



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"TRANSFORMACION FIBROBLASTICA DEL EPITELIO  
PIGMENTADO DE LA RETINA EN CULTIVO: FUNCION  
DEL GLUTAMATO"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G A**

P R E S E N T A :

**SOFIA GARCIA HERNANDEZ**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ANA MARIA LOPEZ COLOME

2005

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

m.340356



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 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e internet el contenido de mi trabajo receptor.  
NOMBRE: Sofía García Hernández

FECHA: 26-ENE-05

FIRMA: [Firma]

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Transformación fibroblástica del Epitelio Pigmentado de la Retina en cultivo: función del Glutamato

realizado por **Sofía García Hernández**

con número de cuenta **09719784-9**, quien cubrió los créditos de la carrera de:  
**Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario **Dra. Ana María López Colomé**

*[Firma]*

Propietario **Dra. Mónica Lamas Gregori**

*[Firma]*

Propietario **Dra. Lourdes Massieu Trigo**

*[Firma]*

Suplente **Dra. María Luisa Fanjul Peña**

*[Firma]*

Suplente **M.en C. Octavio César García González**

*[Firma]*

**Consejo Departamental de Biología FACULTAD DE CIENCIAS**

**M.en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez**

*[Firma]*



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

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

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

*Antes que hombres de ciencias, deberíamos ser hombres...*

*Albert Einstein*

A mis papás, especialmente a mi mamá, por su apoyo incondicional de siempre.

A mis hermanas y hermanos, por los grandes momentos compartidos.

A todos mis amigos, por su vallosa amistad.

## AGRADECIMIENTOS

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

A la Dra Mónica Lamas Gregori, la Dra. Lourdes Massieu Trigo, la Dra. María Luisa Fanjul Peña y al M. en C. Octavio César García González, por sus valiosas sugerencias y comentarios en este trabajo.

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

A la Biol. Gabriela Rodríguez Rodríguez, por su excelente apoyo técnico.

A todos mis compañeros de laboratorio... por su valioso apoyo y amistad.

## Resumen

El epitelio pigmentado de la retina (EPR) es un mosaico de células poligonales interpuestas entre la coroides y la retina neural que juega un papel muy importante en el mantenimiento de la estructura y función de la misma. El EPR protege a la retina del daño fótico, regula la concentración iónica del espacio subretinal y forma la barrera hematorretiniana. Se ha demostrado la presencia de receptores de glutamato (GluRs) tanto ionotrópicos como metabotrópicos en membranas de células de EPR de pollo y de humano en cultivo primario y se ha sugerido su participación en la proliferación de estas células.

La vitreoretinopatía proliferativa (VRP) es un proceso patológico caracterizado por la ruptura de la barrera hematorretiniana, seguida por un cambio de las células del EPR de una forma poligonal y mitóticamente inactiva, a una forma aplanada y sin pigmento. Estas células migran hacia la cavidad vítrea y proliferan extensamente hasta formar membranas colágeno-celulares que, al contraerse, conducen al desprendimiento de la retina. Para prevenir tales alteraciones, es importante identificar los factores que las causan, entre los cuales el glutamato es un buen candidato para su estudio en este modelo *in vitro*, dada la importancia que constituye para la transmisión y funcionamiento de la relación retina-EPR.

En este trabajo se estableció un modelo de transformación fibroblástica en EPR de pollo de estas células en el que se reproducen en cultivo los cambios morfológicos identificados en el EPR humano en la VRP. Con el objetivo de identificar los posibles cambios que sufren los GluRs durante este proceso, se realizaron estudios de unión de radioligando. Se observó que, en cultivo, las células del EPR en pasajes consecutivos, sufren cambios morfológicos como la transformación fibroblástica y la pérdida del pigmento, en paralelo con una alteración de las características cinéticas de los GluRs. Tal alteración consiste en un aumento en el número de sitios receptores con menor afinidad con respecto a las células con morfología epitelial normal de un cultivo primario. Este modelo podría ser importante para entender los mecanismos moleculares mediante los cuales se lleva a cabo la dediferenciación celular del EPR durante la VRP.

## ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b>	1
<b>Introducción</b>	
Descripción de la retina	2
Descripción y funcionamiento del EPR	5
Receptores de glutamato	11
Receptores de glutamato y su posible función en el EPR	15
Otros aminoácidos	16
Vías de señalamiento intracelular activadas por el glutamato en el EPR	18
Importancia de la barrera hematorretiniana	19
Padecimientos por patologías del EPR	20
Vitreorretinopatía proliferativa	23
Desdiferenciación del EPR	24
Factores de crecimiento	26
<b>Objetivo</b>	32
<b>Materiales y métodos</b>	
Cultivo primario de EPR de pollo	33
Pasajes de EPR de pollo	34
Obtención de membranas	34
Ensayos de unión de radioligando	35
<b>Resultados</b>	
Diferencias entre cultivo primario de EPR y pasajes sucesivos	36
Cambios en la velocidad de proliferación inducidos por el subcultivo del EPR	42
Efecto de la congelación de las membranas sobre la unión específica de glutamato	42
Cambios en la unión específica de glutamato inducidos por el subcultivo	43
Comparación de la unión específica de glutamato en cultivo primario y pasaje 5	44
Curvas de saturación de la unión específica de glutamato en el EPR	45
<b>Discusión y conclusión</b>	49
<b>Referencias</b>	57



## Abreviaturas

AC	Adenilil ciclasa
ACPD	Ácido trans-1-amino-ciclopentil-1,3-dicarboxílico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-Isoxalproplonato
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
DAG	Diacil glicerol
ERG	Electrorretinograma
ERK 1/2	Cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2
EPR	Epitelio pigmentado de la retina
GABA	Ácido $\gamma$ -amino butírico
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GluRs	Receptores de glutamato
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
iGluRs	Receptores de glutamato ionotrópicos
Ips	Fosfatos de inositol
Ip <sub>3</sub>	Trifosfato de inositol
KA	Ácido kaínico
L- glu	Ácido glutámico
<sup>3</sup> H-Glu	Ácido glutámico tritiado
MAPKs	Cinasas de proteína activadas por mitógeno
mGluRs	Receptores de glutamato metabotrópicos
NMDA	N-metil-D-aspartato
PKC	Proteína cinasa C
PLA2c	Fosfolipasa citosólica A2
PLC	Fosfolipasa C
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
QA	Ácido quisquálico
RKB	Ringer Krebs bicarbonato
RP	Retinosis pigmentaria
SNC	Sistema nervioso central
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
VRP	Vitreorretinopatía proliferativa

## Introducción

### Descripción de la retina

La retina se localiza en la región posterior del ojo y constituye la parte fotosensible del mismo. Contiene a los fotorreceptores: los conos, responsables de la visión del color y los bastones, principales responsables de la visión en la oscuridad. Cuando los fotorreceptores se excitan, la señal luminosa se transmite a través de una sucesión de neuronas en la retina a través del nervio óptico y hasta la corteza cerebral. La retina tiene una estructura estratificada que incluye 10 estratos: el epitelio pigmentado, los segmentos externos de los fotorreceptores, la membrana limitante externa, la capa nuclear externa que contiene los cuerpos de los fotorreceptores, la capa plexiforme (sináptica) externa, la capa nuclear interna, la capa plexiforme interna, la capa de células ganglionares, las fibras del nervio óptico, y la membrana limitante interna. Desde la capa que contiene los segmentos externos de los fotorreceptores hasta la capa de fibras del nervio óptico son conocidas como la retina neural (Dowling, 1970).

En la retina de los vertebrados existen cinco tipos de neuronas: las células bipolares, las ganglionares, las horizontales, las amacrinas y los fotorreceptores (fig 1). En sentido transversal, las bipolares hacen sinapsis con los fotorreceptores en la capa plexiforme externa, y con las ganglionares en la capa plexiforme interna.

Los axones de las células ganglionares forman el nervio óptico, que conduce los impulsos hacia centros superiores de integración. Las células horizontales hacen sinapsis con los fotorreceptores y los interconectan en la capa sináptica externa, mientras que las amacrinas conectan a las células bipolares entre ellas en la capa plexiforme interna. Las células amacrinas forman sinapsis con las células bipolares y ganglionares, no tienen axones, y sus neuritas establecen conexiones pre y postsinápticas con las neuronas circundantes (Dowling, 1970).

Además de las células neuronales, en la retina de mamíferos se encuentran dos tipos de células gliales, los astrocitos y las células de Müller. Los astrocitos se

localizan en la superficie vítrea de la retina, junto a las células ganglionares. La glía radial de Müller atraviesa la retina y se ramifica en las capas plexiformes para envolver a los contactos sinápticos. Los procesos de estas células forman la membrana limitante interna en la superficie interna de la retina, y la externa en la capa de los fotorreceptores . Estas células gliales se encargan de la modulación sináptica en la retina, facilitando y/o deprimiendo la transmisión sináptica (Newman, 2004).

En la retina externa se llevan a cabo dos procesos importantes, uno es la separación de la información aferente en dos vías: la de las células bipolares que se despolarizan (ON) y las de aquellas que se hiperpolarizan (OFF) con la luz; otro es el establecimiento de interacciones laterales entre las células horizontales (Miller, 1985).

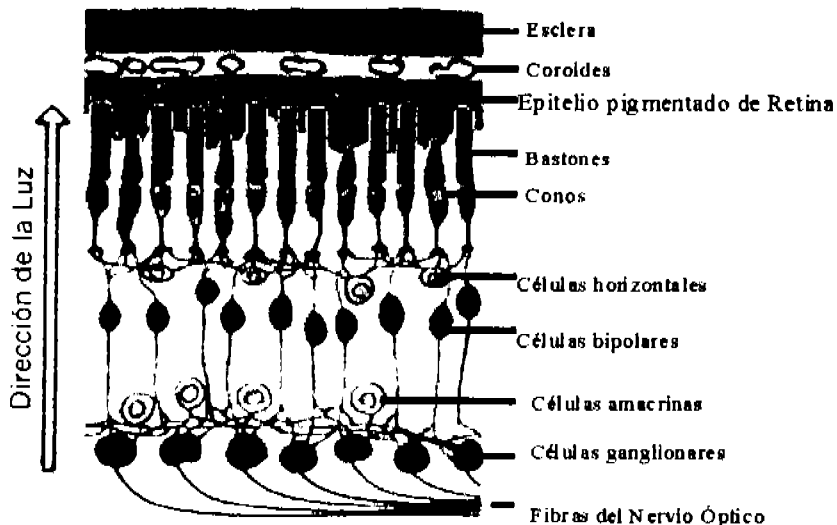


Figura 1. Estructura de la retina de vertebrados

El concepto de campo receptivo es importante para entender las respuestas ON y OFF. El campo receptivo de las células ganglionares es el área de la retina que la célula ganglionar controla. En la mayoría de células ganglionares el campo receptivo se divide en una zona circular en el centro y el área circundante. Las células con centro ON se excitan cuando se les aplica luz dirigida al centro de su campo receptivo. Si se aplica luz a su área circundante la célula se inhibe.

Las células ganglionares de centro OFF se inhiben cuando se les aplica luz al centro de su campo receptivo; si la luz se dirige al área que rodea su centro OFF la célula se excita. En ambos tipos de células ganglionares la respuesta generada por la iluminación alrededor cancela la respuesta generada por la iluminación en el centro casi completamente. Por esta razón, la iluminación difusa de todo el campo receptivo provoca una respuesta pequeña. Las células ganglionares activan dos rutas paralelas para el procesamiento de la información visual. Además, sus campos receptivos varían de tamaño en la retina. En la retina central (fóvea) de primates, donde hay agudeza visual el campo receptivo es pequeño. Mientras que en la periferia de la retina, donde la agudeza visual es menor, el campo receptivo es grande (Kandel et al., 2000)

Las neuronas visuales responden a encendido (ON) y apagado (OFF) de un estímulo de la luz o características más complejas como el color o la dirección de un movimiento. Cualquiera de esas preferencias se expresa como atributo del campo receptivo. La importancia funcional de las rutas ON y OFF se entiende mejor en términos de contraste. De las células bipolares hacia delante las neuronas responden mejor al contraste temporal y espacial que a los niveles absolutos de luz.

En la retina interna, las células bipolares ON y OFF ramifican sus terminales en zonas específicas de la capa plexiforme interna, las ON en la parte proximal y las OFF en la distal; las células ganglionares ON, OFF y ON-OFF se estratifican de manera consecuente. Las células amacrinas establecen contactos laterales con las células bipolares y ganglionares, así como con otras amacrinas. Estas células emplean, en general, como transmisores inhibidores al ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y a la glicina, principalmente.

La principal entrada excitadora que reciben la mayoría de células ganglionares es de las células bipolares. De modo que, esas células ganglionares también tienen respuestas ON y OFF en el centro de su campo receptivo de acuerdo con la clase de células bipolares que las excitan. En la mayoría de las especies hay células ganglionares adicionales ON-OFF que responden a cualquier transición, es decir, a encendido (on) y apagado (off) de la luz. Esas células reciben la entrada de ambas clases de células bipolares (Reid,1999).

Tanto los fotorreceptores como las células horizontales y las bipolares carecen de canales de  $\text{Na}^+$  sensibles al voltaje, por lo que no generan potenciales de acción, sino que tienen potenciales graduados (Reid,1999). En contraste, los axones de las células ganglionares transmiten señales a larga distancia en forma de trenes de potenciales de acción. Algunos tipos de células amacrinas también pueden generar potenciales de acción.

Las células gliales de la retina pertenecen a dos tipos fundamentales: los astrocitos, cuya morfología y función no difiere de manera significativa de los de otras regiones del sistema nervioso central (SNC), y la glía de Müller, que se extiende radialmente en el espesor de la retina atravesando los tres estratos de cuerpos celulares y las dos capas sinápticas (Schwartz,1993), por lo que participa en las interacciones metabólicas y la estratificación durante el desarrollo, ambos tipos forman parte de la barrera hematorretiniana.

### Descripción y funcionamiento del EPR

El EPR se deriva embriológicamente del mismo tejido neural que forma la retina (neuroectodermo). La vesícula óptica se invagina para formar una copa; de la capa interna se forma la retina neural y de la externa el EPR. Aunque la retina se diferencia en varias capas de neuronas, el EPR permanece como una monocapa que adquiere las características de un epitelio secretor.

El epitelio pigmentado de la retina es un mosaico de células poligonales interpuestas entre la coroides y la retina neural, recubriendo el fondo del ojo (fig.

2). Cada célula tiene un diámetro de aproximadamente 10 a 14  $\mu$  en la región macular, pero en la periferia alcanzan un diámetro de hasta 60  $\mu$  ( Marmor,1998). El EPR forma una monocapa polarizada cuya membrana apical y basolateral son morfológica y funcionalmente distintas (fig. 3). La membrana apical forma procesos que se interdigitan con los segmentos externos de los fotorreceptores en el espacio subretinal, mientras que la membrana basolateral hace contacto con la membrana de Bruch (Alge *et al*, 2003; Hughes,1998), la cual es una estructura compuesta de dos membranas (la del EPR y la de la coroides), separadas por una capa de colágena y es permeable a pequeñas moléculas (Clarck, 1986).

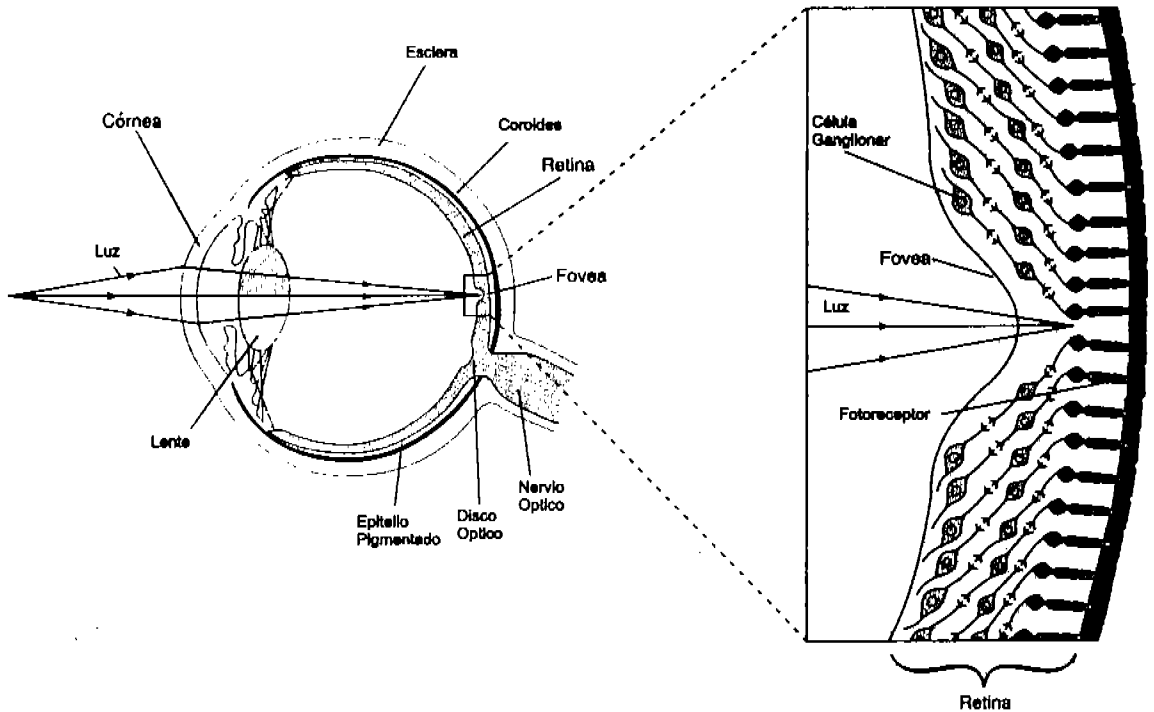


Figura 2. Ubicación de la retina y el EPR en el fondo del ojo

El color del EPR se debe a su contenido de melanina, principalmente eumelanina (pigmento café a negro). Los gránulos de melanina son abundantes en el citoplasma de células adultas de EPR, principalmente en la parte media y apical de la célula. En contraste con la rápida migración de los gránulos de melanina en respuesta a la luz que se observan en el EPR de peces, anfibios y algunas aves, en las células de EPR de mamíferos estos gránulos no migran, tal vez por adaptaciones oculares, tal como el efecto de la acción dilatadora de la pupila, lo cual protege a los segmentos externos de los fotorreceptores de la luz (Boulton,1998).

