† = p &lt; 0.02

‡ = p &lt; 0.01

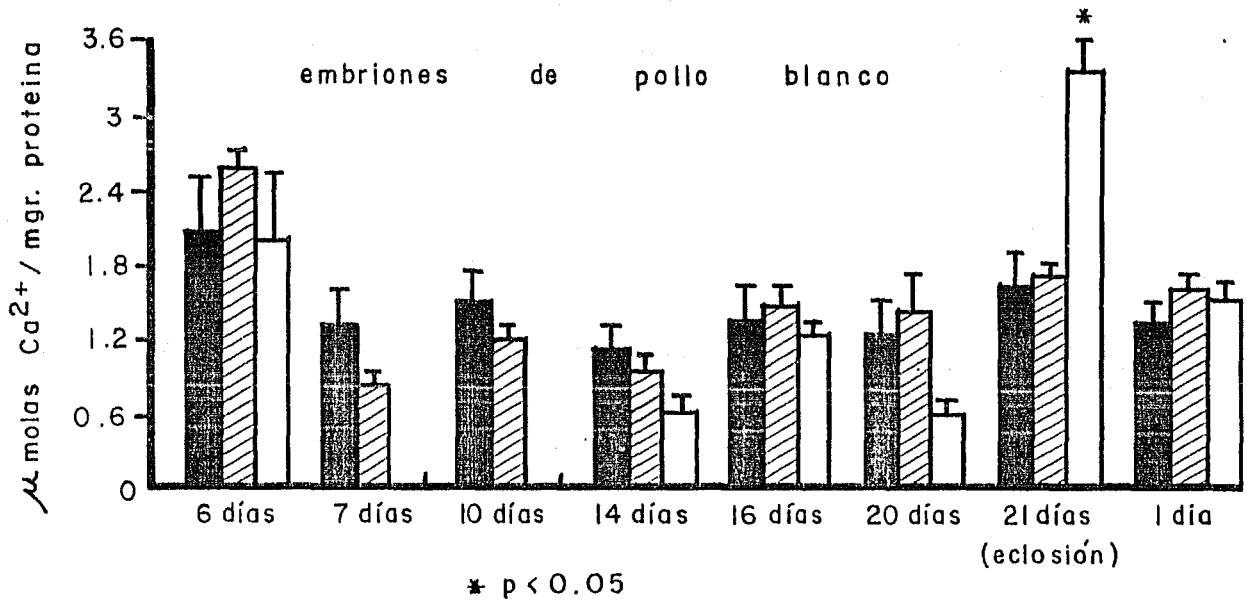


GRAFICA #3.- Doble reciproca de la acumulaci3n de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en c3lulas aisladas del epitelio pigmentario de la retina de pollos rojos de cinco d3as a un minuto de incubaci3n. Los datos son el promedio de al menos tres experimentos independientes. La l3nea continua fue trazada a mano. Se encontr3 que los datos se ajustaban a un modelo de una l3nea recta, con una  $r=0.8482$ . La  $K_m$  aparente calculada de la regresi3n lineal fue de  $100 \mu\text{M}$  y la  $V_{max}$  fue de  $0.25 \mu\text{moles} / \text{mgr prote3na} / \text{minuto}$ .