La melanogénesis se inicia vía dos eventos separados: la generación de premelanosomas (que contienen las proteínas estructurales de melanosomas) y, la síntesis de tirosinasa, una enzima esencial para la melanogénesis. Los premelanosomas se ensamblan en el retículo endoplásmico liso a partir de cuerpos multivesiculares que se conectan al RE rugoso, desde donde son liberados al citoplasma. La tirosinasa se sintetiza por ribosomas en el retículo endoplásmico rugoso y se glicosila y transporta vía RE liso al aparato de Golgi, desde donde se transfiere a los premelanosomas. La síntesis de melanina

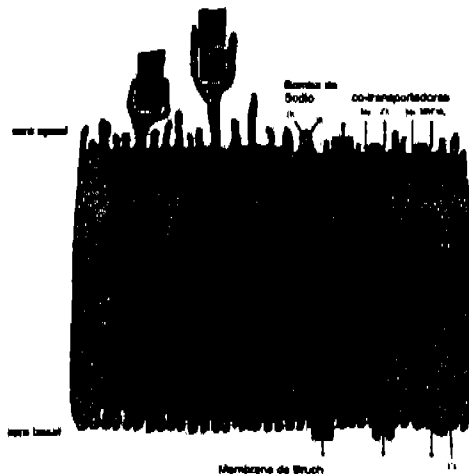


Figura 3. Esquema de una célula de EPR en la que se aprecian sus membranas apical y lateral

depende de la translocación de tirosinasa a los premelanosomas, la disponibilidad de substrato L-tirosina, el destino de los productos de oxidación generados durante los diferentes estados de la melanogénesis, y otros factores que influyen en el grado de polimerización (Boulton, 1998). La tirosinasa cataliza la conversión del aminoácido L-tirosina, a través de una serie de compuestos intermedios a melanina.

En cultivos primarios de EPR las células se dividen hasta formar una capa confluyente de células hexagonales poco pigmentadas. De los subcultivos de esas células resulta una población sin pigmento (Boulton 1998). Esta despigmentación se debe a la dilución de los gránulos de pigmento entre las células hijas. Sin embargo, hay evidencia de melanogénesis *in vitro* en células de EPR si se mantienen por suficiente tiempo en condiciones adecuadas. Las células cultivadas sintetizan cuerpos multilamelares que actúan de forma similar a los premelanosomas (Boulton, 1998). Además, al parecer la melanogénesis en células de EPR se regula por la matriz extracelular y por factores de crecimiento exógenos (Campochiaro y Hackett, 1993). La melanogénesis *in vitro* demuestra que el EPR adulto, dadas las condiciones adecuadas, expresa los genes necesarios para la producción del pigmento *in vivo*.

La importancia de la melanina radica en su capacidad protectora contra la luz y otros agentes. Tal importancia se resume en los siguientes puntos: 1) actúa como un filtro de densidad neutral, 2) atenúa el efecto de la radiación por la dispersión de la luz cuando se sitúa en el melanosoma, 3) absorbe la energía radiante en el espectro visible y UV y disipa la energía absorbida como calor, 4) tiene la capacidad de unirse a muchos fármacos, 5) utiliza la energía absorbida para sufrir oxidación inmediata y 6) como un radical libre estable, tiene la capacidad de actuar como un polímero de intercambio biológico (Boulton, 1998).

El papel fotoprotector de la melanina como quelante de radicales libres se ha pensado debido al ambiente y composición (altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados) de la retina como un ambiente ideal para la formación de radicales libres (Boulton, 1998). Aunque parece que el papel de la melanina como antioxidante es mínimo, el EPR también contiene otros antioxidantes en alta



concentración, incluyendo superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa, y alfa tocoferol (Boulton,1998).

El EPR tiene un papel muy importante en el mantenimiento íntegro de la estructura y función de la retina neural (Clarck, 1986). La contribución del EPR en la estratificación de los diferentes tipos celulares de la retina es esencial (Vollmer et al, 1984), ya que en presencia del mismo se forma la lámina basal, que juega un papel crucial en la inducción de la polarización e inicio del desarrollo de la retina (Wolburg et al., 1990). Además de proteger a la retina del daño fótico, el EPR está involucrado en varias funciones, tales como regulación iónica en el espacio subretinal y la formación de la barrera hematorretiniana (Clarck, 1986).

Una de las funciones mejor estudiadas del EPR es su participación en la renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores. Dado que las células fotorreceptoras no se dividen mitóticamente deben renovar constantemente las membranas fotosensibles para formar nuevos discos en la base del segmento externo, desplazando los segmentos viejos hacia el extremo; en donde el EPR los fagocita y degrada enzimáticamente por un sistema lisosomal (Aguirre, et al., 1985). Young y Bok (1969) demostraron el papel fundamental del epitelio pigmentado de la retina en la fase de eliminación y renovación de los segmentos externos de los bastones, los cuales al desprenderse sufren cambios químicos y son englobados en fagosomas (cuerpos de inclusión derivados de la fagocitosis de la membrana de los segmentos externos) del EPR para ser eliminados. Las células del EPR fagocitan y degradan proteínas y lípidos componentes de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores (Besharse y Defoe,1998). Las proteínas que se sintetizan en los segmentos internos se transportan a los segmentos externos y se incorporan a nuevos discos formados en la base de los segmentos externos. Se ha estimado que el EPR ingiere y degrada entre 25 000 y 30 000 discos de los segmentos externos de los fotorreceptores diariamente y que la captura de los discos y su degradación se lleva a cabo eficientemente en unas horas (Ershov y Bazan,2000).

Otra función del EPR es su participación en el ciclo de la vitamina A, que es de gran importancia para el proceso visual. La función básica del EPR es convertir la vitamina A (*all-trans* retinol) a 11-*cis*-retinal, que es el cromóforo sensible a la luz que se une covalentemente a la opsina para formar la rodopsina (Thompson, 2003). Los retinoides se mueven del EPR hacia los segmentos externos de los fotorreceptores a través de la matriz interfotorreceptora, para luego ser removidos durante la fagocitosis de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores. Una vez que los paquetes de discos son fagocitados por el EPR hay una fusión con lisosomas, proteínas de digestión, y se liberan los retinoides para unirse a una proteína de unión apropiada (por ejemplo, CRALBP) y volver entrar al ciclo visual (Chader, 1998).

Al constituir parte de la barrera hematorretiniana, el EPR aísla la retina y el segmento posterior del ojo de la circulación, creando un microambiente en el que se modulan las respuestas inmunes (Liversidge y Forrester, 1998) hacia antígenos foráneos. Además, media la transferencia de importantes componentes de la sangre a la retina (Clark, 1986), como el retinol de la circulación coroidal a los fotorreceptores (Pfeffer et al, 1986), el transporte de iones y agua, factores de crecimiento, pigmentos, glucosa, aminoácidos y otros nutrientes. Asimismo, el EPR lleva a cabo la síntesis y renovación de los constituyentes de la matriz interfotorreceptora y absorción de la luz (Aguirre, et al., 1985).

El transporte de iones, fluidos y metabolitos, a través del EPR se regula por señales extracelulares (parácrinas, autócrinas u hormonales), que se originan en la retina, en el mismo EPR, o en la sangre. En la luz y oscuridad, esas señales activan diferencialmente a receptores acoplados a proteínas G y otros mecanismos de sistemas de segundos mensajeros intracelulares (IP<sub>3</sub>, Ca<sup>2+</sup>, cAMP) que alteran directamente el transporte y función epitelial (Hughes et al., 1998). El transporte también puede ser regulado por mecanismos de reciclamiento localizados en las membranas basal o lateral, de manera que el EPR en algunos casos puede ser transformado de epitelio absorbente a epitelio secretor (Hughes et al., 1998).

En el EPR hay varias rutas de transporte, entre ellas de sodio, potasio, cloro, calcio, bicarbonato etc. Además de haber evidencia de transporte de otras sustancias como lactato y glucosa; así como de aminoácidos como glutamato taurina, GABA, alanina, leucina que son activamente absorbidos en el EPR

La absorción del fluido a través del EPR de la retina a la coroides se lleva a cabo mediante los cotransportadores  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  de la membrana apical y canales de  $\text{Cl}^-$  en la membrana basolateral. Ambas membranas determinan el volumen celular del EPR. El control del volumen subretinal resulta importante, pues su alteración no sólo afecta la concentración de iones y metabolitos afuera de los segmentos externos de los fotorreceptores, sino también altera el estado de hidratación de la matriz interfotorreceptora, afectando la adhesión celular (Hughes et al., 1998) y otras interacciones fotorreceptores-EPR.

Se ha reportado también la presencia de canales de calcio de tipo L en el EPR (Rosenthal y Strauss, 2002), implicados en las rutas de transducción de señales para la comunicación entre el EPR y los fotorreceptores, así como en la regulación de la secreción de varios factores de crecimiento, y en la regulación de la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores.

### Receptores de glutamato

Los receptores de glutamato se clasifican, con base en su mecanismo de transducción de señales, en dos grupos: receptores ionotrópicos, que forman un canal iónico y los metabotrópicos, aquellos acoplados a proteínas G y ligados a la activación de la fosfolipasa C (PLC), o la inhibición o activación de la adenilil ciclasa (AC; fig. 4).

Los receptores ionotrópicos (iGluRs) son tetrámeros. Cada subunidad consiste de un dominio extracelular amino terminal, un dominio de unión al ligando extracelular, y dominio intracelular carboxilo terminal. Dos subunidades forman un dímero, de modo que cada receptor está formado por dos dímeros que forman un canal para la entrada de iones. Los iGluRs se subdividen en tres familias, los

activados por N-metil-D-aspartato (NMDA), los que responden a  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA), y los sensibles a kainato (KA).

Los receptores de AMPA y KA llevan a cabo principalmente la neurotransmisión excitadora rápida en el SNC (Michaelis, 1998). Los receptores de AMPA responden rápidamente a la aplicación del agonista, los canales formados por estos receptores son permeables principalmente a  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ; se componen de subunidades conocidas como GluR1-GluR4. Los receptores de kainato se componen de las subunidades GluR5-GluR7, KA1 y KA2. La heterogeneidad de los receptores de AMPA y kainato depende de dos procesos: el proceso de edición (sitios R/G y Q/R), que se refiere a la alteración postranscripcional en la secuencia de nucleótidos del RNA mensajero. En las subunidades GluR2, GluR5 y GluR6 se ha identificado que el transcrito primario que codifica para glutamina se edita, originando una arginina en el sitio Q/R. La arginina en versiones editadas de GluR2 causa una disminución en la permeabilidad al  $\text{Ca}^{++}$  y una menor conductancia el canal. Además, las subunidades GluR2, GluR3 y GluR4 se editan en el sitio R/G. En este sitio, la sustitución de una arginina por una glicina se da en GluR3 y GluR4, lo cual reduce el tiempo de recuperación de la desensibilización. Este proceso es de importancia debido a que el 99% del RNAm para GluR2 se edita, y que la remoción del sitio Q/R produce epilepsia y muerte temprana (Dingledine, et al., 1999). El otro proceso es el corte y empalme alternativo (variantes flip y flop) del RNAm. Los receptores AMPA con la versión flip se desensibilizan más lentamente que los de la versión flop. Ambos procesos juegan un papel importante en la determinación de los parámetros farmacológicos y electrofisiológicos específicos de los receptores. Por lo anterior, la cinética de desensibilización de los receptores de AMPA depende de la composición de las subunidades (Vollmar et al., 2003; Madden, 2002; Dingledine, et al., 1999). Los receptores de AMPA y KA tienen una distribución diferencial en el sistema nervioso y para discriminar entre ambos tipos las 2,3-benzodiazepinas GYKI 52466 y GYKI 53655 son los mejores antagonistas por inhibir selectivamente los receptores de AMPA sin alterar la actividad de los receptores KA (Michaelis, 1998). Otros antagonistas como el CNQX, el DNQX y el NBQX bloquean

competitivamente a ambos receptores, KA y AMPA, pero CNQX y DNQX también inhiben receptores NMDA de manera no competitiva a través de interacción con sitios de reconocimiento de glicina en esos receptores (Pellegrini-Giampietro, et al., 1989).

El receptor de NMDA constituye un canal permeable a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$ ; se encuentra bloqueado por  $\text{Mg}^{2+}$  de manera dependiente de voltaje. Los receptores del tipo NMDA, a diferencia de los de AMPA y KA, responden al glutamato más lentamente y su contribución es principalmente al componente lento de corrientes postsinápticas excitadoras (Michaelis, 1998), por lo que la activación rápida de los receptores AMPA/KA es lo que lleva a la despolarización de la membrana postsináptica y la disminución del bloqueo de los receptores NMDA por  $\text{Mg}^{2+}$ , lo cual permite su activación. La activación de estos receptores se modula por varios compuestos endógenos como glicina, magnesio, poliaminas, zinc, agentes redox, óxido nítrico, protones y fosforilación de PKC (Liu y Zhang, 2000). Se ha demostrado la existencia de al menos cinco subunidades de los receptores de NMDA, NR1 y NR2A –NR2D, lo cual ha hecho posible investigar los mecanismos moleculares responsables de la regulación funcional de estos receptores. La subunidad NR1 se codifica por un gen y se conocen ocho variantes de corte y empalme alternativo funcionales, mientras que las subunidades NR2 se codifican por cuatro genes diferentes. Las propiedades funcionales del receptor dependen de la composición de las subunidades, los canales que tienen NR2A o NR2B son más sensibles al bloqueo por magnesio que los canales que contienen NR2C o NR2D (Liu y Zhang, 2000).

Hay cuatro categorías de los antagonistas para los receptores NMDA: los fosfonoaminoácidos que compiten por los sitios de reconocimiento del L-Glu y NMDA como son 2-AP5, 2-AP7, CPP, CPP-eno, los que bloquean los sitios de unión para el co-agonista glicina (ácido 5,7-dicloro-kinurénico, HA-966), los que inhiben el aumento alostérico de la activación del agonista por las poliaminas (ifenprodil), y los que inhiben el canal iónico del receptor al bloquear el canal abierto (MK-801, PCP, ketamina). Las dos últimas categorías son antagonistas no competitivos (Michaelis, 1998; Nankai et al., 1998).

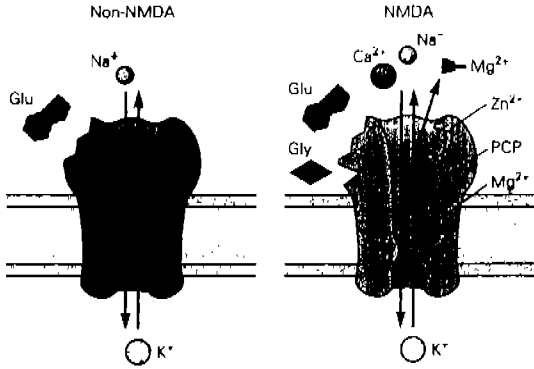
Los receptores metabotrópicos (mGluR), tienen propiedades farmacológicas únicas y un alto grado de variabilidad en los eventos de transducción de señales que siguen a su activación por agonistas. Los mGluR son producto de ocho genes (*mGlu1-8*) que se han clasificado en tres grupos con base en la analogía de su secuencia de aminoácidos, y en su mecanismo de transducción. La mayoría de genes *mGlu* generan variante por corte y empalme alternativo que difieren en su dominio carboxilo terminal, siendo mucho más grande el dominio de mGlu1a, mGlu5a y mGlu5b que las otras variantes (Fagni et al.,2004). Los mGluRs al igual que otros receptores metabotrópicos poseen siete dominios transmembranales, y el sitio de unión del glutamato se ubica en el dominio N-terminal extracelular (Conn y Pinn,1997).

El grupo 1 (mGlu1 y mGlu5), cuya localización es principalmente post sináptica, son receptores acoplados a la proteína Gq y estimulan a la fosfolipasa C (PLC) cuya activación lleva a la conversión catalizada de 1-3-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) a inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). EL DAG estimula la actividad de la PKC mediante un notable aumento de la afinidad de la enzima por los iones calcio, mientras que el IP<sub>3</sub> induce la liberación de Ca<sup>2+</sup> a través de su interacción con receptores específicos del retículo endoplásmico (Michaelis, 1998); para este grupo el quisqualato es el agonista más potente seguido por el glutamato, ibotenato y ácido 1-aminociclopentano dicarboxílico (1<sub>S</sub>,3<sub>R</sub>-ACPD). El segundo grupo de receptores (mGlu2 y mGlu3), se acopla a proteínas Gi/Go inhibiendo a la adenilil ciclasa (AC); el agonista específico para el grupo II es el 2R,4R-APCD. El tercer grupo (mGlu4, mGlu7, mGlu8), inhibe a las adenilil ciclasas y disminuye los niveles de AMPc a través de interacción directa con proteínas G sensibles a la toxina pertussis (PTX; Michaelis,1998). Los agonistas más efectivos son 1<sub>S</sub>,3<sub>R</sub>-ACPD, L-CCG, y quisqualato y, para algunas neuronas, 2-AP4. Los receptores del grupo II y el III se localizan preferencialmente en axones terminales. El receptor mGlu6 del grupo III se expresa estrictamente en la retina (Fagni,2004).