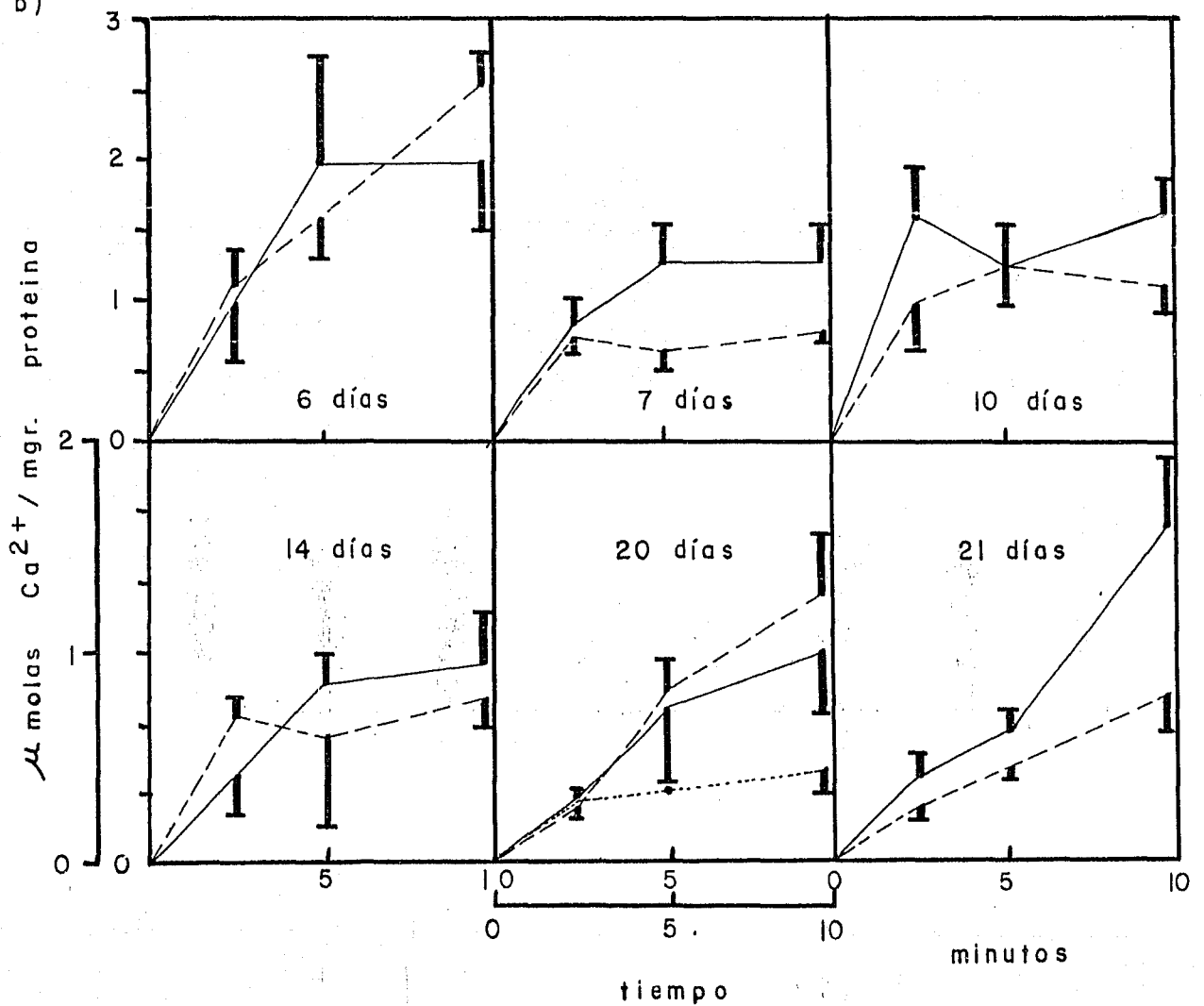


GRAFICA #4.- Liberación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  de células aisladas del epitelio pigmentario de la retina de pollos rojos de cinco días de edad. La línea continua es la liberación en medio normal; la línea punteada es la liberación en presencia de 1 mM de dinitrofenol; la línea discontinua es la liberación en medio sin calcio y la línea formada por guiones y puntos representa la liberación en medio con 25 mM de sodio. Los datos están dados en porcentaje con respecto al tiempo cero de liberación (control) y son el promedio  $\pm$  el error estándar de tres experimentos independientes.

a)



b)





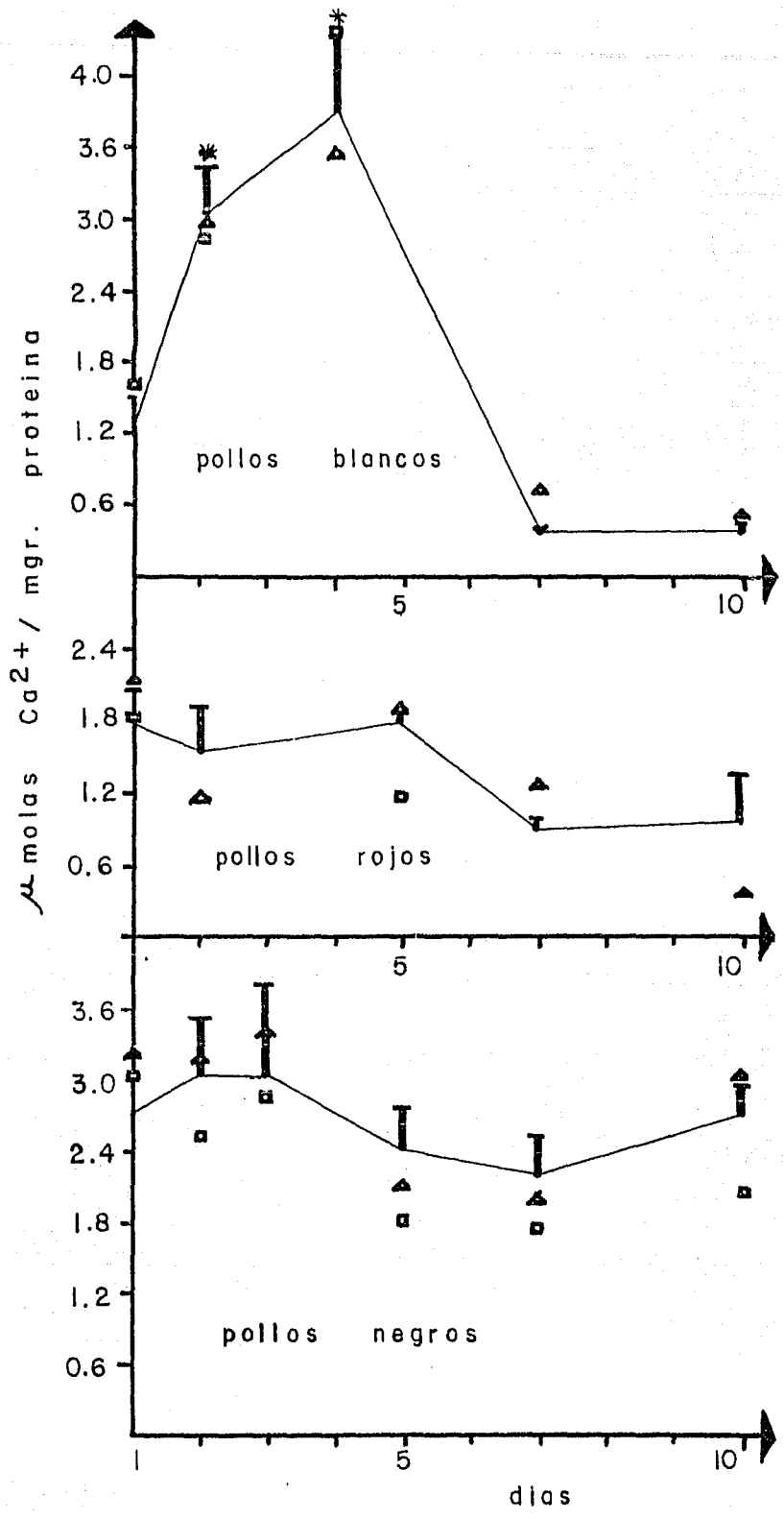


TABLA II - Melanina

	$\mu\text{gr. mel.} / \text{mgr. prot.}$	$\mu\text{mola Ca}^{2+}$ acumulado a 10'
pollos blancos †	197.43 $\pm$ 36.60 (4)	491.34
pollos rojos †	* 460.75 $\pm$ 82.68 (3)	476.37
pollos negros †	* 499.51 $\pm$ 114.08 (5)	206.75

\*  $p < 0.05$  con respecto al nivel de melanina de los blancos.

† 7-10 días postnatales.

TABLA II.- Nivel de melanina en células del epitelio pigmentario de pollos blancos, rojos y negros de siete a diez días después de la eclosión. En la columna de la izquierda se muestran los promedios  $\pm$  el error estándar para cada variedad. Entre paréntesis se señala el número de experimentos independientes para cada caso. Existe una diferencia significativa dada por la prueba de "t" ( $p < 0.05$ ) entre el nivel de melanina presente en pollos negros y rojos comparado con el nivel de melanina presente en pollos blancos a los 7-10 días (marcado con un asterisco). En las columnas de la derecha se reporta la relación entre cantidad de melanina por umola de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  acumulado a diez minutos de incubación.

## DISCUSION

1. Células pigmentadas. Las células aisladas del epitelio pigmentario de la retina de pollo presentan una gran capacidad para acumular  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ; los valores de acumulación observados en este estudio concuerdan con los datos obtenidos en células aisladas del epitelio pigmentario de la rana: 1 mM (88), y en general, con los elevados niveles de calcio presentes en el epitelio pigmentario de las retinas de varias especies: 11 a 15 mM en la rana, de acuerdo a Hess (citado en 29) y a Panessa y Zaduniasky (82) y 11 mM de acuerdo a Panessa y Zaduniasky en los teleosteos (82). Se han observado niveles muy elevados de calcio en el epitelio pigmentario de las retinas del conejo, el gato, el tiburón y el ratón, en comparación con otros tejidos oculares. (29 y 82) En el caso de la rana, se han demostrado efectos sobre la acumulación de calcio debidos a la luz y a la composición iónica del Ringer en el epitelio pigmentario, en la copa óptica (82) y en células aisladas (89). La capacidad de acumular grandes cantidades de calcio parece ser común a las células pigmentadas, ya que existe una gran cantidad de ejemplos en la literatura al respecto: gránulos pigmentados de células musculares de poliquetos del género Syllis y Nephtys, (3, 13); en músculos de insectos, (6); en células pigmentadas oculares de ratón, en donde se demostró una relación directa entre cantidad de pigmento y concentración de calcio, (29); en células pigmentadas epidérmicas de vertebrados (82); en neuronas pigmentadas de caracol, (101); en células pigmentadas de Aplysia, (101); en células pigmentadas del ojo del acocil, cuyos gránulos de pigmento poseen una concentración de calcio superior a 100 mM,

(citado en 101) y en las células pigmentadas de los ojos de Drosophila, (101), en donde también se encontró, con el estudio de mutantes, una relación directamente proporcional entre la cantidad de pigmento presente y la cantidad de calcio acumulado. En muchos casos, estas células son capaces de liberar el calcio acumulado bajo diferentes estímulos: fótico, actividad muscular o actividad eléctrica, o de presentar una morfología distinta como consecuencia de la liberación de calcio. (101)

El calcio acumulado observado en el presente trabajo se debe a las células del epitelio pigmentario, ya que aunque el 24% de la preparación corresponde a eritrocitos, se ha demostrado que éstos acumulan cantidades mucho menores de este ión: 400 micromolas / litro de células empaquetadas, de acuerdo a Long y Mouat (67). Más aún, estos autores agregan que dos terceras partes de este calcio es calcio laxamente unido a los eritrocitos, fácilmente removible con EDTA. Se ha estimado que la concentración total de calcio dentro de los eritrocitos humanos es de 500 nM (17), mientras que la cantidad de calcio total presente en el epitelio pigmentario de la rana es 11.7 mM, al menos 23,000 veces mayor (82). Finalmente, los experimentos preliminares realizados en el laboratorio indican que la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en eritrocitos bajo condiciones idénticas a las empleadas en el presente trabajo es varios órdenes de magnitud inferior a la presentada por las células del epitelio pigmentario; por lo que consideramos que la contribución de los eritrocitos en la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  observada es insignificante.

2. Caracterización del transporte..- La acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en las células aisladas del epitelio pigmentario se comporta como un sistema saturable dependiente de temperatura. El hecho de que la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no se modifique significativamente en presencia de cianuro de potasio sugiere que dicha acumulación no depende directamente de la respiración. La acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  tampoco parece estar mediada por poros de calcio, ya que dicha acumulación se modificó por la temperatura y no en presencia de verapamil, droga de la que se tienen evidencias que bloquea los poros de calcio en células excitables. (20)

Los efectos del dinitrofenol en el presente trabajo no son claros. Sin embargo, se sabe que como consecuencia de su actividad como protonóforo, desacopla las mitocondrias e impide la entrada de calcio a las mismas lo que conlleva secundariamente a un aumento del nivel de calcio citosólico; situación que pudiera explicar el aumento en la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en presencia de dinitrofenol (mediado por el intercambio  $\text{Ca}^{2+}-\text{Ca}^{2+}$ ). Sin embargo, la liberación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  no se altera significativamente en presencia de dinitrofenol y de acuerdo a la hipótesis propuesta, un aumento en el nivel de calcio citosólico debería de acelerar el intercambio  $\text{Ca}^{2+}-\text{Ca}^{2+}$ , liberando mayor cantidad de marca radioactiva que el control. Hughes, Miller y Machen (44) demostraron que el dinitrofenol inhibe el transporte de moléculas de agua acoplado a iones a través del epitelio pigmentario de la rana. Este hecho debe de traer como consecuencia un desequilibrio generalizado en el transporte de iones, que probablemente influye de manera inespecífica en la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en presencia

de este compuesto.

La liberación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en medio con bajo sodio (35 mM) es similar a la observada en un medio normal (153 mM de sodio) mientras que la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  se inhibe en un 50%.

Por otra parte, la ouabaina aumentó la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . La concentración de ouabaina usada inhibe totalmente la ATPasa  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  y altera el flujo de  $^{22}\text{Na}^+$  (74), y también reduce el potencial transepitelial, despolarizando a las células.

Podemos resumir todos los resultados enunciados anteriormente diciendo que, en general, el calcio se acumula más cuando hay más sodio externo, y menos cuando hay una concentración de sodio menor. Es posible explicar el efecto de las bajas concentraciones de sodio y el efecto de la ouabaina al proponer que existe una modulación de la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  por las concentraciones de sodio. Una manera en que esto pudiera llevarse a cabo sería postular un poro de baja selectividad por el que pudiera entrar el calcio y el sodio, de manera similar a como se ha observado en otros sistemas (53 y 114). Este poro podría estar modulado por la concentración de sodio interno. Así, en un medio con alto sodio y calcio (153 mM y 2.5 mM en nuestro sistema, respectivamente) este poro estaría abierto y la célula se despolarizaría y acumularía calcio; en cambio, en medio con bajo sodio externo la célula no se llegaría a despolarizar y la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  se vería inhibida. La ouabaina aumentaría la despolarización y la acumulación de sodio interno y favorecería la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . Se necesita cierta concentración de pota-

sio para observar los niveles de acumulación reportados en este trabajo. El potasio alto (25 mM) no tiene efecto ya que muy probablemente la concentración de este ión usada normalmente (4.7 mM) es de por sí despolarizante, como se ha reportado en la literatura para otras especies (24, 74 y 115), y de acuerdo al esquema propuesto es necesaria no sólo la despolarización sino la regulación del poro por el sodio interno. En apoyo a lo anterior es interesante hacer notar que en el espacio subretiniano en la luz ocurre un aumento en las concentraciones de sodio como consecuencia de la interrupción de la corriente oscura de sodio, con el cierre de los poros de sodio de los segmentos externos de los fotorreceptores. Concomitantemente ocurre una liberación de calcio de los segmentos externos al espacio subretiniano. Esta alteración iónica puede traer como consecuencia un aumento en la concentración de sodio interno en las células del epitelio pigmentario, y secundariamente, en un aumento en la acumulación de calcio. Es muy sugestivo para el mecanismo propuesto que la onda c del electroretinograma ocurre al tiempo que se dan los cambios iónicos en el espacio subretiniano como respuesta a la luz y que esta onda esté asociada a una depolarización apical del epitelio pigmentario dependiente de la integridad de la retina neural. En fotorreceptores aislados en condiciones de oscuridad, la concentración de sodio y calcio externos se ven disminuidas (53 y 114), y la acumulación de calcio por el epitelio pigmentario se veía, entonces, inhibida. Las células del epitelio pigmentario regularían las concentraciones de calcio en el espacio subretiniano, sin que la liberación de calcio se vea alterada. Así, los