Las cascadas de señalamiento de los mGluRs parece ser más compleja que la de otros receptores metabotrópicos, ya que pueden activar a fosfodiesterasa de GMP

cíclico, fosfolipasa D, fosfolipasa A2 y rutas de proteínas activadas por mitógeno (MAPK; Fagni,2004).

**A Ionotropic glutamate receptor**



**Metabotrópicos**

**Ionotrópicos**

**B Metabotropic glutamate receptor**

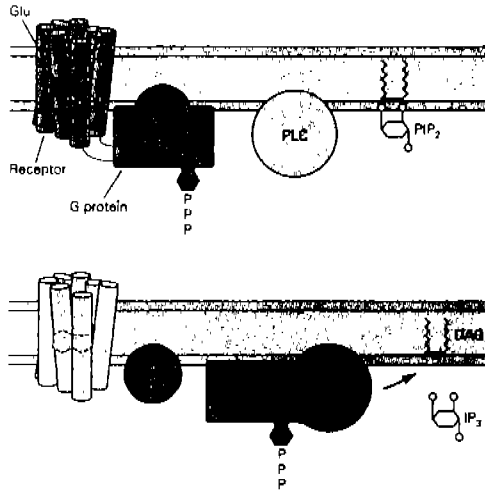


Figura 4. Receptores de glutamato

## Receptores de glutamato y su posible función en el EPR

El ácido glutámico o glutamato (L-Glu) constituye del 10 al 15% de la poza de aminoácidos libres en la retina de los vertebrados y el aspartato (L-Asp) del 2 al 10%, tal concentración es constante para todas las especies estudiadas. Las enzimas responsables de su síntesis, la deshidrogenasa málica y las transaminasas del aspártico y del glutámico, se localizan en el segmento interno de los fotorreceptores, lo cual apoya que el L-Glu y/o el L-Asp llevan a cabo la transmisión química a ese nivel. Tal transmisión se lleva a cabo cuando el glutamato se libera en la retina neural por despolarización inducida con estímulo luminoso, que a su vez induce la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores y la liberación de taurina y glicina en esas estructuras (López-Colomé, 1986; Massey, 1990).

Se ha demostrado la presencia de receptores de glutamato tanto ionotrópicos como metabotrópicos en membranas de células de EPR de pollo (López-Colomé y col., 1993b; López-Colomé y Fragoso, 1995) y de humano en cultivo primario (López-Colomé et al., 1994). La presencia y características bioquímicas y farmacológicas de receptores de glutamato en membranas de células de EPR en cultivo, se ha documentado a través de estudios de unión de radioligando, y se ha sugerido su participación en la proliferación y fagocitosis en el EPR a través de la activación de receptores metabotrópicos sensibles al QA, y ionotrópicos del tipo NMDA y AMPA/KA (López-Colomé et al., 1993b).

Greenberger y Besharse (1985), demostraron que el ácido glutámico (a concentraciones milimolares), además del aspartato y kainato, alteran el metabolismo de los fotorreceptores y el EPR, estimulando el desprendimiento de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores y la subsecuente fagocitosis de los mismos por el EPR, independientemente de la condición luz-oscuridad. Anteriormente habían reportado que los aminoácidos excitadores incrementan la adhesión entre el EPR y los fotorreceptores (Greenberger y Besharse, 1985).



Las neuronas de la retina pueden liberar grandes cantidades de glutamato en respuesta a varios tipos de estrés ocular, promoviendo la degeneración de la misma (Uchida,1998).

Uchida et al. (1998) reportaron que el glutamato, de manera dependiente de la concentración, estimula la proliferación de las células del EPR a través de receptores del tipo NMDA. Además vieron que el glutamato promueve la expresión del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), por lo que la proliferación podría deberse al efecto mitogénico de ese factor.

### Otros aminoácidos

Se ha encontrado que la taurina, la glicina y el GABA aumentan notablemente la unión de L-glu a los receptores en membranas de EPR de pollo (López-Colomé et al.,1993b).

La taurina (ácido  $\beta$ -amino-etanosulfónico), es estructuralmente similar a la glicina y al GABA. Es el aminoácido libre más abundante en la retina, predominando en los fotorreceptores de todas las especies (Pow et al., 2002); se concentra en los segmentos externos de los mismos alcanzando concentraciones intracelulares de 60 a 80 mM (Pasantes-Morales et al.,1972). Este aminoácido se deriva de la dieta o se sintetiza a partir de cisteína por la enzima biosintética cisteína sulfinato descarboxilasa (CSD; Tappaz, et al., 1992). Aunque el cerebro sintetiza una limitada cantidad de taurina, la mayoría de la síntesis ocurre en el hígado (Tappaz, et al.,1992). El transporte se lleva a cabo desde el flujo sanguíneo coroidal hacia la retina mediante el EPR, siendo éste, esencial para mantener la estructura de los fotorreceptores. La concentración de taurina varía en condiciones fisiológicas específicas, por ejemplo, con la estimulación fótica se libera taurina de los segmentos externos de los fotorreceptores. Se ha demostrado el efecto protector de este aminoácido en la degeneración inducida por la luz en segmentos externos de bastones aislados de rana (Pasantes-Morales, et al.,1981). También se ha reportado la presencia de sitios de unión de taurina en membranas de células

cultivadas de EPR de embriones de pollo (López-Colomé, et al., 1991). Se ha propuesto a la taurina como neuromodulador y transmisor (Tappaz et al.,1992), además de otros papeles como neuroprotección de la muerte celular excitotóxica (Pow, et al.,2002), regulación de la fosforilación de proteínas (Pow, et al.,2002), osmorregulación (Pow, et al.,2002; Kimelberg et al.,1990,2004), y estimulación de la proliferación de células de EPR en cultivo, tanto de humano como de conejo (Gabrielian et al.,1992). Además, se ha propuesto que la taurina juega un papel importante durante el desarrollo del cerebro, modulando los procesos de diferenciación neuronal, migración, y sinaptogénesis y desarrollo (Pow, et al.,2002). En tejidos de vertebrados, la taurina puede actuar como un agonista en receptores de glicina sensibles a estricnina y algunos receptores de GABA (Pow, et al.,2002).

La glicina cumple con dos funciones importantes en el SNC. Actúa como neurotransmisor inhibitorio en la médula espinal, tallo cerebral, y la retina (Gadea y López-Colomé, 2001). Su acción inhibitoria se lleva a cabo mediante un receptor de glicina que funciona como un canal de cloro activado por el ligando glicina y su antagonista competitivo es la estricnina (Gadea y López-Colomé, 2001). La glicina también participa en la neurotransmisión excitadora, actuando como un coagonista obligado del glutamato en receptores del tipo NMDA mediante un sitio de unión insensible a estricnina en ese receptor (Gadea y López-Colomé, 2001). La glicina tiene una distribución desigual en el SNC, con concentraciones más altas en el citoplasma y terminales de neuronas en médula y tallo cerebral (Zafra, et al.,1997). Se han identificado transportadores de glicina del tipo GLYT1 en el cerebelo y en la retina, principalmente en las células amacrinias. La localización neuronal de GLYT1 en la retina es atípica, ya que en el resto del cerebro se ha encontrado solamente en la glía (Zafra et al.,1995).

Estudios realizados en membranas de EPR de pollo han demostrado que la unión del glutamato a sus receptores puede modularse por aminoácidos inhibitorios como la glicina y la taurina; y que la glicina promueve la unión de L-Glu a los sitios de baja afinidad, lo cual podría estar relacionado la movilización de calcio para la

activación enzimática y la regulación del canal iónico (López-Colomé y Fragoso,1995), ya que la entrada de calcio es necesaria para la división celular y la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores. Lo anterior se apoya por la evidencia de que los receptores de glutamato ionotrópicos inducen la hidrólisis de fosfoinosítidos a través de la entrada de calcio en algunas células (López-Colomé et al.,1993a). La estimulación de la fagocitosis se acompaña de la liberación de taurina y de glicina de los segmentos externos de los fotorreceptores (López-Colomé et al.,1976). Se ha también demostrado que ambos compuestos estimulan la fagocitosis (Greenberger y Besharse,1985) y que la taurina ,además, promueve la proliferación de las células de EPR en cultivo (Gabriellian et al.,1992).

#### Vías de señalamiento intracelular activadas por el glutamato en el EPR

Dado que el L-glu se libera de la retina por estimulación luminosa y existen receptores específicos para el mismo en el EPR, la activación de la vía de los fosfoinosítidos podría estar involucrada en la regulación de la Interacción retina-EPR, que es esencial para el proceso visual (Fragoso y López-Colomé,1999).

La presencia de receptores específicos en la membrana de las células de EPR, así como de sistemas de transducción activados por los mismos, sería de gran importancia para el mantenimiento de una relación normal del EPR con la retina.

La vía intracelular del fosfato de inositol/diacilglicerol se activa a través de la estimulación, mediada por receptor, de la PLC (Berridge,1987), generando trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) y diacil glicerol (DAG). La función principal del  $IP_3$  es movilizar calcio de las pozas intracelulares, mientras que el DAG estimula a la proteína cinasa C (PKC). Esta vía constituye un mecanismo de señalamiento que controla repuestas celulares a corto plazo, como contracción, secreción y metabolismo. La ruta DG/PKC funciona principalmente como un sistema de retroalimentación interno diseñado para modular el señalamiento por calcio y la actividad de otros receptores (Berridge, 1987).

Se ha estudiado el efecto de la activación de receptores de glutamato sobre la formación de fosfatos de inositol (Ips) en células de EPR de pollo en cultivo primario (Fragoso y López-Colomé, 1999), encontrando que hay un aumento significativo en la concentración de  $IP_3$  a través de la interacción del L-glu con receptores ionotrópicos, principalmente de tipo NMDA, aunque también del tipo QA y KA, así como la activación de receptores metabotrópicos (mGluR1 y/o mGluR5) sensibles al QA. El orden de eficiencia del L-glu y sus agonistas en la acumulación de Ips a través de receptores ionotrópicos es:  $NMDA \geq L\text{-glu} > QA > KA > ACPD$ , y en los metabotrópicos  $ACPD \geq L\text{-Glu} > NMDA > QA > KA$  (Fragoso y López-Colomé, 1999).

Se sabe que los Ips modulan diversos procesos celulares como el crecimiento, y posiblemente se relacionan con la fagocitosis (Heth y col., 1995). Fragoso y López-Colomé (1999) realizaron un estudio enfocado a la identificación de los sistemas de transducción acoplados a los receptores de aminoácidos excitadores en las células del EPR en cultivo primario y demostraron que el L-glu estimula la cascada de IPs, así como la inhibición de la producción de cAMP mediante la activación de la PKC en cultivo de EPR, ya que esta enzima es estimulada por DAG, generado a partir de  $PIP_2$  estequiométricamente con  $IP_3$ .

#### Importancia de la barrera hematorretiniana

La formación de la barrera hematorretiniana por el EPR depende de la función de las uniones estrechas para crear una barrera de difusión restringida para solutos. Las uniones estrechas son el principal componente del complejo de unión, representan el substrato anatómico de la barrera hematorretiniana (Jin et al., 2002); las proteínas de las uniones estrechas son ZO-1, ZO-2 y ocludina en la membrana apical de las células de EPR. La ocludina tiene un dominio que se une a ZO-1 y ZO-2, que se unen al citoesqueleto. El dominio extracelular de la ocludina se une a otra molécula de ocludina en la célula adyacente para formar las

uniones estrechas responsables de la permeabilidad de la barrera (Jin et al.,2002). Las uniones estrechas, o *zónula ocludens*, son semiselectivas en su capacidad para retardar la difusión de solutos a través de los espacios paracelulares. La permeabilidad y selectividad de las uniones cambia durante el desarrollo volviéndose progresivamente menos permeable y selectivo (Ban y Rizzolo, 2000). Las uniones adherentes, o *zónula adherens*, son sitios ricos en filamentos de actina en todos los epitelios. Se unen a un cinturón continuo de esos filamentos, ahí se pegan a las células vecinas a través de moléculas de adhesión celular dependientes de calcio llamadas cadherinas, principalmente E-cadherina. Las cadherinas forman complejos con proteínas citoplasmáticas llamadas cateninas y con la actina del citoesqueleto. Las uniones adherentes facilitan la adhesión intracelular, proceso que también juega un papel clave en mantener la integridad del tejido y la morfología normal de las células del EPR (Bailey et al.,2004). Se ha demostrado que el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) provoca el desensamble de las uniones estrechas y las uniones adherentes (Jin et al., 2002); eso explica el hecho de que el suero inhiba la formación de uniones estrechas en cultivos de EPR, actividad que juega un papel importante en respuesta a la lesión de la barrera formada por la monocapa de células de EPR, contribuyendo a la progresión patológica debida a la disfunción de la barrera hematorretiniana (Chang et al.,1997) . La integridad de la barrera hematorretiniana es de vital importancia ya que la interrupción de la misma puede conducir a retinopatías como la vitreoretinopatía proliferativa (Bird, 1987).

#### Padecimientos por patologías del EPR

El EPR está situado estratégicamente entre las células fotorreceptoras y la coroides para mediar un número de actividades que son esenciales para la función normal y la viabilidad de los fotorreceptores. El papel crítico del EPR se ha apoyado por estudios llevados a cabo en la rata Royal College Surgeons (RCS), ya que en este modelo animal el desarrollo de la retina postnatal es normal

inicialmente pero comienza a degenerar cuando las células fotorreceptoras se han diferenciado. El sitio de la lesión genética se ha localizado en el EPR (Mullen y La Vail, 1976), al no ser capaz de llevar a cabo la fagocitosis de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores, los cuales se acumulan y llevan a la muerte de las células visuales (Aguirre, 1998), resultando en degeneración retinal y finalmente en ceguera. Clark y Hall (1986), propusieron que una posible causa por la que el EPR pierde su habilidad de fagocitar es que hay una glicosilación reducida de algunas proteínas de membrana en las células del EPR mutante.

Normalmente las células del EPR forman una monocapa y tienen la habilidad de dividirse y volverse a unir cuando las células se subcultivan, o bien cuando participan en la reparación de heridas. Proliferan fácilmente *in vivo* en respuesta a una variedad de estímulos como fotocoagulación y crioterapia retinal para reestablecer una monocapa continua. Sin embargo, después de daño severo que puede estar asociado con trauma ocular o desprendimiento de la retina las células del EPR pueden migrar al vítreo, en cuyo nuevo ambiente muestran una dediferenciación (Alge et al., 2003). La interrupción o perturbación de la comunicación entre el EPR y la retina neural puede conducir a retinopatías tales como retinosis pigmentaria o la vitreoretinopatía proliferativa (Bird, 1987). En algunas especies, incluyendo humanos, las células de EPR en cultivo sufren una dediferenciación después de algunos pasajes (López-Colomé et al., 1994) caracterizada por la pérdida del pigmento y la adquisición de una morfología fibroblástica, acompañada por la modificación de las propiedades bioquímicas y farmacológicas de los receptores de glutamato. También en cultivo se ha demostrado, que al interrumpir la continuidad de la monocapa, las células migran y proliferan para llenar el hueco mimetizando la reparación de heridas *in situ*, mecanismo durante el cual incrementa la expresión de receptores de PDGF y PDGF-b, sugiriendo que el factor de crecimiento derivado plaquetario (PDGF) es una estimulación autócrina de crecimiento en el EPR que juega un papel en la reparación de heridas retinales y la formación de membranas epirretinales (Campochiaro, et al., 1994).

Una patología común es la retinosis pigmentaria (RP), que se define como la manifestación de múltiples desórdenes determinados genéticamente, caracterizados por la pérdida de adaptación a la obscuridad y reducción progresiva del campo visual periférico afectando después a la visión central, en cuyo desorden se afectan tanto conos como bastones (Bird, 1987). Se ha visto que hay incremento en el depósito del pigmento y pérdida funcional de la retina (Sandberg et al., 1985), así como reducción en la amplitud de las ondas registradas en electroretinogramas (ERG) de pacientes con retinosis pigmentaria (Sandberg et al., 1985; Bird, 1987). El ERG proporciona información directa del funcionamiento de la retina. Los componentes principales de un electroretinograma son las ondas a, b y c. La porción inicial de la onda a representa la hiperpolarización de los segmentos externos de los fotorreceptores (Tzekov et al., 2003), mientras que el resto de la onda a es una respuesta de la glía a la disminución en la concentración de potasio en la región de los fotorreceptores. La onda positiva b refleja la despolarización de las células de Müller y representa indirectamente la actividad de las células bipolares on. La onda positiva c refleja la hiperpolarización del EPR y la hiperpolarización pasiva de los procesos distales de las células de Müller. Las ondas d se relacionan principalmente con la actividad de la retina distal y con las células de Müller. La oscilación rápida representa un retraso en la hiperpolarización del EPR. La oscilación lenta representa una despolarización de la membrana basal del EPR (Wachtmeister, 1998). En pacientes con RP las ondas a y b se reducen ya que el sitio principal del daño son los fotorreceptores o el EPR, pero también se ha detectado ausencia de las oscilaciones rápidas (Small y Marmor, 1998). Lo anterior se debe a la función anormal tanto de fotorreceptores como del EPR, pues la renovación de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores es un proceso continuo en el que participa activamente el epitelio pigmentado de la retina (Young y Bok, 1969; Greenberger y Besharse, 1985).