dos tipos celulares (el epitelio pigmentario y los fotorreceptores) se complementarían y lograrían la homeostasis iónica del espacio subretiniano, fenómeno que ya se ha demostrado para el potasio cuyas concentraciones disminuyen en el espacio subretiniano en condiciones de iluminación. Las células del epitelio pigmentario responden a estos cambios al modular la actividad de la ATPasa Na-K y el eflujo de potasio. (25, 53, 79, 97 y 98).

La liberación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en ausencia de calcio extracelular es mayor que la observada en medio normal (con 2.5 mM de cloruro de calcio). Los resultados anteriores aunados con las observaciones que existen de un transporte neto de calcio de la coroides a la retina movido por gradientes electroquímicos (74) parecen indicar que la elevada acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  observada en el epitelio pigmentario se debe a un mecanismo de transporte mediado por difusión y modulado por sodio que puede explicarse por la hipótesis descrita aunque no se puede descartar la participación de un intercambiador  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  en el mismo.

3. Posible significación funcional. - Se ha especulado mucho acerca del papel que pudiera desempeñar el calcio en el epitelio pigmentario. Se sabe que el calcio es un elemento esencial para una conductancia membranal eficiente y para el correcto funcionamiento de la retina (82). De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el epitelio pigmentario regula junto con los fotorreceptores la composición iónica del espacio subretiniano (16, 24, 27, 44, 74, 75, 76, 97, 114 y 115) y sirve de barrera hematorretiniana al paso de iones y sustancias en solución (66). En otras palabras,



una primera función que parece cumplir el epitelio pigmentario con respecto al calcio -al tomar en cuenta la localización estratégica de este epitelio en el ojo y su elevada capacidad de acumulación- es el de servir de 'almacén' y de regulador homeostático del mismo. Es interesante hacer notar, en este sentido, que también en el oído interno son las células pigmentadas de la stria vascularis, las únicas células que acumulan grandes cantidades de calcio, las responsables de la secreción y homeostasis de la endolinfa, el medio que rodea a las células receptoras del oído. El paralelismo puede resultar aún mas interesante si se agrega que se conocen, como en la retina (29. 59. 60. 61. 62. 63, 64, 85, 90, 91 y 115), problemas asociados a casos de hipopigmentación en dicha estirpe celular. (29)

El epitelio pigmentario también se relaciona estrechamente con los fotorreceptores en otros procesos: fagocita los extremos apicales de los mismos (7, 8, 9, 21, 31, 39, 41, 43, 65, 71, 72, 80, 87, 94, 95, 102, 103, 104, 109 y 115). Su actividad fagocítica, de acuerdo a las estimaciones de Young y Bok (citado en 115), es considerable. Se sabe que el calcio es necesario para este proceso en otras estirpes celulares y es probable que intervenga en varios aspectos del mismo como la extensión de prolongaciones, el englobamiento, etc. Recientemente se ha encontrado en células de Kupffer (10) evidencias que indican que uno de los primeros eventos en el proceso fagocítico de este tipo celular es un influjo de calcio. Este tipo de fenómenos también pueden estar presentes en las células del epitelio pigmentario y servir en la regulación de estos procesos.

En animales hipopigmentados o albinos existen alteraciones que no se pueden relacionar directamente con el efecto fotoprotector de la melanina (61, 62, 63, 64 y 85), como estímulos umbral mas altos en la respuesta eléctrica de las células retinales a la iluminación con fondo oscuro en hipopigmentados que en pigmentados y capacidad fagocítica alterada en algunos albinos (29 y 90), efectos que están relacionados al epitelio pigmentario. Se ha sugerido que estas alteraciones sean consecuencia de un desequilibrio en la homeostasis del calcio, ya que estos animales acumulan menores cantidades de calcio que los animales pigmentados (29). En el presente estudio se encontraron diferencias en el nivel de acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en variedades melánicas de pollos, lo que podría dar pie a pensar que la homeostasis del calcio es distinta en ellas.

4. Desarrollo.- Los valores obtenidos en la acumulación de  $^{45}\text{Ca}$  durante el desarrollo no son significativamente distintos entre si, por lo que es posible afirmar que el sistema de transporte de calcio está presente en embriones de seis días de incubación, tiempo en el que una gran parte de las células del epitelio pigmentario están ya diferenciadas. El epitelio pigmentario es el primer tejido pigmentario que empieza a sintetizar pigmento y a diferenciarse (115), y de acuerdo a Dräger (29) la acumulación de calcio empieza a ser significativa desde que se observa síntesis de melanina.

Se probó el efecto de la iluminación y del potasio alto en la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en células del epitelio pigmentario

durante el desarrollo. Dicha acumulación no se modificó, excepto en el día de la eclosión cuando la acumulación en presencia de luz aumentó en un 100%. Es difícil explicar este resultado ya que sólo se presenta en esta edad, pero la eclosión es un proceso que conlleva a cambios generalizados en la fisiología del animal, reajustes que pudieran explicar esta diferencia.

5. Relación con la pigmentación.- Se puede afirmar que las distintas variedades de pollos acumulan calcio mediante el mismo sistema ya que en todos la iluminación y el alto potasio a diferentes edades no tuvieron ningún efecto sobre la acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ . La acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  declinó también en las tres variedades en función de la edad, aunque menos evidente en los pollos negros. Esta declinación puede deberse a que aumenta, con el crecimiento, el tamaño del ojo y el tamaño de las células del epitelio pigmentario y como consecuencia la cantidad total de proteína, pero no los mecanismos de acumulación, ni la cantidad de melanina y tampoco la capacidad de acumulación de calcio. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a los niveles de acumulación: estadísticamente los pollos negros acumulan mayores cantidades de calcio que los blancos y rojos. Se ha propuesto que la melanina sirve de almacén de calcio en las células pigmentadas, ya que es capaz de quelarlo de manera dependiente del pH en grandes cantidades. Dräger (29) ha observado resultados similares a los del presente trabajo en la acumulación de calcio entre variedades melanóticas y amelanóticas de ratones, así como entre el tapetum lucidum y epitelio pigmentario del gato. Panessa y Zaduniasky (82) reportan lo mismo en el tapetum lucidum y

epitelio pigmentario del gato y en conejos albino y pigmentado. En ambos trabajos los tejidos con mayor cantidad de pigmento acumularon mas calcio. Dräger (29) obtuvo una curva de acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /cantidad de melanina con melanina sintética y estimó que un gramo de melanina sintética era capaz de acumular entre 10 y 100 mgr. de calcio en presencia de 1mM de calcio en el medio; al repetir el experimento con melanina natural obtuvo una relación más alta aún, lo que concuerda con nuestros datos. (tabla 2) El pH ácido inhibe la acumulación de calcio por la melanina y se ha sugerido que los cambios en el pH interno de los melanosomas modulan las concentraciones de calcio (29).

Los pollos negros y rojos presentan una cantidad de melanina significativamente mayor que los blancos a diez días postnatales. Al parecer, la cantidad de melanina varía poco con la edad. En general, se observa una relación directa entre pigmentación y acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en el presente trabajo. La melanina puede interferir en la determinación de proteína, lo que podría dar por resultado que algunas de las muestras usadas en este trabajo estén subestimadas. Esto podría explicar porque las diferencias de melanina de los pollos rojos con los negros no fueron significativas. También es posible que el arreglo o 'empacamiento' de la melanina altere su capacidad de acumulación de calcio y que este hecho explique las diferencias observadas entre la melanina sintética y la natural reportada por Dräger (29) como las diferencias observadas de acumulación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  entre pollos rojos y blancos. Esto último podría deberse a un arreglo molecular distinto de la melanina, o a distinto número

de melanosomas. Sin embargo, no es mucho lo que se puede avanzar en este aspecto, dada la poca información que se tiene sobre la bioquímica y metabolismo de la melanina (115). Es de interés notar, finalmente, que en experimentos con ratones y ratas con diferente grado de pigmentación, y aún entre variedades albinas de estos mismos animales, se ha probado la existencia de factores genéticos distintos que gobiernan las diferentes respuestas de la retina de estos animales al daño fótico (61, 62, 63 y 64); algunos de estos factores pueden estar implicados en la producción de melanina, y alterar su capacidad de acumulación de calcio.

## Bibliografía

1. ADLER, A.J. y K. J. MARTIN, 1983. Lysosomal enzymes in the interphotoreceptor matrix: acid protease, Exp. Eye Res., 2 (6): 359-366.
2. AGUIRRE, G., 1986. "Phagocytic cells in the interphotoreceptor space: correlation with disease stage in canine progressive rod-cone degeneration", en Retinal Signal Systems, Degenerations and Transplants, editado por Agarath, E. y B. Ehinger. (Elsevier Science Publishers: U.S.A.), 193-200.
3. ANDERSON, M., 1984. Myoepithelial cells from a polychaete worm, Puerto Rico Health Sciences Journal, 3 (3): 113-123.
4. ASAI, H. y T. UCHAI, 1987. Dependence on ionic strength of the calcium-induced contraction of glycerinated stalk of the peritrich ciliate, Vorticella convallaria, Comp. Biochem. Physiol., 87A (3): 565-567.
5. BAKER, F. F., 1986. GTP and calcium release, Nature. 320 (3): 395.
6. BEAULATON, J., G. NICAISE, G. NICOLAS y R. LOCKSIN, 1986. Programmed cell death. X-ray microanalysis of calcium and zinc within electron-dense droplets of the T system in insect muscles. Biol. of the Cell, 56: 271-282.
7. BESHARSE, J. C. y D. A. DUNIS, 1983. Rod photoreceptor disc shedding in eye cups: relationships to bicarbonate and amino acids, Exp. Eye Res., 36: 567-580.
8. BESHARSE, J. C. y D. A. DUNIS, 1983. Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding, Science. 219: 1341-1343.
9. BESHARSE, J. C., G. SPRATT y D. M. FORESTNER, 1986. Light-evoked and kainic-acid-induced disc shedding by rod photoreceptors: differential sensitivity to extracellular calcium, Jour. Comp. Neurology, 251: 185-197.
10. BIRMELIN, M. y K. DECKER,, 1983.  $Ca^{2+}$  flux as an initial event in phagocytosis by rat Kupffer cells, Eur. Jour. Biochem., 131: 539-543.
11. BOULTON, M. y M. J. MARSHALL, 1985. Repigmentation of human retinal pigment epithelial cells in vitro, Exp. Eye Res., 41: 209-218.
12. BRIDGES, C.D.B., M. S. OKA, S.-L. FONG, G.I. LIU y R. A. ALVAREZ, 1986. Retinoid-binding proteins and retinol esterification in cultured retinal pigment epithelium cells, Neurochem. Int., 8 (4): 527-534.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

13. BRIGGS, R. T., J. E. CHAFFEE y M. ANDERSON, 1985. Calcium-containing granules in myoepithelial cells of the polychaete Syllis spongiphila: possible ionic modulators, Tiss. & Cell, 17 (6): 923-928.
14. BRONNER, F. y M. PETERLIK, editores, 1984. Epithelial calcium and phosphate transport. Molecular and cellular aspects (Progress in clinical and biological research, vol. 168), Alan R. Liss, Inc.: U.S.A., 392 pp.
15. BRYCESON, K. P., 1986. The effect of screening pigment migration on spectral sensitivity in a crayfish reflecting superposition eye, Jour. Exp. Biol., 125: 401-404.
16. CALDWELL, R. B. y B. J. MCLAUGHIN, 1984. Redistribution of Na-K ATPase in the dystrophic rat retinal pigment epithelium, Jour. of Neurocytol., 13: 895-910.
17. CAMPBELL, A. K., 1983. Intracellular calcium, its universal role as regulator, (John Wiley & Sons Limited: U. K.), 556 pp.
18. CAMPBELL, R. C., 1974. Statistics for biologists, 2a edición, (Cambridge University Press: U.K.), 385 pp.
19. CARAFOLI, E. y M. CROMPTON, 1978. The regulation of intracellular calcium, Curr. Top. Membr. Transp., 10: 151-216.
20. CARAFOLI, E., 1987. Intracellular calcium homeostasis, Ann. Rev. Biochem., 56: 395-433.
21. CHAITIN, M. H. y M. O. HALL, 1983. Defective ingestion of rod outer segments by cultured dystrophic rat retinal pigment epithelial cells, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 24: 812-820.
22. CLARK, V. M., 1986. "The cell biology of the retinal pigment epithelium" en The retina A model for cell biology studies, parte II, editado por R. Adler y D. Farber, 129-169.
23. COHEN, D. y I. NIR, 1984. Sialic acid on the surface of photoreceptors and pigment epithelium in RCS rats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 25: 1342-1345.
24. LACOUR, M., H. LUND-ANDERSEN y T. ZEUTHEN, 1986. Potassium transport of the frog retinal pigment epithelium: autoregulation of potassium activity in the subretinal space, Jour. Physiol. 375: 461-479.
25. DAY, J., I. GRIERSON, W. G. UNGER y E. ROBINS, 1986. Some effects of phagocytosis on bovine meshwork cells in culture. Exp. Eye Res., 43 (6): 1027-1037.
26. DAVIS, S. M. y G. NIEMEYER, 1986. Dopamine influences the light peak in the perfused mammalian eye. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 27: 330-335.