## Vitreorretinopatía proliferativa

La vitreorretinopatía proliferativa (VRP) es una de las principales retinopatías en las que el EPR está involucrado. Se cree que la patogénesis de la misma consta de varios pasos cruciales (Ando et al., 2000). El paso inicial puede ser desdiferenciación de las células del EPR: específicamente alteración morfológica de una forma poligonal y mitóticamente inactiva a una forma aplanada migratoria con pérdida de características epiteliales que se divide activamente. En el segundo paso, las células del EPR migran del espacio subretinal hacia la cavidad vítrea, y proliferan extensamente (Ando et al., 2000). Las células del EPR en proliferación se pueden transdiferenciar a miofibroblastos o a células mesenquimales y formar membranas epirretinales (Walshe et al., 1992). Finalmente, la membrana ejerce fuerza contráctil sobre la retina y lleva al desprendimiento de la misma (Ando et al., 2000). Se cree que esta enfermedad se origina por la entrada de macrófagos y leucocitos sanguíneos y compuestos del suero a la retina por la interrupción de la barrera hematorretiniana (Campochiaro et al., 1986). Altos niveles de interleucina 1 (IL-1) e IL-6 (Limb et al., 1991), del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ; Connor et al., 1989), y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF; Robbins et al., 1994) se han encontrado en el humor vítreo o en membranas epirretinales de pacientes con VRP. Particularmente, se ha demostrado que el PDGF es un potente estimulador de la proliferación e inductor de la migración (Campochiaro et al., 1993 y 1994), así como uno de los factores cruciales para la desdiferenciación de las células de EPR (Ando et al., 2000). Ando et al. (2000) demostraron que la alteración morfológica de las células del EPR se acompaña de una disminución en la expresión de citoqueratina y una nueva expresión de alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA).

Se ha demostrado que las células de EPR pierden sus características epiteliales y adquieren características mesenquimales por la expresión de  $\alpha$  actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), que es esencial para la actividad contráctil, durante los pasajes continuos de un cultivo (Grisanti y Guldry, 1995).



## Desdiferenciación del EPR

Los cultivos celulares de EPR representan un buen modelo para el estudio de la desdiferenciación del EPR (Campochiaro et al.,1998) en algunas condiciones patológicas. Cuando el microambiente de algunos tipos celulares se altera, ya sea por procesos patológicos *in vivo* o cultivando las células *in vitro*, sufren cambios en su morfología y comportamiento. Esto se cumple particularmente para células epiteliales y endoteliales que normalmente están asociadas con una membrana basal. Campochiaro et al. (1993), observaron que durante el cultivo de las células de EPR hay pérdida de pigmentación, además de su cambio morfológico. Abe et al. (1998), han estudiado la desdiferenciación del mismo tipo celular examinando la expresión de genes para la melanogénesis como la proteína-1 y 2 relacionada con tirosinasa (TRP-1 y TRP-2), pues se sabe que las tirosinasas catalizan la producción de melanina en células pigmentadas.

Se han hecho estudios inmunológicos de VRP en los que la Interleucina-6 (IL-6) se ha detectado en fluidos oculares y en membranas proliferativas de pacientes con VRP y se sospecha que juega un papel en el desarrollo de VRP (Limb et al.,1991), probablemente en la desdiferenciación (Abe et al.,1996).

Los hallazgos de hiperpigmentación o despigmentación así como también de membranas proliferativas en la cavidad vítrea se pueden explicar por la presencia/ausencia de tirosinasa y proteína 1 relacionada con tirosinasa (TRP y TRP-1) que son marcadores bien caracterizados para la diferenciación de melanocitos. Con el avance en la biología molecular y la enzimología, ha habido progreso significativo en la comprensión de la complejidad de los genes involucrados en la regulación del sistema de pigmentación, entre ellos las tirosinasas (Abe et. al.,1996).

Casaroli-Marano et. al, (1999) explican la desdiferenciación del EPR como una transición epitelial-mesenquimal. Sus estudios con proteínas de filamentos intermedios de células cultivadas de EPR indican una desdiferenciación en el

fenotipo hacia una morfología migratoria mesenquimal, lo cual puede también caracterizar los cambios metabólicos y funcionales en el crecimiento celular durante la VRP. En la VRP, después del desprendimiento retinal, el EPR pierde el contacto anatómico, a la vez que cambian su expresión las proteínas de filamentos intermedios, incrementando la vimentina y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), inducidas primero por el fluido subretinal y luego por el vítreo. Al mismo tiempo, las queratinas CK7, CK8 y CK18 tienden a disminuir, mientras que la CK19 aumenta o permanece constante; esta última se ha asociado con migración en cultivos de EPR (Casaroli-Marano et. al, 1999). Alge et. al, (2003) reportaron un incremento en la expresión de las proteínas del citoesqueleto en las células de EPR desdiferenciado, que incluyen  $\alpha$ -actina, gelsolina, una proteína de unión a  $\alpha$  actina que media la remodelación rápida de filamentos de actina, tropomiosinas, que son los principales componentes de las fibras de estrés en células mesenquimales, y coactosina, que se une a F-actina, así como la pérdida de la expresión de E-cadherina, una molécula de adhesión celular y marcador de células epiteliales (Saika et. al., 2004). Además, encontraron una disminución en la expresión de vinculina, proteína involucrada en la adhesión celular. Todo lo anterior podría reflejar una reorganización del citoesqueleto de las células que es necesario para que se adapten a un nuevo ambiente (Alge et al ,2003) como lo es el vítreo durante la VRP.

En las membranas epirretinales formadas durante la VRP predominan las células de EPR desdiferenciadas, pero también se encuentran fibroblastos, células gliales, y células inflamatorias como macrófagos y linfocitos (Casaroli-Marano,1999; Jin, 2000). Las células de EPR migran a través de una matriz extracelular provisional que se sintetiza localmente por varios tipos celulares incluyendo a las células del EPR y está compuesta principalmente de fibronectina y colágena del tipo I. Contrario a esto, la monocapa de células intactas se sitúa sobre una membrana basal compuesta principalmente de colágena tipo IV y laminina en la superficie interna de la membrana de Bruch (Marshall, 1998). Las células interactúan con la matriz intracelular mediante integrinas, por lo que la alteración en la expresión de

éstas conduce a desórdenes proliferativos. A este respecto se ha identificado aumento de la expresión de las Integrinas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$  en membranas de pacientes con VRP. Se sabe que las citocinas (por ejemplo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) influyen de manera importante en la expresión de integrinas (Jin et. al., 2000), por lo cual se ha estudiado la función del TNF- $\alpha$  para demostrar que éste incrementa la expresión de integrinas asociadas con la adhesión y la migración en una matriz extracelular provisional constituida de fibronectina y colágena tipo I; se ha visto que este efecto se lleva a cabo, al menos en parte, por la activación de la ruta de señalamiento de las MAP cinasas (Jin et. al., 2000).

### Factores de crecimiento

La estructura y función de las células del EPR se modula por varias señales provenientes de la matriz extracelular, de células vecinas, y de otras células. Los factores de crecimiento son uno de los principales tipos de señales. Se sabe que en el EPR y en la retina neural se producen algunos factores de crecimiento, y que algunos de ellos están involucrados en patologías del EPR. También se sabe que las células de EPR desdiferenciado de pacientes con VRP expresan más receptores para algunos factores de crecimiento que las células de EPR normales (Robbins et al., 1994), lo cual podría llevar a desórdenes en la proliferación de las células de EPR en condiciones patológicas que lleva a la pérdida de la visión (Campochiaro et al., 1994).

#### Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

El PDGF se ha identificado en muchos tipos celulares como plaquetas, macrófagos, células endoteliales vasculares y células de EPR (Kaven, 2000). Las isoformas de PDGF-A y PDGF-B ejercen su efecto uniéndose a dos receptores tirosina cinasa designados como receptor PDGF- $\alpha$  y receptor PDGF- $\beta$ . El PDGF-A se une al receptor  $\alpha$  o  $\beta$ , mientras que PDGF-B se une solamente al  $\beta$ . La unión del ligando induce la dimerización del receptor, lo cual activa la autofosforilación

del mismo necesaria para la transducción de señales (Campochiaro, 1998). Recientemente se ha identificado el PDGF-C y PDGF-D, que difieren de los A y B en que solamente forman homodímeros y no heterodímeros como los dos primeros. El PDGF-C se une con alta afinidad al receptor alfa en fibroblastos, donde su efecto es similar al de PDGF-A y B (LaRochelle et al.,2001) aunque su función no ha sido estudiada en el EPR. El PDGF-D es un ligando de alta afinidad para el receptor beta, sin embargo, en células que expresan los dos tipos de receptores, alfa y beta, activa a ambos (LaRochelle et al.,2001). Tanto PDGF- C como PDGF-D tienen un nivel alto de expresión en órganos como corazón, páncreas, riñón y ovario y pueden co-expresarse con PDGF-A y PDGF-B, además de expresarse también en células mesenquimales. Las rutas de señalamiento que se activan aún no se conocen (Li y Erikson, 2003).

El señalamiento mediado por PDGF participa durante el desarrollo embrionario en proliferación y migración; en el desarrollo temprano conduce la proliferación del mesénquima desdiferenciado y durante los estados de maduración participa en remodelamiento y diferenciación celular (Betsholtz et. al., 2001). También contribuye en el desarrollo de oligodendrocitos en sistema nervioso, desarrollo vascular y hematopoyético y de la cresta neural, así como organogénesis y somitogénesis (Hoch y Soriano, 2003). El incremento de este factor se ha implicado en varias condiciones patológicas en adultos, incluyendo arterioesclerosis, fibrosis, tumorigénesis y VRP (Li y Eriksson, 2003).

Los cultivos celulares de EPR expresan PDGF-A y B y sus respectivos receptores (Campochiaro, 1998;Robbins et. al.,1995). El PDGF se ha encontrado elevado en pacientes con VRP y se sugiere que actúa como un potente estimulante de la proliferación (Campochiaro et al, 1994) y la migración (Campochiaro y Glaser, 1985). Es un estimulante autócrino del crecimiento y juega un papel importante en la formación de la membrana epirretinal durante la VRP (Campochiaro et al, 1994). Se ha descrito al PDGF en varios tipos celulares, en los que activa a la AC y aumenta la síntesis de AMPc que, a su vez, induce la reiniciación de la síntesis de DNA (Kaven et al.,2000). Asimismo se ha demostrado que la autofosforilación del

receptor tirosina cinasa específico para PDGF, activa la cascada de señalamiento de las cinasas de proteína activadas por mitógenos (MAPK; Kaven et al.,2000).

#### Factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ )

El TGF- $\beta$  pertenece a un grupo de citocinas llamado superfamilia del TGF- $\beta$ , que comprende unas cien proteínas distintas, cuya expresión es ubicua en todas las células y es predominantemente una proteína extracelular (Chin et al., 2004). Es una citocina que afecta principalmente a células epiteliales y juega un papel importante en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la migración durante el desarrollo (Derynck y Zhang, 2003).

El TGF- $\beta$  inhibe el crecimiento de células endoteliales y epiteliales, incluyendo células de EPR, en las cuales bloquea el efecto mitogénico de otros factores de crecimiento. Es un estimulante de la producción de la matriz extracelular (Campochiaro, 1998).

Las células de EPR expresan las tres isoformas que se encuentran en mamíferos (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3), aunque predomina TGF- $\beta$ 2, al igual que en la coroides, la retina y el vítreo (Campochiaro, 1998). Además, en el EPR el TGF- $\beta$ 2 se localiza en la cara lateral de las células y el TGF- $\beta$ 3 en la cara apical (Anderson et al., 1995).

El TGF- $\beta$  se secreta de las células como un complejo de proteínas de alto peso molecular, compuesto por tres proteínas: el dímero maduro del TGF- $\beta$ , la proteína asociada a la latencia (LAP) y la proteína de unión latente (LTBP). El TGF- $\beta$  se activa por disociación de la LAP del TGF- $\beta$  maduro (Chin et al.,2004).

Varios estudios han demostrado que el TGF- $\beta$  es una citocina clave en la reparación de tejidos, y que la continua formación de este factor puede derivar en fibrosis del tejido. Lo anterior permite proponer la Intervención del TGF- $\beta$  en la patogénesis de la VRP. Se sabe que las células del EPR sintetizan TGF- $\beta$  (Lee et al.,2001). Al inicio del desarrollo de la VRP, el TGF- $\beta$  puede promover transformación epitelio-mesenquimal y luego aumentar la proliferación de las

células de EPR transformadas, lo cual sugiere la presencia de un sistema autócrino en el EPR en el desarrollo de la VRP (Lee et. al., 2001).

Hay dos receptores para la superfamilia del TGF- $\beta$ , el tipo I y el tipo II. Los receptores de tipo II pertenecen a una familia de cinasas de serina/treonina (Campochiaro, 1998), que en ausencia de ligando, existen como homodímeros en la superficie celular. El TGF- $\beta$ 2 y el TGF- $\beta$ 3 se unen a los receptores del tipo II (Derynck y Zhang, 2003).

El TGF- $\beta$  transduce señales a través de dos rutas diferentes, las proteínas Smad y las cinasas de proteína activadas por mitógeno (MAPK), a través de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK; Derynck y Zhang, 2003) y MAPK p38 (Kimoto et al., 2004). Las Smads son una familia de proteínas que se conocen como efectores intracelulares de señalamiento del TGF- $\beta$ , se activan por receptor (R-Smads) y se translocan al núcleo para regular la transcripción (Derynck y Zhang, 2003). En vertebrados se conocen ocho Smads: Smad1 a Smad8. Smad2 y Smad3 se activan por fosforilación en el carboxilo terminal cuando se une el ligando. Forman un complejo heteromérico de dos R-Smads y una Smad común o Smad4. Este complejo puede unirse directamente a los promotores de sus genes blanco, o asociarse con otros factores de transcripción para inducir la transcripción (Derynck y Zhang, 2003). Estudios realizados en EPR han demostrado que Smad3 es esencial para la transición epitelio-mesenquimal inducida por desprendimiento de la retina durante la VRP (Saika et al., 2004).

El TGF- $\beta$  activa asimismo la cascada de señalamiento de las MAPKs (Yue y Mulder, 2000), en forma independiente de las Smads. Las cinasas de proteína activadas por mitógeno (MAPKs) son enzimas ubicuas involucradas en la transducción de señales (Hecquet et. al, 2002). Su actividad es esencial en numerosas funciones celulares, incluyendo proliferación y muerte celular programada. Las cinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1 y ERK2), son las MAP cinasas mejor caracterizadas (Hecquet et. al, 2002). Uno de los activadores más importantes de ERK1/2 es la GTPasa Ras. Una vez que Ras se activa facilita la activación de la cinasa de serina/treonina Raf-1. Raf-1 activada fosforila y activa a la cinasa MAPK/ERK (MEK)1/2. El papel de MEK es fosforilar y

activar a ERK1 y ERK2 (también conocidas como p44 y p42, respectivamente). ERK1/2 regula la actividad por fosforilación de cinasas citosólicas, incluyendo a la fosfolipasa citosólica A2 (PLA2c) y a la cinasa de proteína P90<sup>RSK</sup>. ERK1/2 se localiza en el citoplasma y al activarse se transloca al núcleo para activar factores de transcripción involucrados en la regulación de proteínas del ciclo celular (Hecquet et. al, 2002; Thomas y Huganir, 2004).

#### Factor de crecimiento fibroblástico

Forma parte de la familia del factor de crecimiento fibroblástico. Inicialmente se le encontró en fibroblastos y ahora se sabe que actúa en varios tipos celulares. Se ha localizado en membranas de VPR y se sabe que se secreta, entre otros tipos celulares, por el EPR (Campochiaro, 1998).

Se ha visto que en cultivos celulares de EPR de pollo en presencia de FGFb las células se transdiferencian y expresan el antígeno RA4 (Yan y Wang, 2000), un marcador para células ganglionares (Campochiaro, 1998).

Se sabe que los FGFs estimulan la quimiotaxis, la proliferación, angiogénesis, y la producción de enzimas proteolíticas por células endoteliales vasculares, y que induce la diferenciación neuronal (Campochiaro, 1998).

Los FGFs actúan mediante una familia de receptores cinasa de tirosina. Los cultivos celulares de EPR producen al menos tres miembros de la familia de FGF, FGFb, FGF ácido y FGF-5. La expresión de FGFb se modula por la densidad celular, la adhesión celular, los componentes de la matriz extracelular, el estrés y por citocinas y es un estimulante de la proliferación celular (Campochiaro, 1998). Tanto el FGFa como el FGFb promueven la sobrevivencia de los fotorreceptores en ratas Royal College Surgeons y en ratas expuestas a iluminación constante. Tanto los fotorreceptores como el EPR producen FGFs y ambos tienen receptores a éste. Los FGFs se han identificado como agentes neuroprotectores, pero también como mitogénicos (Campochiaro, 1998).