27. DIMATTIO, J., K. J. DEGNAN y J. A. ZADUNIASKY, 1983. A model for transepithelial ion transport across the isolated retinal pigment epithelium of the frog, Exp. Eye Res., 37: 409-420.
28. DOCHERTY, R. J. y J. G. EDWARDS, 1984. Chick embryonic pigmented retina is one of the group of epitheloid tissues that lack cytokeratines and desmosomes and have intermediate filaments composed of vimentin, Jour. Cell Sci., 71: 61-74.
29. DRAGER, U. C., 1985. Calcium binding in pigmented and albino eyes, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82: 6716-6720.
30. EBASHI, S., 1985.  $Ca^{2+}$  in biological systems, Experientia, 41: 978-981.
31. EFFRON, R., B. SZAMIER y R. B. EDWARDS, 1981. Selective phagocytosis of liposomes by cultured RCS rat retinal pigment epithelium, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 26: 611-616.
32. EVERED, D. y J. WHELAND, 1986. Calcium and the cell, (Ciba Foundation Symposium; 122), (John Wiley: U. K.), A-Wiley-Interscience publication, 300 pp.
33. FITE, K. V., L. BENGSTON y P. DORAN, 1985. Retinal pigment epithelial correlates of avian retinal degeneration: electron microscopic analysis, Jour. Comp. Neurol., 231: 310-322.
34. FRAMBACH, D. A. y D. S. MISFELDT, 1983. Furosemide-sensitive Cl transport in embryonic chick retinal pigment epithelium, Am. J. Physiol., 244: F679-F685.
35. FRICKE, U., 1975. Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100, Anal. Biochem., 63: 481-48 .
36. FRIEDMAN, Z., S. F. HACKETT y P. A. CAMPOCHIARO, 1988. Human retinal pigment epithelial cells possess muscarinic receptors coupled to calcium mobilization, Brain Res., 446: 11-16.
37. GILBERT, S. F., 1985. Developmental Biology, (Sinauer Associates, Inc: U.S.A.), 726 pp.
38. GILL, D. L., T. UEDA, S.-H. CHUEH y M. W. NOEL, 1986.  $Ca^{2+}$  release from endoplasmic reticulum is mediated by a guanine nucleotide regulatory mechanism, Nature, 320: 461-464.
39. GOLDMAN, A. I., P. J. O'BRIEN, E. MASTERTON, P. ISRAEL. P. TEIRSTEIN y G. J. CHADER, 1979. A quantitative system for studying phagocytosis in pigment epithelium tissue culture. Exp. Eye Res., 28: 455-467.
40. GORDON, R. S. y E. ESSNER, 1987. Investigations on circumferencial microfilament bundles in rat retinal pigment epithelium, Euro. Jour. Cell Biol., 44: 97-104.



41. HALL, M. O., 1978. Phagocytosis of light- and dark- adapted rod outer segments by cultured pigment epithelium, Science, 202: 526-528.
42. HEWITT, A. T. y D. A. NEWSOME, 1987. Altered glycoconjugates in cultures of retinitis pigmentosa retinal pigment epithelium, en Degenerative Retinal Disorders: Clinical and Laboratory Investigations, editado por J. G. Hollyfield, R. E. Anderson y M. M. LaVail, (Alan R. Liss, Inc.: U.S.A.), 79-92.
43. HUANG, P. T., A. W. SPIRA y J. P. HY. WYSE, 1982. Phagocytosis in the fetal pigment epithelium: evidence for cyclic activity, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 22: 428-438.
44. HUGHES, B. A., S. S. MILLER y T. E. NACHEN, 1984. Effects of cyclic AMP on fluid absorption and ion transport across frog retinal pigment epithelium, Jour. Gen. Physiol., 83: 875-899.
45. ISHIBASHI, T., N. SARGENTE, R. PATTERSON y S. J. RYAN, 1986. Pathogenesis of drusen in the primate, Inves. Ophthalmol. Vis. Sci., 27: 184-193.
46. IZANT, J. G., 1983. The role of calcium ions during mitosis, Chromosoma, 88: 1-10.
47. KAUPP, U. B. y K.-W. KOCH, 1984. Cyclic GMP releases calcium from leaky rod outer segments, Vision Res., 24 (11): 1477-1479.
48. KEMALI, M., N. MILICI y D. KEMALI, 1986. Melatonin and LSD induce similar retinal changes in the frog, Biol. Psychiatry, 21: 981-985.
49. KOH, S.-W. M. y G. J. CHADER, 1984a. Agonist effects on the intracellular cyclic AMP concentration of retinal pigment epithelial cells in culture, Jour. Neurochem., 42: 287-289.
50. -----, 1984b. Retinal pigment epithelium in culture demonstrates a distinct beta-adrenergic receptor, Exp. eye Res., 38: 7-13.
51. -----, 1986. Cyclic AMP-linked neurotransmitter and neuropeptide receptors of the chick pigment epithelium, en Retinal signal systems, degenerations and transplants, editado por E. Agarthy y B. Ehinger, (Elsevier Science Publishers: U.S.A.), 115-127.
52. KOLB, H.-A. y J. UBL, 1987. Activation of anion channels by zymosan particles in membranes of peritoneal macrophages, Biochim. Biophys. Acta, 899: 239-246.
53. KORENBROT, J. I. y R. A. CONE, 1972. Dark ionic flux and the effects of light in isolated rod outer segments, Jour. Gen. Physiol., 60: 20-45.