Uchida et al. (1998), demostraron que el glutamato promueve la expresión del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), por lo que la proliferación en células de EPR podría deberse al efecto mitogénico de ese factor.

#### Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)

A este factor también se le conoce como factor dispersante (HGF). El HGF induce múltiples respuestas en sus células blanco. Típicamente, el HGF y su receptor tienen patrones distintos de localización; se sintetiza en células mesenquimales y actúa en células epiteliales de manera parácrina a través de su receptor c-Met.

Esta citocina promueve el cambio morfológico en las células sobre las que actúa, la dispersión de las mismas y la migración (Grierson et al, 2000). Se ha visto que el HGF causa la disociación de láminas epiteliales y las células adoptan un fenotipo fibroblástico, alteración de considerable importancia durante la transición epitelial-mesenquimal en el EPR durante la VRP (Grierson et al, 2000).

He et al. (1998), demostraron la expresión tanto de HGF como de c-Met en el epitelio pigmentado de la retina en el cual induce la proliferación y quimiotaxis. Sugirieron que el HGF podría ser un factor de crecimiento autócrino para el EPR y que podría estar involucrado en el desarrollo de la retina y en angiogénesis. Posteriormente se demostró que el EPR vía autócrina prolifera y se vuelve invasivo en un sustrato de colágena a través de la cinasa de adhesión focal (FAK; Van Aken et al., 2003), proteína cinasa de tirosina intracelular que regula el ciclo de formación del contacto focal y el desensamble requerido para el movimiento celular eficiente (Schlaepfer et al., 2004).

El nivel alto de HGF que se ha detectado en el vítreo de pacientes con VRP sugiere que este factor juega un papel crítico en la enfermedad. Lo anterior se apoya por los estudios que demuestran que el HGF induce el desensamble de las uniones adherentes y fuertes en la monocapa de células de EPR (Jin et al, 2002), lo cual facilita la migración de las mismas hacia el vítreo.



Se sabe que los factores de crecimiento activan la ruta de las MAP cinasas durante la migración de las células del EPR (Hinton et al., 1998). Hecquet et. al, (2002) reportaron el papel de la ruta de señalamiento Ras/Raf/MEK/ERK en el crecimiento celular de EPR humano, y demostraron que está involucrada en la proliferación celular inducida por suero. Se ha sugerido que la activación de varias rutas de señalamiento inducidas por los diferentes componentes del suero se requieren para el desarrollo y progresión de varias enfermedades proliferativas del EPR (Kaven et. al, 2000).

### Objetivo

La presencia de receptores específicos para el glutamato se ha demostrado en cultivo primario de células de epitelio pigmentado de la retina (EPR), tanto de pollo (López-Colomé et al., 1993; 1995) como de humano (López-Colomé et al., 1994) y se ha visto que las características bioquímicas y farmacológicas son similares.

En el presente estudio se pretende validar un modelo *in vitro* de transformación fibroblástica y proliferación de las células de EPR para reproducir en cultivo los cambios conocidos en la VRP. Así como la identificación de las diferencias bioquímicas y farmacológicas de los receptores de glutamato en células normales y desdiferenciadas, y su posible modificación debida a la transformación fibroblástica. Tal modelo será importante para la búsqueda posterior de los mecanismos moleculares mediante los cuales se lleva a cabo la desdiferenciación de las células del EPR.

## Materiales y métodos

### Cultivo primario de EPR de pollo

A los embriones de pollo de siete días de desarrollo se les extrajo la copa óptica, en condiciones de esterilidad, se realizó un corte ecuatorial y se extrajo el EPR de la parte posterior. El tejido se lavó con medio Ringer Krebs (RKB; contiene NaCl 118 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM, KCl 4.7 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.17 mM, glucosa 5.6 mM y  $\text{NaHCO}_3$  34.5 mM); se centrifugó 5 minutos a 1000 rpm a temperatura ambiente, el pellet obtenido se resuspendió en RKB a 37° C y se volvió a centrifugar. Este lavado se repitió 4 veces. Luego se agregó tripsina al 0.13 % en PBS durante 10 minutos a 37° C agitando de dos a tres veces durante la incubación para disociar el tejido. Se volvió a centrifugar y la tripsina se eliminó por decantación. Posteriormente se agregó medio Opti-Mem con 4% de FBS , 1% de antibiótico penicilina-neomicina-estreptomicina (PNS) y 0.1% de nistatina a 37° C y se resuspendió el pellet para homogeneizar la suspensión celular, la cual se pasó a través de una malla de nylon de 50  $\mu\text{m}$  de poro. Se tomaron 200  $\mu\text{l}$  para cuantificar las células. Se sembró en placas Nunc de 6 pozos con 2.5 ml de Opti-Mem a una densidad de 500 000 células/pozo. Se mantuvieron a 37° C con atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  durante 5 ó 6 días que llegaron a confluencia.

### Pasajes de EPR de pollo

Las placas en un 90 a 95 % en confluencia de cultivo primario se lavaron con medio Puck (NaCl, KCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , glucosa, rojo fenol y  $\text{NaHCO}_3$ ) a 37°, luego se incubaron durante 4 minutos en medio Puck con tripsina 0.125% para disociar; se retiró la tripsina y se agregó L-MEM suplementado con 1% de BSA (contiene glucosa,  $\text{NaHCO}_3$ , D-MEM, BSA, PNS, gentamicina y nistatina) y se resuspendieron las células y se centrifugaron 10 minutos a 1000 rpm. Se resuspendió el pellet en medio Opti-Mem y se contó el número celular. Se sembró en las mismas placas que el cultivo primario a una densidad de 1000 000

de células por pozo. Se mantuvieron a 37° C con atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 días que llegaron a confluencia los primeros pasajes y durante 2 a 3 días los últimos pasajes.

Tanto a cultivos primarios como a los diferentes pasajes se les tomaron micrografías con un microscopio de luz utilizando contraste de fases.

#### Obtención de membranas

Las células de EPR tanto de cultivo primario como de pasajes se cosecharon a los días de cultivo que se indican en cada caso. Se les quitó el medio de cultivo y se lavaron con Tris HCl 0.05 M pH 7.4, se desprendieron las células de la placa y rompieron en un homogenizador vidrio-vidrio a 40 volts y la suspensión homogénea se pasó a tubos para ultracentrífuga y se centrifugó a 28 000 rpm durante 20 minutos a 4° C. Se repitió 3 veces más este procedimiento y antes de la última vez se tomaron alícuotas para determinar la cantidad de proteína por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

#### Ensayos de unión de radioligando

Los receptores de glutamato se midieron por la unión específica de glutamato tritilado como ligando (<sup>3</sup>H-Glu), a las membranas de células de EPR primario y pasajes del mismo. De acuerdo con la cantidad de proteína se resuspendió la pastilla para tener un volumen de 50 µg/155 µl. Se usó buffer Tris HCl 0.1 M (pH 7.4). La unión inespecífica se definió mediante la adición de glutamato 1mM al ensayo. Se incubó 10 minutos a 4° C y la reacción se detuvo por centrifugación a 20 psi. La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido, usando como centellador el tritosol (Fricke,1975).

Los datos obtenidos se analizaron mediante una *t de student* utilizando el programa GraphPad Prism.

## Resultados

### Diferencias entre cultivo primario de EPR y pasajes sucesivos.

Con la finalidad de comparar morfológicamente un cultivo primario de EPR y los pasajes sucesivos se tomó fotografías a los diferentes cultivos en confluencia. El cambio morfológico más notable consiste de una forma cuboidal en el EPR primario a una forma aplanada en los pasajes más avanzados, así como la pérdida del pigmento en estos últimos. Esto se observa en la secuencia de fotos de la figura 5a – 5h.



Figura 5a. Cultivo primario de células de EPR de pollo, microfotografía con contraste de fases (20X)

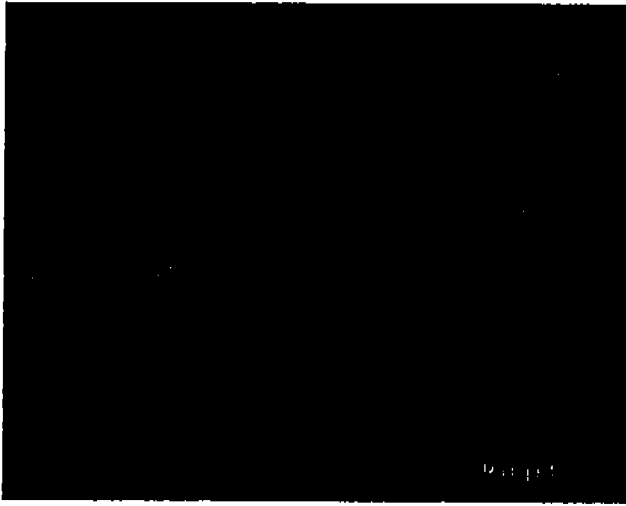


Figura 5b. Pasaje 1 de células de EPR de pollo, microfotografía con contraste de fases (20X)

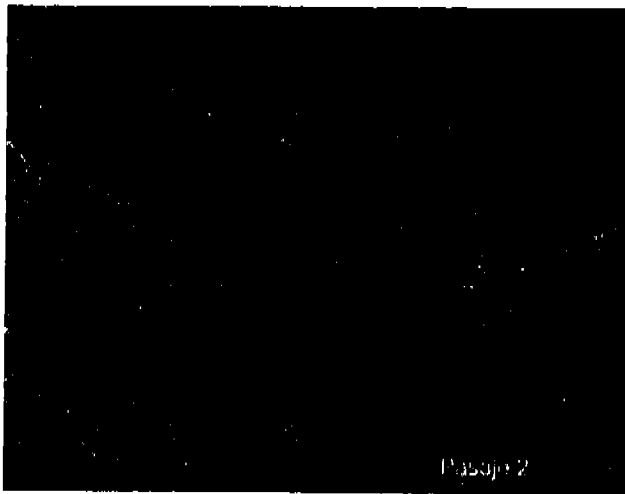


Figura 5c. Pasaje 2 de células de EPR de pollo, microfotografía con contraste de fases (20X)

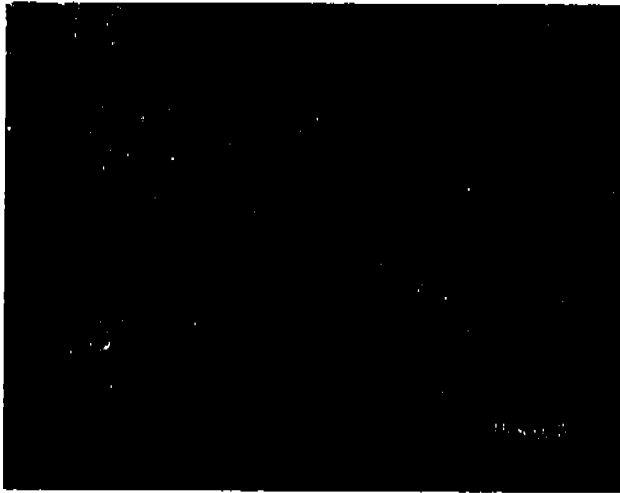


Figura 5d. Pasaje 3 de células de EPR de pollo, microfotografía con contraste de fases (20X)



Figura 5e. Pasaje 4 de células de EPR de pollo, microfotografía con contraste de fases (20X)

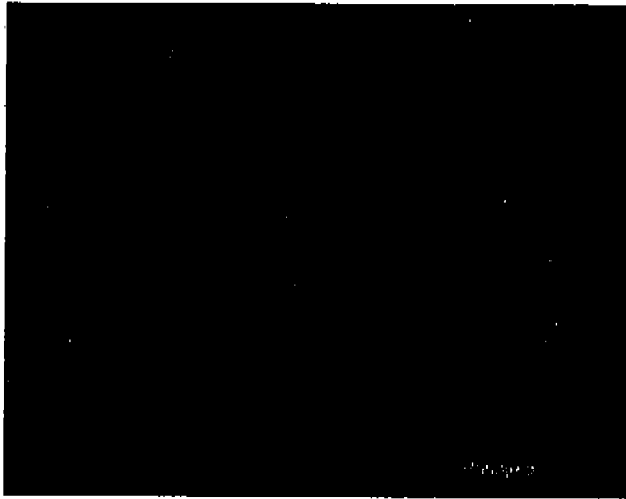


Figura 5f. Pasaje 5 de células de EPR de pollo, microfotografía con contraste de fases (20X)

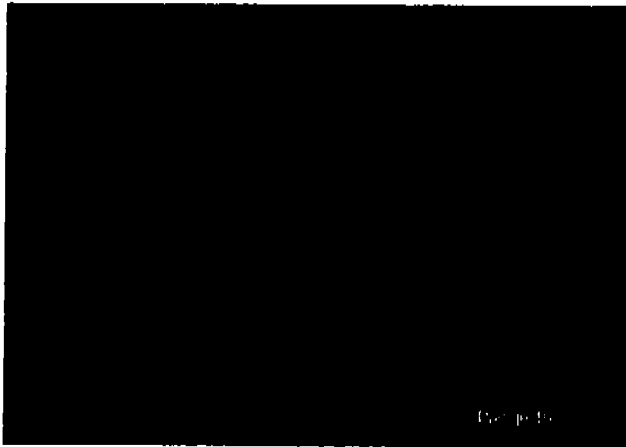


Figura 5g. Pasaje 10 de células de EPR de pollo, microfotografía con contraste de fases (20X)

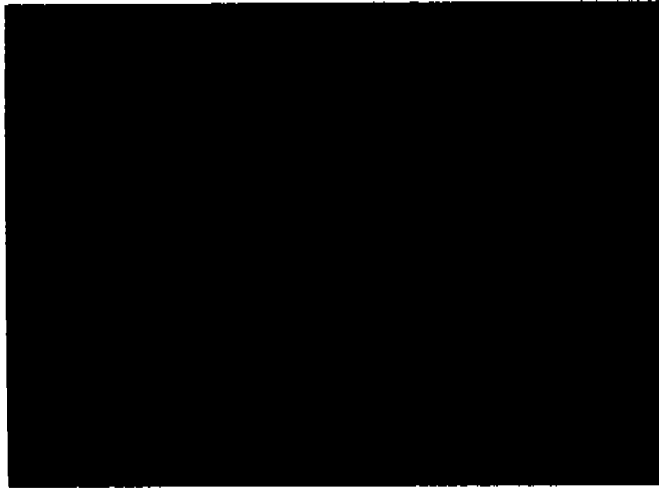


Figura 5h. Pasaje 18 de células de EPR de pollo, microfotografía con contraste de fases (20X)



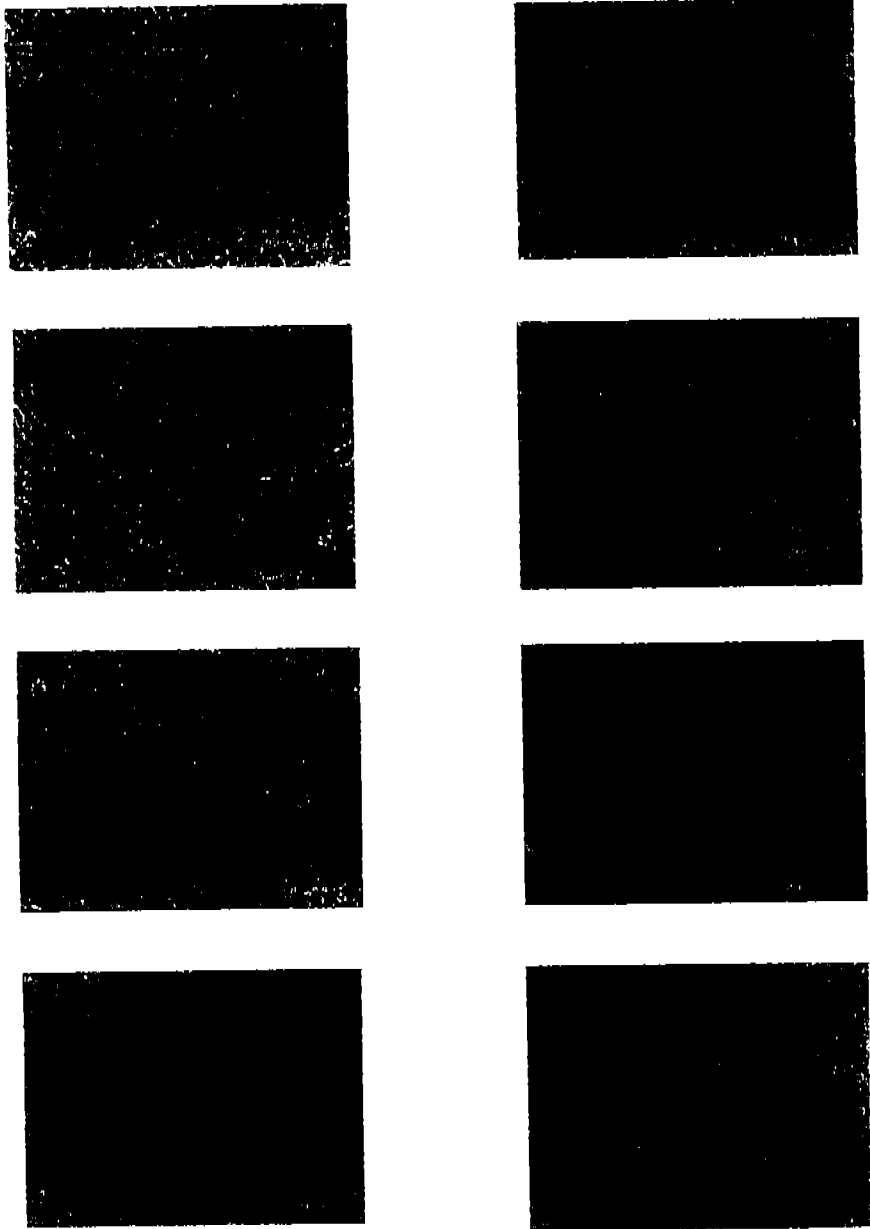


Figura 5i. Comparación de células de EPR en cultivo primario y sus pasajes sucesivos. Se observa el cambio de una morfología cuboidal en el cultivo primario a una forma aplanada y sin pigmento en los pasajes.

## Cambios en la velocidad de proliferación Inducidos por el subcultivo del EPR

El pasaje sucesivo de las células de EPR generó un aumento en la velocidad de proliferación de las mismas. Los cultivos primarios alcanzaron la confluencia en 4-6 días de incubación, mientras que en los pasajes disminuyó el tiempo requerido para alcanzar la confluencia (1-2 días), como se observa en la figura 6.

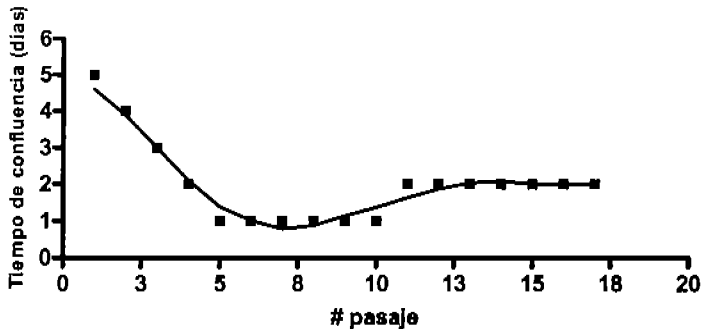


Figura 2. Velocidad de proliferación expresada por una curva de confluencia de los cultivos, desde el EPR primario hasta el pasaje 18. El cultivo primario está representado como el 0. Cada dato es el promedio de 3 cultivos independientes.

## Efecto de la congelación de las membranas sobre la unión específica de glutamato.

Durante la fase experimental se realizó ensayos a diferentes tiempos de congelación. Se cosechó cultivos primarios en confluencia (control), y las membranas se congelaron hasta la obtención de membranas de los pasajes correspondientes de las mismas células. Al observar resultados variables entre sí en las mismas condiciones se analizó si el efecto de variación podría deberse al tiempo de congelación. Se comparó los resultados de la unión específica en membranas con diferentes días de congelación y se observó un aumento progresivo en la unión específica, en relación directa con el tiempo de congelación de las mismas (Figura 7). Se definió un tiempo de congelación óptimo, ya que demostramos que este tratamiento genera a tiempos más largos, la degradación

de la proteína (aproximadamente seis meses). Lo anterior se demostró utilizando ninhidrina como indicador de la presencia de aminoácidos libres (dato no mostrado).

Dado que el tiempo de congelación de las membranas influye en la unión específica, los ensayos posteriores se hicieron con membranas congeladas por 3-6 días.

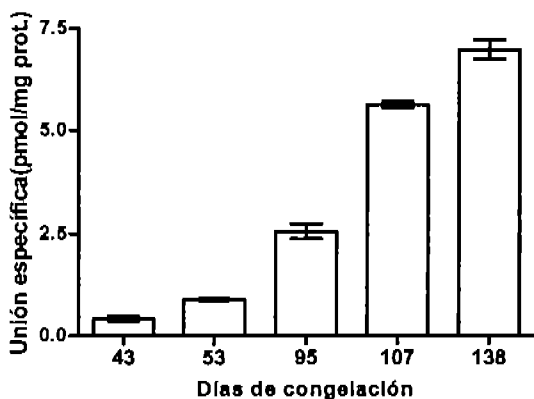


Figura 7. Efecto de la congelación sobre la unión específica de  $^3\text{H}$ -Glu en células de EPR de cultivos primarios. Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  ES de dos experimentos realizados por triplicado.

### **Cambios en la unión específica de glutamato inducidos por el subcultivo**

Se realizó ensayos de unión de radioligando en membranas de células procedentes de pasajes sucesivos, y se comparó la unión específica de  $^3\text{H}$ -Glu con la obtenida en cultivos primarios. Los resultados de la unión de glutamato a sus receptores en el EPR demuestran que la unión específica aumenta con los pasajes sucesivos. Se usaron las membranas de células procedentes del pasaje 5 para comparar con el primario, debido a que en éstos se identificó el aumento más significativo ( $p=0.01$ ). Esto indica que hay una alteración progresiva en los

receptores de glutamato durante la transformación fibroblástica del EPR (Fig 8) observada en el análisis morfológico (Fig 5a Vs. 5h).

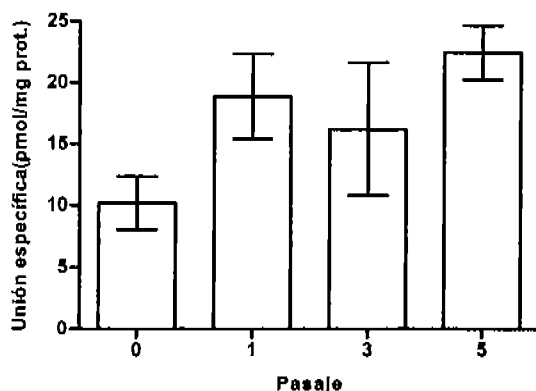


Figura 8. Aumento en la unión específica de  $^3\text{H-Glu}$  en pasajes sucesivos. Las membranas se utilizaron a los 3 – 6 días de congelación. Los resultados son el promedio  $\pm$  ES de al menos tres ensayos independientes por triplicado.

### Comparación de la unión específica de glutamato en cultivo primario y pasaje 5.

Se midió la unión de radioligando a membranas de células de EPR en cultivo primario y al quinto pasaje, ya que se identificó una diferencia significativa que se mantiene desde ese pasaje. Como se observa en la figura 9 hay un aumento significativo ( $p=0.01$ ) en la unión específica de glutamato en el pasaje 5 en relación con el EPR primario.

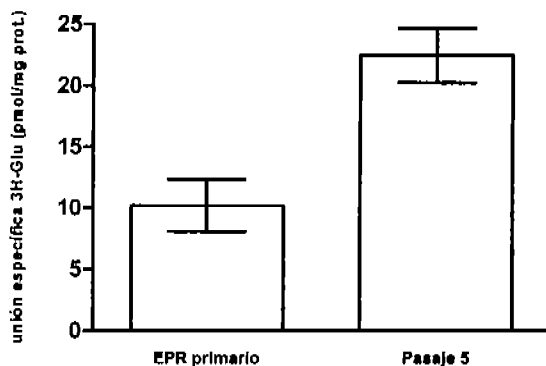


Figura 9. Comparación de la unión específica en EPR primario y en pasaje 5. Las membranas se utilizaron a los 3 – 6 días de congelación. Cada dato es el promedio de 3 cultivos independientes.

#### Curva de saturación de la unión específica de glutamato en el EPR.

Se realizó el ensayo de unión de radioligando a membranas de EPR primario y de pasaje 5 con diferentes concentraciones de  $^3\text{H}$ -glu (de 50 nM a 2  $\mu\text{M}$ ) para analizar la cinética de unión de  $^3\text{H}$ -Glu tanto en membranas de cultivo primario como de pasaje 5 para determinar si el incremento en la unión en los pasajes se debe a un cambio en la afinidad ( $K_b$ ) o en el número de los receptores ( $B_{\text{max}}$ ; fig. 10 y 11, tabla 1).

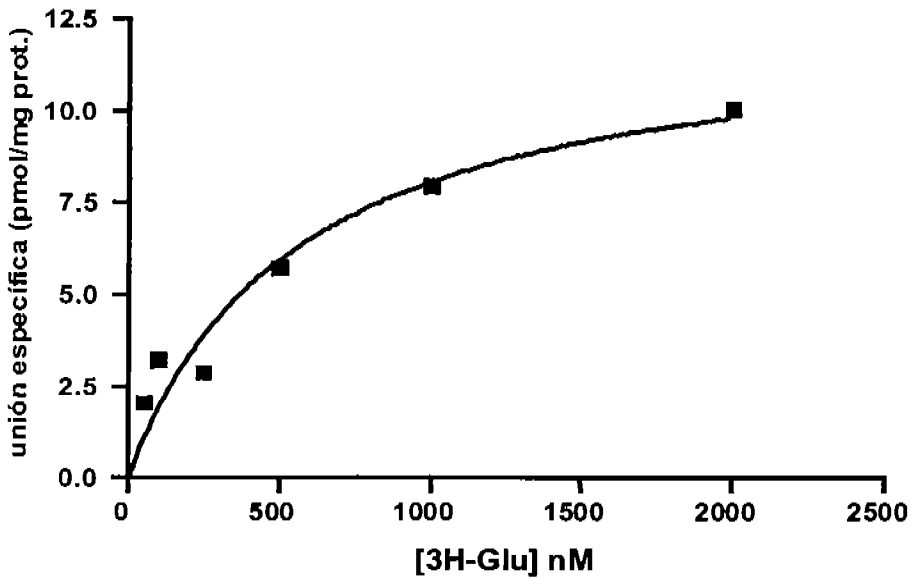
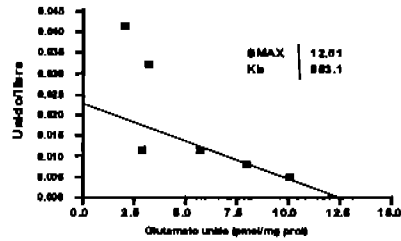


Figura 10. Curva de saturación y análisis de Scatchard de la unión específica de  $^3\text{H-Glu}$ . Se midió la unión específica de glu a membranas de EPR primario de pollo. Las membranas se utilizaron a los 3 – 6 días de congelación. Se usaron concentraciones crecientes de glu, entre 50 y 2000 nM. Los datos son el promedio de tres ensayos realizados por triplicado.

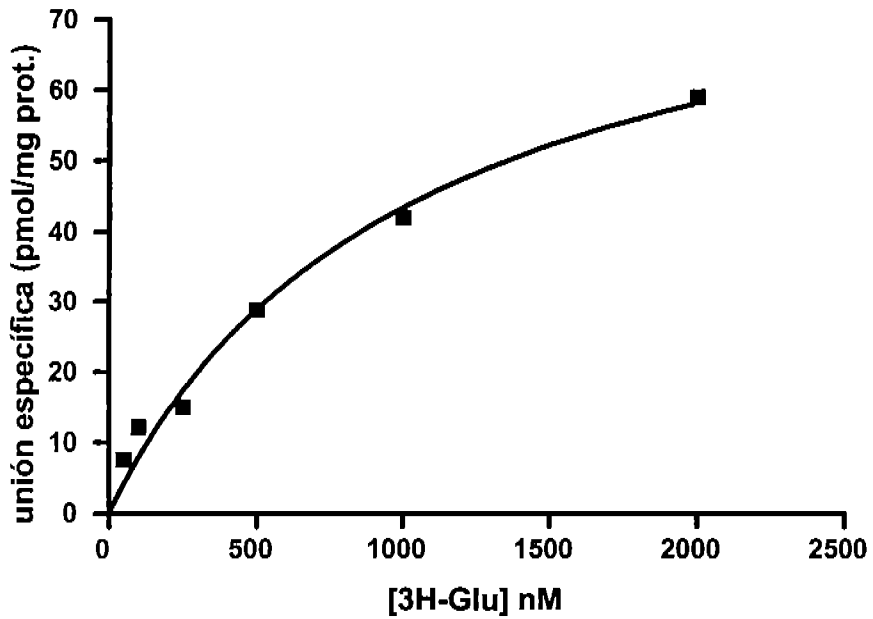
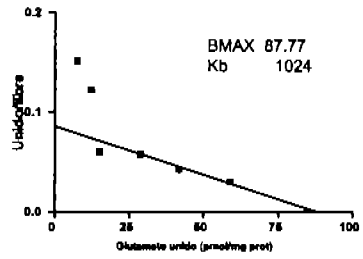


Figura 11. Curva de saturación y análisis de Scatchard de  $^3\text{H-Glu}$ . Se midió la unión específica a membranas de pasaje 5 de EPR de pollo. Los datos son el promedio de 3 ensayos independientes realizados por triplicado.

Como se observa en las figuras 10 y 11, en el pasaje 5, la  $B_{max}$  aumenta significativamente, es decir, hay muchos más sitios de unión en las células desdiferenciadas; mientras que la  $K_b$  aumenta casi el doble, lo que demuestra que disminuye la afinidad aparente de los receptores casi la mitad. Esto se observa en la tabla I.

Tabla I. Constantes cinéticas de la unión de  $^3\text{H-Glu}$  a membranas de cultivo de EPR

Membranas	$B_{max}$ (pmol/mg prot.)	$K_b$ (nM)
EPR primario	12.51	553.1
Pasaje 5	87.77	1024

En la tabla I se comparan las uniones específicas de  $^3\text{H-Glu}$  en membranas provenientes de un cultivo primario y de membranas que provienen de células desdiferenciadas (paseje 5). Las membranas se utilizaron a los 3 – 6 días de congelación. Los datos son el promedio de 3 ensayos independientes.



## Discusión y conclusión

Estudios previos en células de epitelio pigmentado de la retina humano en cultivo han demostrado que después de seis pasajes sucesivos, las células pierden su morfología poligonal y adquieren una morfología fibroblástica, además de perder la melanina (López-Colomé, et al.,1994). Con el fin de identificar los posibles cambios que sufren los receptores de glutamato (GluRs) durante el proceso de transformación fibroblástica del EPR, característica de la vitreorretinopatía proliferativa (VRP), en este trabajo se estableció un modelo *in vitro* de transformación fibroblástica de las células del EPR en el que se reproducen en cultivo los cambios morfológicos identificados en la VRP humana.

Los cambios identificados consisten en la desdiferenciación, el incremento de la proliferación y la pérdida de la melanina. Se observó que, en cultivo, las células del EPR de pollo en pasajes consecutivos, sufren cambios morfológicos, en paralelo con una alteración de las características cinéticas de los receptores de glutamato. Las alteraciones son: en un aumento en el número de sitios receptores con menor afinidad, con respecto a las células con morfología epitelial normal de un cultivo primario.

La barrera hematorretiniana regula los gradientes iónicos y metabólicos que se requieren para la función normal de la retina (Rajasekaran, et al., 2003). El aumento de la permeabilidad de esta barrera es una complicación temprana en la mayoría de enfermedades de la retina, y podría contribuir al desarrollo de la VRP (Rajasekaran, et al.,2003). Para prevenir tal enfermedad sería necesario conocer los factores que la inducen. En este trabajo se investigó el papel del glutamato como posible factor que interviene en la desdiferenciación y/o proliferación de las células del EPR durante la VRP, proceso caracterizado por la ruptura de la barrera hematoocular (Nagasaki et. al.,1998) seguida por un cambio de las células del EPR de una forma poligonal y mitóticamente inactiva a una forma aplanada migratoria con pérdida de características epiteliales (Ando et. al.,2000). Las células de EPR transformadas, además de células gliales, fibroblastos y células inflamatorias (Vinores et. al.,1990) migran hacia la cavidad vítrea y

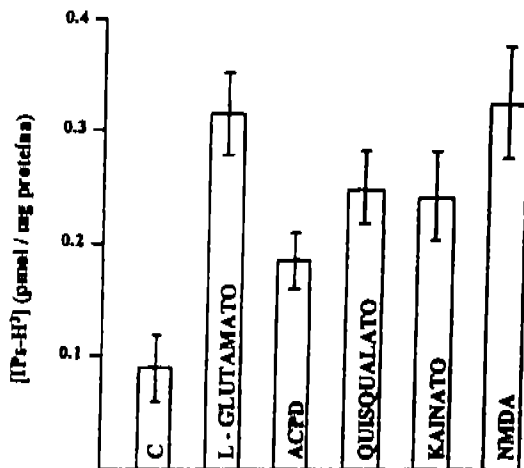
proliferan extensamente (Ando et. al.,2000), hasta formar membranas colágeno-celulares. La membrana formada ejerce fuerza contráctil que lleva al desprendimiento de la retina. Se cree que tal proceso se origina por la entrada de componentes del suero a la retina, acelerando la migración y proliferación de las células del EPR, las cuales secretan factores de crecimiento y citocinas como el FGF, PDGF, TGF- $\beta$ , interleucinas IL-1, IL-6, TNF alfa, y factor estimulante de colonias de macrófagos e Integrinas (Campochiaro et. al., 1984). La VRP, representa el fracaso de aproximadamente 30 % de las cirugías que tienen como objetivo corregir o prevenir los desprendimientos de retina regmatógenos (Pastor, et al., 2002). Existe también la VRP primaria, definida como aquella que se desarrolla en pacientes no expuestos a alguna intervención quirúrgica por desprendimiento de retina (Pastor, et al., 2002). La prevención de la VRP como consecuencia de estos estados patológicos sería de gran importancia clínica.