54. KORTE, G. E., 1984. New ultrastructure of rat RPE cells: basal intracytoplasmic tubules, Exp. Eye Res., 38: 399-409.
55. KORTE, G.E. y D. HIRSCH, 1986. Intercellular junctions of hyperplastic retinal pigment epithelium, Experientia, 42: 812-815.
56. KORTE, G. E., R. W. BELLHORN y M. S. BURNS, 1986. Remodeling of the retinal pigment epithelium in response to interepithelial capillaries: evidence that capillaries influence the polarity of epithelium, Cell Tiss. Res., 245: 135-142.
57. KORTE, G. E. y G. GOLDBERG, 1986. Comparative study of a new ultrastructural specialization of the mammalian retinal pigment epithelium: basal intracytoplasmic tubules, Jour. Morphol. 190: 319-324.
58. LAUBER, J. K., 1982-83. Retinal pigment epithelium: ring mitochondria and lesions induced by continuous light. Current Eye Res., 2 (12): 855-862.
59. LAVAIL, M. M. y N. R. LAWSON, 1986. Development of a congenic strain of pigmented and albino rats for light damage studies, Exp. Eye Res., 43: 867-869.
60. LAVAIL, M. M., D. S. PAPERMASTER, C. D. B. BRIDGES, L. M. RAPP, F. GONZALEZ-FERNANDEZ y J. G. HOLLYFIELD, 1987. Absence of an inherited retinal degeneration in the WAG/Rij rat. Exp. Eye Res., 44: 465-469.
61. LAVAIL, M. M., G. M. GORRIN, M. A. REPACI, L. A. THOMAS y H. M. GINSBERG, 1987. Genetic regulation of light damage to photoreceptors, Invest. Ophthalmol. Vis Sci., 28: 1043-1048.
62. LAVAIL, M. M. y G. M. GORRIN, 1987. Protection from light damage by ocular pigmentation: analysis using experimental chimeras and translocation mice, Exp. Eye Res., 44: 877-889.
63. LAVAIL, M. M., G. M. GORRIN, M. A. REPACI y D. YASUMURA. 1987. Light-induced retinal degeneration in albino mice and rats: strain and species differences, en Degenerative Retinal disorders: Clinical and Laboratory Investigations, editado por J. G. Hollyfield, R. E. Anderson y M. M. LaVail. (Alan R. Liss: U.S.A.), 439-454.
64. LAVAIL, M. M., G. M. GORRIN y M. A. REPACI, 1987. Strain differences in sensitivity to light-induced photoreceptor degeneration in albino mice, Current Eye Res., 6 (6): 825-834.
65. LENTRICHIA, B. B., Y. ITOH, J. J. PLANTNER y E. L. KEAN, 1987. The influence of carbohydrates on the binding of rod outer-segment (ROS) disc membranes and intact ROS by the cells of the retinal pigment epithelium of the embryonic chick, Exp. Eye Res., 44: 127-142.

66. LIGHTMAN, S. L., A. G. PALESTINE, S. L. RAPOPORT y E. RECHTHAND, 1987. Quantitative assessment of the permeability of the rat blood retinal barrier to small water-soluble non-electrolytes, Jour. Physiol., 389: 483-490.
67. LONG, C. y b. MOUAT, 1973. The influx of calcium ions into human erythrocytes during cold storage, Biochem. Jour., 132: 559-570.
68. LOWRY, O. H., N. R. ROSEBROUGH, A. L. FARR y R. L. RANDALL, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, Jour. Biol. Chem., 193: 265-275.
69. MASTERTON, E. y G. J. CHADER, 1981. Pigment epithelial cells in culture, Invest. Ophthalmol. Vis Sci., 20 (1): 1-7.
70. MATSUMURA, M., N. OGINO, H. SHIRAKAWA, R. YAMAKAWA y I. TSUKAHARA, 1985. Exocytosis by retinal pigment epithelial cells. Ophthalmic Res., 17 (3): 148-153.
71. MATSUMOTO, B., D. M. DEFOE y J. C. BESHARSE, 1987. Membrane turnover in rod photoreceptors: ensheathment and phagocytosis of outer segment distal tips by pseudopodia of the retinal pigment epithelium, Proc. R. Soc. Lond. B, 230: 339-354.
72. MAYERSON, P. L. y M. O. HALL, 1986. Rat retinal pigment epithelial cells show specificity of phagocytosis in vitro, Jour. Cell Biol., 103: 299-308.
73. MCLAUGHIN, B. J., B. I. TARNOWSKI y V. L. SHEPHERD, 1987. Identification of mannose 6-phosphate and mannose receptors in dystrophic and normal retinal pigment epithelium, en Degenerative Retinal Disorders: Clinical and Laboratory Investigations, editado por J. G. Hollyfield, R. E. Anderson y M. M. LaVail. (Alan R. Liss: U.S.A.), 243-257.
74. MILLER, S. S. y R. H. STEINBERG, 1977. Active transport of ions across the retinal pigment epithelium, Exp. Eye Res., 25: 235-248.
75. MILLER, S. S., B. A. HUGHES y T. E. MACHEN, 1982. Fluid transport across retinal pigment epithelium is inhibited by cyclic AMP, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79: 2111-2115.
76. MILLER, S. y D. FARBER, 1984. Cyclic AMP modulation of ion transport across frog retinal pigment epithelium, Jour. Gen. Physiol., 83: 853-874.
77. MILLER, R. J., 1987. Multiple calcium channels and neuronal function, Science, 235: 46-52.
78. MISHINA, H. y K. KONDO, 1981. Extrusion of lysosomal bodies from apical mouse retinal pigment epithelium, Albrecht von Graefes Arch Klin Ophthalmol, 216: 209-217.