La interrupción de la barrera hematorretiniana representa un riesgo para el desarrollo de la VRP, pues se sabe que durante esta enfermedad hay entrada de macrófagos y leucocitos sanguíneos y compuestos del suero a la retina por la interrupción misma (Campochiaro et al.,1986). En el humor vítreo o en membranas epirretinales de pacientes con VRP se han detectado altos niveles de factores de crecimiento, principalmente del TGF- $\beta$  (Connor et al.,1989), y del PDGF (Robbins et al.,1994). Se ha demostrado que el PDGF es un potente estimulador tanto de la proliferación y en la inducción de la migración (Campochiaro et al.,1993 y 1994), así como uno de los factores cruciales para la dediferenciación de las células de EPR, cuya alteración morfológica se acompaña de una disminución en la expresión de citoqueratina y una nueva expresión de fibras de actina, cuya contracción conduce al desprendimiento de la retina (Ando et al, 2000). Por su parte, el TGF- $\beta$  aumenta la proliferación de las células de EPR transformadas durante la VRP (Lee et al., 2001). El TGF- $\beta$  transduce señales a través de dos rutas diferentes, las Smad y las cinasas de proteína activadas por mitógeno (MAPK), a través de cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK; Derynck y Zhang, 2003). Sin embargo, se ha demostrado que la cascada de señalamiento

de las MAPKs se activa en forma independiente de las Smads (Yue y Mulder,2000).

Por otro lado, los cambios observados en la cinética de unión del glutamato ( $K_b$  y  $B_{max}$ ) en membranas de un cultivo primario y en un cultivo de pasaje 5 de EPR (figs. 10 y 11) posiblemente se relacionen con la composición de las subunidades de los receptores de glutamato de tipo NMDA, ya que se sabe que las propiedades funcionales del receptor, la afinidad aparente por los agonistas y la sensibilidad a los agonistas competitivos, así como el bloqueo por magnesio se determinan por la composición de las subunidades, principalmente por las variantes de NR2 (Liu y Zhang, 2000), que es la subunidad a la que se une el glutamato (Cull-Candy, et al., 2001). Los receptores de NMDA que tienen las subunidades NR2A o NR2B son más sensibles al bloqueo por magnesio que los que contienen NR2C o NR2D (Liu y Zhang, 2000). Esto a su vez podría relacionarse con la activación de rutas intracelulares a través de las cuales se activan factores de transcripción y eso lleve, o bien al cambio en la expresión de las subunidades de los receptores de NMDA, o bien a un aumento en la proliferación y/o a la desdiferenciación, pues estos últimos eventos se han estudiado en células de EPR en membranas de pacientes con VRP y se ha demostrado que TGF- $\beta$  (Yue y Mulder, 2000) y el PDGF (Hinton et al.,1998) activan la ruta de las MAP cinasas. La ruta de las MAP cinasas constituyen la ruta principal mediante la cual se lleva a cabo el control de la diferenciación celular, la proliferación, y la muerte celular (Pearson, et al., 2001). Se sabe que el glutamato también activa esta ruta, activando a ERK mediante la entrada de calcio en la que interviene el receptor de NMDA, esto se ha observado en estudios de plasticidad sináptica en el hipocampo (Thomas and Huganir, 2004. López-Colomé y Ortega (1997), demostraron que en células gliales la activación de receptores de glutamato se vincula con la activación de la cascada de las MAP cinasas. Además de la activación de la ruta de las MAP cinasas inducida por la activación de receptores de glutamato se tiene la evidencia de que estos receptores activane otras rutas, como la de los fosfolinosítidos, estudiada en células de EPR (Fragoso

y López-Colomé, 1999), y cuya acumulación se estimula principalmente con glutamato y con NMDA (gráfica de abajo).



En esta gráfica (tomada de López-Colomé y Ortega, 1997) se muestra la acumulación de Ips-[H<sup>3</sup>] por agonistas del Glu. Los valores son la media + E.S.M. de 5 experimentos independientes por triplicado. C=control.

Hecquet, et. al, (2002) demostraron que la vía Ras/Raf/MEK/ERK, juega un papel clave en el control de la proliferación del EPR humano. Dado que las vías intracelulares de señalamiento del Glu y el TGF- $\beta$  concurren al nivel de las MAPK cinasas, podría existir un efecto sinérgico de ambos en la pérdida del estado diferenciado y/o el incremento de la proliferación de las células del EPR. Por todo lo anterior, es interesante mostrar esquemáticamente estas rutas intracelulares como propuesta para un estudio a futuro.

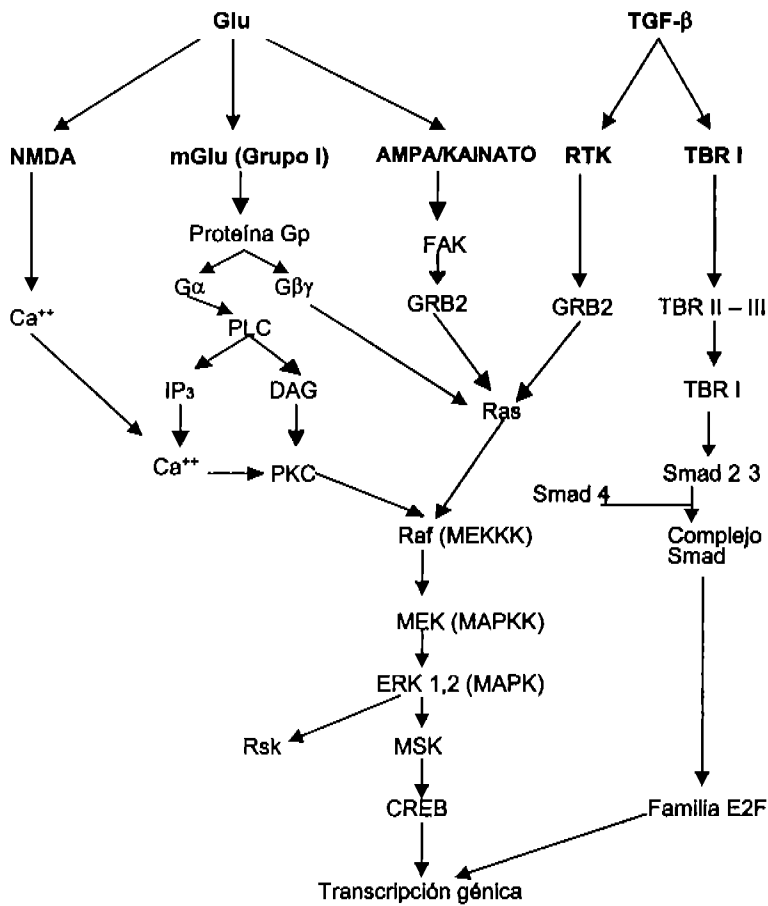


Figura 13. Esquema de las rutas intracelulares activadas por Glu y TGF-β que muestra la convergencia en las MAPKs.

Otra de las características de las células del EPR durante la desdiferenciación es la pérdida del pigmento (Abe et al.,1998). En la secuencia de fotos de la figura 5 se observa tanto cambio morfológico como pérdida del pigmento, además de aceleración de la proliferación (fig. 6). Esto resulta importante debido al papel de la melanina en las células de EPR cuya capacidad protectora contra la luz y otros agentes se resume en los siguientes puntos: 1) actúa como un filtro de densidad neutral, 2) atenúa el efecto de la radiación por la dispersión de la luz cuando se sitúa en el melanosoma, 3) absorbe la energía radiante en el espectro visible y UV y disipa la energía absorbida como calor, 4) tiene la capacidad de unirse a muchos fármacos y 5) utiliza la energía absorbida para sufrir oxidación inmediata (Boulton, 1998). Aunque el papel de la melanina como antioxidante es mínimo, es importante puesto que el glutamato representa una fuente de estrés oxidativo (Gupta et. al,2003; Gilgun-Sherki et. al,2001). Esto es importante, ya que cada característica reproducible *in vitro* le da más valor a nuestro modelo de VRP al hacerlo más comparable con las características observadas en pacientes con vitreoretinopatía proliferativa. Además de que el uso de este modelo desarrollado será útil para prevenir a futuro esta enfermedad.

El glutamato en la retina, deriva predominantemente de la glutamina producida en las células de Müller, sin embargo, el EPR mantiene una concentración de 2 a 10 mM de glutamina cuya liberación podría ser una fuente de glutamato (Marc, 2004) para la estimulación del desprendimiento de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores y la subsecuente fagocitosis de los mismos por el EPR, proceso que se lleva a cabo a concentraciones milimolares de glutamato (Greenberger y Besharse, 1985). Sin embargo, se ha demostrado que el glutamato liberado de la retina en altas concentraciones induce la muerte neuronal acompañada de la degeneración de la misma por excitotoxicidad (Olney, et al.,1986; Romano, et al.,1998).

La formación de la barrera hematorretiniana por el EPR depende de la función de las uniones estrechas y de las uniones adherentes para crear una barrera de difusión restringida y mantener la integridad del tejido y la morfología normal de las

células del EPR (Bailey et al., 2004). Se sabe que el estrés oxidativo y el incremento en la permeabilidad vascular son críticos para la patogénesis de la interrupción de la barrera hematorretiniana que se observa en retinopatías como la retinopatía diabética (Grammas y Riden, 2003). En nuestro modelo de VRP, el glutamato podría intervenir en la permeabilidad de la barrera hematorretiniana, ya que se observa un cambio en la morfología de las células de EPR en cultivo cuando se llevan a cabo pasajes sucesivos, lo cual podría indicar que las uniones entre las células se alteran, pues como se observa en la fig. 5 las células se ven menos unidas entre sí en los pasajes que cuando se tiene un cultivo primario, además de haber un aumento en los sitios receptores (figs. 10 y 11). Lo anterior se podría apoyar con los estudios previos hechos en EPR humano, en donde también se observa una transformación fibroblástica después de seis pasajes sucesivos (López-Colomé, et al., 1994)

Se sabe que las células endoteliales de la retina, cuya función es similar a las células endoteliales en el cerebro, se encuentran especialmente en riesgo por daño oxidativo (Grammas y Riden, 2003). En el ojo, el EPR separa la retina neural de los coriocapilares y sirve como el homólogo del epitelio del plexo coroideo en la barrera hematoencefálica (Chang, et al., 1997a).

En condiciones en las hay desprendimiento de la retina, se produce hipoxia e hipoglicemia, lo cual se asocia con la muerte programada de los fotorreceptores (La Heij, et al., 2002). Esos receptores dañados conducen a una acumulación de glutamato en las células de Müller y a la disminución de la actividad de la glutamina sintetasa (La Heij, et al., 2002). Aunado a esto, elementos como el glutamato, citoquinas y factores de crecimiento contenidos en el suero proveniente de la sangre podrían ser responsables del desarrollo de la VRP promoviendo la proliferación y disfunción en la permeabilidad de la barrera formada por las células del EPR (Campochiaro et al., 1984). Chang et al. (1997b) demostraron que el suero induce la interrupción de las uniones estrechas y que ese efecto involucra la expresión reducida de la proteína zónula ocludens-1 (ZO-1) que juega un papel importante en la permeabilidad de la barrera formada por las células del EPR (Jin, 2002). Por otro lado, se ha visto que el estrés inducido con glutamato incrementa

la permeabilidad en la barrera hematoencefálica por su acción excitotóxica (Skultetyová, et al.,1998). Este efecto se ha observado también con agonistas de glutamato, tanto con NMDA, que tiene un efecto más rápido, como con kainato, y se ha demostrado que la pérdida de la proteína ZO-1 en las uniones estrechas y la ocludina se asocian con la interrupción de la barrera hematoencefálica (Bolton y Perry,1998). Asimismo, se ha visto que la permeabilidad de la barrera hematoencefálica aumenta a través de receptores metabotrópicos de glutamato en la corteza cerebral (Liu et al., 2004).

Dado que el glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central de vertebrados (Michaelis, 1998), tanto el cerebro como la retina están expuestos a aminoácidos excitadores como el glutamato, cuyo metabolismo produce especies de oxígeno reactivas, principalmente a través de la activación de sus receptores de tipo ionotrópico, siendo el glutamato una fuente de estrés oxidativo (Gupta et al.,2003; Gilgun-Sherki et al., 2001). En la retina de pollo se ha demostrado la liberación de glutamato y aspartato (López-Colomé y Samohano, 1984), así como en el EPR (López-Colomé et al., 1993b), por lo que nuestro modelo de VRP y el papel de este aminoácido tiene antecedentes bien fundamentados.

Dado que la interrupción de la barrera hematorretiniana es un pre-requisito para el desarrollo de la vitreoretinopatía proliferativa; que el estrés oxidativo aumenta la permeabilidad de la barrera, y que el glutamato es una fuente de estrés oxidativo, además de que éste se libera en la retina neural por ser el principal neurotransmisor en la vía vertical de la misma a través de sus diferentes tipos de receptores (López-Colomé,1986; Massey y Miller, 1990), podemos decir que el papel que juega este aminoácido durante la VRP es en la interrupción de la barrera hematorretiniana a través del incremento en la permeabilidad de la misma. Esto sería lógico puesto que casi todos los factores de riesgo para la VRP se asocian con la migración de las células del EPR a la cavidad vítrea y la interrupción de la barrera hemato-ocular (Nagasaki et al.,1998). Lo anterior sería válido si tomamos en cuenta la similitud, tanto en morfología como en función de las barreras hematorretiniana y hematoencefálica (Chang, et al., 1997a), ya que se



ha tomado a la primera como un modelo de estudio *in vitro* de la barrera hemato-encefálica (Steuer, et al., 2004).

Para prevenir las alteraciones que se llevan a cabo en la vitreorretinopatía proliferativa sería importante identificar los factores que la causan, entre los cuales el glutamato es un buen candidato para su estudio en este modelo, dada la importancia que este aminoácido constituye para la transmisión y funcionamiento de la relación retina-EPR, antes descritos. Por lo que, este trabajo da la pauta para continuar investigando el papel del glutamato en las células del EPR, que a su vez nos daría información que podría ser relevante para el tratamiento de retinopatías en las que el EPR está involucrado de manera importante, tal como la VRP. Asimismo, es importante caracterizar las vías de señalamiento intracelular activadas por el glutamato y su posible modificación en condiciones que reproducen *in vitro* los cambios observados en la vitreorretinopatía proliferativa humana.

### Referencias

Abe T, Durlu YK, Tamai M. 1996. The properties of retinal pigment epithelial cells in proliferative vitreoretinopathy compared with cultured retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 63:201-210.

Abe T, Sato M, Tamai M. 1998. Dedifferentiation of the retinal pigment epithelium compared to the proliferative membranes of proliferative vitreoretinopathy. *Curr Eye Res* 17:1103-1109.

Aguirre, G.D., Ray, J., Stramm, L.E. 1998. Diseases of the retinal pigment epithelium. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor, M.F. y Wolfensberger, T.J. Pags. 260-306.

Aguirre, G., Stramm, L., p. O'Brien. 1985. Disease of the photoreceptor cell-pigment epithelial complex: influence of spatial, pigmentation and renewal factors. En *Retinal Degeneration. Experimental and Clinical Studies*. Eds.: La Vail, M.M., J.G. Hollyfield, R.E. Anderson. Pags. 401-420.

Alge CS, Suppmann S, Priglinger SG, Neubauer AS, May CA, Hauck S, Welge-Lussen U, Ueffling M, Kampik A. 2003. Comparative proteome analysis of native differentiated and cultured dedifferentiated human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:3629-3641.

Anderson DH, Guerlin CJ, Hageman GS, Pfeffer BA, Flanders KC. 1995. Distribution of transforming growth factor-beta isoforms in the mammalian retina. *J Neurosci Res* 42:63-79.

Ando A, Ueda M, Uyama M, Masu Y, Ito S. 2000. Enhancement of dedifferentiation and myoid differentiation of retinal pigment epithelial cells by platelet derived growth factor. *Br J Ophthalmol* 84:1306-1311.

Bailey TA, Kanuga N, Romero IA, Greenwood J, Luthert PJ, Cheetham ME. 2004. Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:675-684.

Ban Y, Rizzolo LJ. 2000. Differential regulation of tight junction permeability during development of the retinal pigment epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C744-750.

Berridge MJ. 1987. Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 56:159-193.

Besharse, J.C. y DeFoe, D.M. 1998. Role of the retinal pigment epithelium in photoreceptor membrane turnover. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor, M.F. y Wolfensberger, T.J. Pags. 152-172.

Betsholtz C, Karlsson L, Lindahl P. 2001. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays* 23:494-507.

Bird, A.C. 1987. Clinical investigation of retinitis pigmentosa. En *Degenerative Retinal Disorders: Clinical and Laboratory Investigations*. Eds.: Hollyfield, J.G., Anderson, R.E., LaVall, M.M.. Pags. 3-20.

Bolton SJ, Perry VH. 1998. Differential blood-brain barrier breakdown and leucocyte recruitment following excitotoxic lesions in juvenile and adult rats. *Exp Neurol* 154:231-240.

Boulton, M. 1998. Melanin and the Retinal Pigment Epithellum. En *The Retinal Pigment Epithellium*. Eds.: Marmor, M.F. y Wolfensberger, T.J. Pags. 68-85.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.

Campochiaro PA, Glaser BM. 1985. Endothelial cells release a chemoattractant for retinal pigment epithelial cells in vitro. *Arch Ophthalmol*. 103(12):1876-80.

Campochiaro PA, Bryan JA 3rd, Conway BP, Jaccoma EH. 1986. Intravitreal chemotactic and mitogenic activity. Implication of blood-retinal barrier breakdown. *Arch Ophthalmol*. 104(11):1685-7.