79. OAKLEY II, B., 1981. "Light-evoked changes in retinal extracellular potassium," en The application of ion-selective microelectrodes, editado por Zeuthen, (Elsevier-North Holland Biomedical Press: Holanda), 109-128.
80. OGINO, N., M. MATSUMURA, H. SHIRAKAWA y I. TSUKAHARA, 1983. Phagocytic activity of cultured retinal pigment epithelial cells from chick embryo: inhibition by melatonin and cyclic AMP, and its reversal by taurine and Cyclic GMP, Ophthalmic Res., 15 (2): 72-89.
81. OWARIBE, K. y H. MASUDA, 1982. Isolation and characterization of circumferential microfilament bundles from retinal pigmented epithelial cells, Jour. Cell Biol., 95: 310-315.
82. PANESSA, B. J. y J. A. ZADUNIASKY, 1981. Pigment granules: a calcium reservoir in the vertebrate eye, Exp. Eye Res., 32: 593-604.
83. PHILP, N. J. y V. T. NACHMIAS, 1987. Polarized distribution of integrin and fibronectin in retinal pigment epithelium. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 28: 1275-1280.
84. PRUSCH, R. D., 1986. Calcium and initial surface binding phase of pinocytosis in Amoeba proteus, Am. Jour. Physiol. 251 (Cell Physiol. 20): C153-C158.
85. RAPP, L. N. y T. P. WILLIAMS, 1980. The role of ocular pigmentation in protecting against retinal light damage, Vision Res., 20: 1127-1131.
86. REH, T. A., T. NAGY & H. GRETTON, 1987. Retinal pigmented epithelial cells induced to transdifferentiate to neurons by laminin; Nature, 330: 68-71.
87. ROSENSTOCK, T., R. BASU, P. K. BASU y N. S. RANADIVE, 1980. Quantitative assay of phagocytosis by retinal pigment epithelium: an organ culture model, Exp. Eye Res., 30, 719-729.
88. SALCEDA, R., 1986a. Isolation and biochemical characterization of frog retinal pigment epithelium cells, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 27: 1172-1176.
89. -----, 1986b. Calcium accumulation in retinal pigment epithelial cells, ARVO Abstr.
90. SANYAL, S., A. DE RUITER y CH. DEES, 1984. Light dependent accumulation of macrophages at the photoreceptor-pigment epithelial interface in the retina of albino mice, Experientia, 40: 852-854.
91. SANYAL, S. y G. H. ZEILMAKER, 1988. Retinal damage by constant light in chimaeric mice: implications for the protective role of melanin, Exp. Eye Res., 46: 731-743.

92. SAS Institute Inc., SAS User's Guide: Basics and Statistics, version 5 Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc.. 1985.
93. SCHULTZ, S. G., 1986. Cellular models of epithelial ion transport, chapter 31, en Physiology of Membrane Disorders. editado por Th. E. Andreoli, J. F. Hoffman, D. D. Farnesti y S. S. Schultz, (Plenum Publishing Corporation: U.S.A.), 519-534.
94. SEYFRIED-WILLIAMS, R. y B. MCLAUGHIN, 1983. The use of sugar-coated beads to study phagocytosis in normal and dystrophic retina, Vision Res., 23 (5): 485-494.
95. SEYFRIED-WILLIAMS, R., B. J. MCLAUGHIN y N. G. F. COOPER. 1984. Phagocytosis of lectin-coated beads by dystrophic and normal retinal pigment epithelium, Exp. Cell Res., 154: 500-509.
96. SIEGRIST, W. y A. N. EBERLE, 1986. In situ melanin assay for MSH using mouse B16 melanoma cells in culture, Analytical Biochem., 159: 191-197.
97. SHIRAO, Y., R. H. STEINBERG y E. R. GRIFF, 1987.  $K^+$  modulation of  $Na^+-K^+$  ATPase of the frog retinal pigment epithelium, Neuroscience Res., Suppl. 6: S1-S14.
98. STEINBERG, R. H., B. OAKLEY II y G. NIEMEYER, 1980. Light-evoked changes in  $\langle K^+ \rangle_0$  in retina of intact cat eye, Jour. Neurophysiol., 44 (5): 897-921.
99. STEPHENSON, D. A. y A. G. SEARLE, 1986. Effects of X-rays on the induction of somatic mutations and growth in the retinal pigment epithelium during development of the mouse eye, Mutagenesis, 1 (2): 135-141.
100. STRYER, L., 1987. The molecules of visual excitation, Sc. Am., 257 (1): 42-50.
101. SUGAYA, E. y M. ONOZUKA, 1978. Intracellular calcium: its release from granules during bursting activity in snail neurons, Science, 202: 1195-1198.
102. SUZUKI, J., T. NAKAGAWA, K. OGAWA y M. MORI, 1987. The effect of colchicine on the diurnal variation of phagocytosis in mouse retinal pigment epithelium, Exp. Eye Res., 44: 755-765.
103. TAMAI, M. y G. J. CHADER, 1979. The early appearance of disc shedding in the rat retina, Invest. Ophthalmol. Vis Sci., 18 (9): 913-917.
104. TARNOWSKI, B. I. y B. MCLAUGHIN, 1987. Phagocytic interactions of sialated glycoprotein, sugar, and lectin coated beads with rat retinal pigment epithelium, Current Eye Res., 6 (9): 1079-1089.

an overview, Comp. Biochem. Physiol., 82A (2): 249-255.

106. TSIEN, R. W., P. HESS, E. W. MCCLESKEY y R. L. ROSENBERG, 1987. Calcium channels: Mechanisms of selectivity, permeation and block, Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 16: 265-290.

107. TSIN, A. T. C., 1986a. Competition between retinol and 3,4-didehydroretinol for esterification in crude pigment epithelial cell fractions, Experientia, 42: 952-954.

108. -----, 1986b. Enzymatic esterification of exogenous retinol and 3,4-didehydroretinol in the retinal pigment epithelium, Jour. Exp. Zool., 238: 311-317.

109. TSUKAMOTO, Y., 1986. Pigment epithelial ensheathment and phagocytosis of rod tips in the retina of Rana catesbiana. Jour. Morph., 188: 303-313.

110. VOLLMER, G., P. G. LAYER y A. GIERER, 1984. Reaggregation of embryonic chick retina cells: pigment epithelial cells induce a high order of stratification, Neurosci. Letters, 48: 191-196.

111. VOLLMER, G. y P. G. LAYER, 1986a. Reaggregation of chick retinal and mixtures of retinal and pigment epithelial cells: the degree of laminar organization is dependent on age. Neurosci. Letters, 63: 91-95.

112. -----, 1986b. An in vitro model of proliferation and differentiation of the chick retina: coaggregates of retinal and pigment epithelial cells, Jour. Neurosci. 6 (7): 1885-1896.

113. -----, 1987. Cholinesterases and cell proliferation in "nonstratified" and "stratified" cell aggregates from chicken retina and tectum, Cell Tissue Res., 250: 481-487.

114. WORMINGTON, CH. M. y R. A. CONE, 1978. Ionic blockage of the light-regulated sodium channels in isolated rod outer segments, Jour. Gen. Physiol., 71: 657-681.

115. ZINN, K. M. y M. F. MARMOR, editores, 1979. The retinal pigment epithelium, (Harvard University Press: U. K.), 521 pp.

## INDICE DE FIGURAS

Figura #1. Capas de la retina de vertebrados.....pg.	3a
Figura #2. Fagocitosis de células del epitelio pigmentario de la retina de vertebrados.....pg.	10a
Figura #3. Electroretinograma.....pg.	11a
Figura #4. Células del epitelio pigmentario aisladas....pg.	24a