Campochiaro PA, Hackett SF. 1993. Corneal endothelial cell matrix promotes expression of differentiated features of retinal pigmented epithelial cells: implication of laminin and basic fibroblast growth factor as active components. *Exp Eye Res* 57:539-547.

Campochiaro PA, Hackett SF, Vinocres SA, Freund J, Csaky C, LaRochelle W, Henderer J, Johnson M, Rodriguez IR, Friedman Z, et al. 1994. Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Sci* 107 ( Pt 9):2459-2469.

Campochiaro P A. 1998. Growth factors in the retinal pigment epithelium and retina. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor, M.F. y Wolfensberger, T.J. Pags. 459-477.

Casaroil-Marano RP, Pagan R, Vllaro S. 1999. Epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy: intermediate filament protein expression in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2062-2072.

Chang CW, Ye L, Defoe DM, Caldwell RB. 1997a. Serum inhibits tight junction formation in cultured pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1082-1093.

Chang C, Wang X, Caldwell RB. 1997b. Serum opens tight junctions and reduces ZO-1 protein in retinal epithelial cells. *J Neurochem* 69:859-867.

Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. 2004. What is transforming growth factor-beta (TGF-beta)? *Br J Plast Surg* 57:215-221.

Clarck, V.M., 1986. The cell biology of the retinal pigment epithelium. En *The retina. A model for cell biology studies. Parte II*. Ed: R. Adler y D. Farber. Pags. 129 -168.

Clark VM, Hall MO. 1986. RPE cell surface proteins in normal and dystrophic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27:136-144.

Chader, G.J, Pepperberg, D.R., Crouch, R., Wiggert, B. 1998. Retinoids and the retinal pigment epithelium. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor, M.F. y Wolfensberger, T.J. Pags. 135-151.

Conn PJ, Plin JP. 1997. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205-237.

Connor TB Jr, Roberts AB, Sporn MB, Danelpour D, Dart LL, Michels RG, de Bustros S, Enger C, Kato H, Lansing M, et al. 1989. Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye. *J Clin Invest.* 83(5):1661-6.

Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577-584.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews* 51(1):7-63.

Dowling JE. 1970. Organization of vertebrate retinas. *Invest Ophthalmol* 9:655-680.

Ershov AV, Bazan NG. 2000. Photoreceptor phagocytosis selectively activates PPARgamma expression in retinal pigment epithelial cells. *J Neurosci Res* 60:328-337.

Fagni L, Ango F, Perroy J, Bockaert J. 2004. Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol* 15:289-298.

Fragoso G, Lopez-Colome AM. 1999. Excitatory amino acid-induced inositol phosphate formation in cultured retinal pigment epithelium. *Vis Neurosci* 16:263-269.

Fricke U. 1975. Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100. *Anal Biochem* 63:555-558.

Gabrielian K, Wang HM, Ogden TE, Ryan SJ. 1992. In vitro stimulation of retinal pigment epithelium proliferation by taurine. *Curr Eye Res* 11:481-487.

Gadea A, Lopez-Colome AM. 2001. Glial transporters for glutamate, glycine, and GABA III. Glycine transporters. *J Neurosci Res* 64:218-222.

Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. 2001. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 40:959-975.

Grammas P, Riden M. 2003. Retinal endothelial cells are more susceptible to oxidative stress and increased permeability than brain-derived endothelial cells. *Microvasc Res*. 2003 Jan;65(1):18-23.

Greenberger LM, Besharse JC. 1985. Stimulation of photoreceptor disc shedding and pigment epithelial phagocytosis by glutamate, aspartate, and other amino acids. *J Comp Neurol* 239:361-372.

Grierson I, Heathcote L, Hiscott P, Hogg P, Briggs M, Hagan S. 2000. Hepatocyte growth factor/scatter factor in the eye. *Prog Retin Eye Res* 19:779-802.

Grisanti S, Guidry C. 1995. Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(2):391-405.

Gupta YK, Gupta M, Kohli K. 2003. Neuroprotective role of melatonin in oxidative stress vulnerable brain. *Indian J Physiol Pharmacol* 47:373-386.

He PM, He S, Garner JA, Ryan SJ, Hinton DR. 1998. Retinal pigment epithelial cells secrete and respond to hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 249:253-257.

Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, Engelmann K, Mascarelli F. 2002. Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelial cells: ERK and RPE cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3091-3098.

Heth CA, Marescalchi PA, Ye L. 1995. IP3 generation increases rod outer segment phagocytosis by cultured Royal College of Surgeons retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(6):984-9.

Hoch RV, Soriano P. 2003. Roles of PDGF in animal development. *Development* 130:4769-4784.

Hinton DR, He S., et al. 1998. Mitogen-Activated Protein Kinase mediates PDGF-directed migration of RPE cells. *Exp Cell Res* 239: 11-15.

Hosoya K, Saeki S, Terasaki T. 2001. Activation of carrier-mediated transport of L-cysteine at the blood-brain and blood-retinal barriers in vivo. *Microvasc Res* 62:136-142.

Hughes, B.A., Gallemore, R.P., Miller, S.S. 1998. Transport mechanism in the retinal pigment epithelium. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor, M.F. y Wolfensberger, T.J. Pags. 103-134.

Jin M, He S, Worpel V, Ryan SJ, Hinton DR. 2000. Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF-alpha. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:4324-4332.

Jin M, Barron E, He S, Ryan SJ, Hinton DR. 2002. Regulation of RPE intercellular junction integrity and function by hepatocyte growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2782-2790.

Kandel, ER, Schwartz JH y Jessell TM. 2000. Principles of neural science, 4a ed. McGraw-Hill, New York. pp 1414.

Kaven CW, Spraul CW, Zavazava NK, Lang GK, Lang GE. 2000. Growth factor combinations modulate human retinal pigment epithelial cell proliferation. *Curr Eye Res* 20:480-487.

Kimelberg HK, Kettenmann H. 1990. Swelling-induced changes in electrophysiological properties of cultured astrocytes and oligodendrocytes. I. Effects on membrane potentials, input impedance and cell-cell coupling. *Brain Res* 529:255-261.

Kimelberg HK, Nestor NB, Feustel PJ. 2004. Inhibition of release of taurine and excitatory amino acids in ischemia and neuroprotection. *Neurochem Res* 29:267-274.

Kimoto K, Nakatsuka K, Matsuo N, Yoshioka H. 2004. p38 MAPK mediates the expression of type I collagen induced by TGF-beta 2 in human retinal pigment epithelial cells ARPE-19. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2431-2437.

La Heij EC, van de Waarenburg MP, Blaauwgeers HG, et al. 2002. Basic fibroblast growth factor, glutamine synthetase, and interleukin-6 in vitreous fluid from eyes

with retinal detachment complicated by proliferative vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol.* 134(3):367-75.

LaRochelle WJ, Jeffers M, McDonald WF, Chillakuru RA, Glese NA, Lokker NA, Sullivan C, Boldog FL, Yang M, Vernet C, Burgess CE, Fernandes E, Deegler LL, Rittman B, Shmkets J, Shmkets RA, Rothberg JM, Lichenstein HS. 2001. PDGF-D, a new protease-activated growth factor. *Nat Cell Biol* 3:517-521.

Lee SC, Kim SH, Koh HJ, Kwon OW. 2001. TGF-betas synthesized by RPE cells have autocrine activity on mesenchymal transformation and cell proliferation. *Yonsei Med J* 42:271-277.

Li X, Eriksson U. 2003. Novel PDGF family members: PDGF-C and PDGF-D. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:91-98.

Limb GA, Little BC, Meager A, et al. 1991. Cytokines in proliferative vitreoretinopathy. *Eye.* 5 (6):686-93.

Liu X, Chi OZ, Weiss HR. 2004. Effects of metabotropic glutamate receptor stimulation on blood-brain barrier permeability during focal cerebral ischemia. *Neurochem Res* 29:1857-1862.

Liu Y, Zhang J. 2000. Recent development in NMDA receptors. *Chin Med J (Engl)* 113:948-956.

Liversidge, J. y Forrester, J.V. 1998. Regulation of immune responses by the retinal pigment epithelium. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor, M.F. y Wolfensberger, T.J. Pags. 511-527.

López-Colomé AM Erij D, Pasantes-Morales H. 1976. Different effects of calcium flux-blocking agents on light and potassium stimulated release of taurine from retina. *Brain Res.* 113(3):527-34.

López-Colomé AM y Samohano F. 1984. Localization of L-glutamate and L-aspartate synaptic receptors in chick retinal neurons. *Brain Res.*, 298:159-162.



López-Colomé AM. 1986. Amino acids as excitatory transmitters in the retina. En *Excitatory amino acids*. Eds. Roberts PJ, Storm-Mathisen J, y Bradford HF. McMillan Press, London. Pags. 143-157.

López-Colomé AM, Fragoso G, Salceda R. 1991. Taurine receptors in membranes from retinal pigment epithelium cells in culture. *Neuroscience* 41:791-796.

López-Colomé AM, Ortega A, Romo-de-Vivar M. 1993a. Excitatory amino acid-induced phosphoinositide hydrolysis in Muller glia. *Glia* 9:127-135.

López-Colomé AM, Salceda R, Fragoso G. 1993b. Specific interaction of glutamate with membranes from cultured retinal pigment epithelium. *J Neurosci Res* 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. *Curr Eye Res* 13:553-560.

López Colomé AM, Fragoso G. 1995. Glycine stimulation of glutamate binding to chick retinal pigment epithelium. *Neurochem Res* 20:887-894.

López-Colomé AM, Ortega A. 1997. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate in cultured radial glia. *Neurochem Res*. 22 (6):679-685.

Madden DR. 2002. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3:91-101.

Marc, RE. 2004. Retinal neurotransmitters. En *The Visual Neuroscience Vol. 1*. Eds: Chalupa, LM y Werner JS. Pags. 304-319.

Marmor, M.F.1998. Structure, function, and disease of the retinal pigment epithelium. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor, M.F. y Wolfensberger, T.J. Pags. 3-12.

Marshall J, Hussian A A, Starita C, Moore D J, Patmore A L. Aging and Bruch's membrane. En: *The Retinal Pigment Epithellum*. Eds.: Marmor, M.F. y wolfensberger, T.J. Pags. 669-692.

Massey SC, y Miller RF. 1990. N-methyl-D-aspartate receptors of ganglion cells in rabbit retina. *J Neurophysiol*. 63(1):16-30.

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

Miller NR. 1985. Neuro-Ophthalmology of orbital tumors. *Clin Neurosurg*. 32:459-73.

Mullen RJ, LaVall MM. 1976. Inherited retinal dystrophy: primary defect in pigment epithellum determined with experimental rat chimeras. *Science* 192(4241):799-801.

Nagasaki H, Shinagawa K, Mochizuki M. 1998. Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Prog Retin Eye Res* 17:77-98.

Nankai M, Klarica M, Fage D, Carter C. 1998. The pharmacology of native N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: different receptors control the release of different striatal and spinal transmitters. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 22:35-64.

Newman EA. 2004. Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia* 47:268-274.

Olney JW, Price MT, Samson L, y Labruyere J. 1986. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci Lett*. 65 (1): 65-71.

Pasantés-Morales H, Ademe RM, Quesada O. 1981. Protective effect of taurine on the light-induced disruption of isolated frog rod outer segments. *J Neurosci Res* 6:337-348.

Pasantes-Morales H, Kleithi J, Urban PF, Mandel P. 1972. The physiological role of taurine in retina: uptake and effect on electroretinogram (ERG). *Physiol Chem Phys.* 4(4):339-48.

Pastor JC, Rodríguez de la Rúa FM. 2002. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Ret Eye Res.* 21:127-144.

Pearson G, Robinson F., et al. 2001. Mitogen-Activated Protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22: 153-183.

Pellegrini-Giampietro DE, Galli A, Alesiani M, Cherici G, Moroni F. 1989. Quinoxallines interact with the glycine recognition site of NMDA receptors: studies in guinea-pig myenteric plexus and in rat cortical membranes. *Br J Pharmacol* 98:1281-1286.

Pfeffer BA, Clark VM, Flannery JG, Bok D. 1986. Membrane receptors for retinobinding protein in cultured human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27:1031-1040.

Pow DV, Sullivan R, Reye P, Hermanussen S. 2002. Localization of taurine transporters, taurine, and (3)H taurine accumulation in the rat retina, pituitary, and brain. *Glia* 37:153-168.

Rajasekaran SA, Hu J, Gopal J, Gallemore R, Ryazantsev S, Bok D, Rajasekaran AK. 2003. Na,K-ATPase inhibition alters tight junction structure and permeability in human retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C1497-1507.

Robbins SG, Mixon RN, Wilson DJ, Hart CE, Robertson JE, Westra I, Planck SR, Rosenbaum JT. 1994. Platelet-derived growth factor ligands and receptors immunolocalized in proliferative retinal diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:3649-3663.

Romano C, Chen Q, y Olney JW. 1998. The intact isolated (ex vivo) retina as a model system for the study of excitotoxicity. *Prog Ret Eye Res.* 17 (4): 465-483.

- Rosenthal R, Strauss O. 2002. Ca<sup>2+</sup>-channels in the RPE. *Adv Exp Med Biol* 514:225-235.
- Saika S, Kono-Saika S, Tanaka T, et al. 2004. Smad3 is required for dedifferentiation of retinal pigment epithelium following retinal detachment in mice. *Laboratory Investigation* 1-4.
- Sandberg, M.A., Berson, E.L., Rosner, B. 1985. Pigmentary retinal change and loss of electroretinographic function in retinitis pigmentosa over a three year interval. En *Retinal Degeneration. Experimental and Clinical Studies*. Eds.: La Vall, M.M., J.G. Hollyfield, R.E. Anderson. Pags. 109-114.
- Schlaepfer DD, Mitra SK, Ilic D. 2004. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 1692:77-102.
- Schwartz EA. 1993. L-glutamate conditionally modulates the K<sup>+</sup> current of Muller glial cells. *Neuron* 10:1141-1149.
- Skultetyova I, Tokarev D, Jezova D. 1998. Stress-induced increase in blood-brain barrier permeability in control and monosodium glutamate-treated rats. *Brain Res Bull* 45:175-178.
- Small KW y Marmor MF. 1998. Retinal heredodegenerations with retinal pigment epithelial involvement. En *The Retinal Pigment Epithelium*. Eds.: Marmor, M.F. y wolfensberger, T.J. Pags. 345-358.
- Steuer H, Jaworski A, Stoll D, Schlosshauer B. 2004. In vitro model of the outer blood-retina barrier. *Brain Res Brain Res Protoc* 13:26-36.
- Tappaz M, Almarghini K, Legay F, Remy A. 1992. Taurine biosynthesis enzyme cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) from brain: the long and tricky trail to identification. *Neurochem Res* 17:849-859.
- Thomas GM, Haganir RL. 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5:173-183.

Thompson DA, Gal A. 2003. Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Prog Retin Eye Res* 22:683-703.

Tzekov RT, Locke KG, Hood DC, Birch DG. 2003. Cone and rod ERG phototransduction parameters in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(9):3993-4000.

Uchida N, Kluchi Y, Miyamoto K, Uchida J, Tobe T, Tomita M, Shioda S, Nakai Y, Kolde R, Oguchi K. 1998. Glutamate-stimulated proliferation of rat retinal pigment epithelial cells. *Eur J Pharmacol* 343:265-273.

Van Aken EH, De Wever O, Van Hoorde L, Bruyneel E, De Laey JJ, Mareel MM. 2003. Invasion of retinal pigment epithelial cells: N-cadherin, hepatocyte growth factor, and focal adhesion kinase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:463-472.

Vinoreas SA, Campochiaro PA, McGehee R, Orman W, Hackett SF, Hjelmeland LM. 1990. Ultrastructural and immunocytochemical changes in retinal pigment epithelium, retinal glia, and fibroblasts in vitreous culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31(12):2529-45.

Vollmar W, Gloger J, Berger E, Kortenbruck G, Kohling R, Speckmann EJ, Musshoff U. 2004. RNA editing (R/G site) and flip-flop splicing of the AMPA receptor subunit GluR2 in nervous tissue of epilepsy patients. *Neurobiol Dis* 15:371-379.

Vollmer G, Layer PG, Gierer A. 1984. Reaggregation of embryonic chick retina cells: pigment epithelial cells induce a high order of stratification. *Neurosci Lett* 48:191-196.

Wachtmeister L. 1998. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res* 17:485-521.

Walshe R, Esser P, Wiedemann P, Heimann K. 1992. Proliferative retinal diseases: myofibroblasts cause chronic vitreoretinal traction. *Br J Ophthalmol* 76(9):550-2.

Wolburg H, Willbold E, Layer PG. 1991. Muller glia endfeet, a basal lamina and the polarity of retinal layers form properly in vitro only in the presence of marginal pigmented epithelium. *Cell Tissue Res* 264:437-451.

Yan RT, Wang SZ. 2000. Differential induction of gene expression by basic fibroblast growth factor and neuroD in cultured retinal pigment epithelial cells. *Vis Neurosci*. 17(2):157-64.

Young RW, Bok D. 1969. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 42:392-403.

Yue J, Mulder KM. 2000. Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway. *J Biol Chem* 275:30765-30773.

Zafra F, Aragon C, Gimenez C. 1997. Molecular biology of glycinergic neurotransmission. *Mol Neurobiol* 14:117-142.

Zafra F, Aragon C, Olivares L, Danbolt NC, Gimenez C, Storm-Mathisen J. 1995. Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neurosci* 15:3952-3969.