



Universidad de Valladolid

**Facultad de Ciencias de la Salud
Grado en Medicina**

Trabajo Fin de Grado. Curso 2016-2017

Contribución del retículo endoplasmático a la onda de calcio en epitelio pigmentario de la retina

Autora: Sara Álvarez Sánchez

Tutores: Jonathan Rojo Ruíz, Javier García-Sancho

Álvarez-Sánchez S, González-Zamora J, Rojo-Ruíz J, García-Cubillas MD,
Alonso-Alonso MT, García-Sancho J.

Índice

I.	Resumen	2
II.	Introducción	3
III.	Material y métodos	7
IV.	Resultados	10
V.	Discusión	19
VI.	Conclusiones	21
VII.	Póster	22
VIII.	Bibliografía	23

Resumen

Las células del epitelio pigmentario tienen una función clave como reguladoras de la homeostasis retiniana y constitución de la barrera hemato-retiniana. Se ha descrito previamente en la literatura que estas células presentan ondas de calcio intracelulares implicadas en los procesos fisiológicos retinianos. Aunque se supone que en la génesis y extensión de la onda de calcio están implicados tanto factores intracelulares como paracrinos, los datos existentes en la literatura no son concluyentes. Por otro lado, la supuesta participación de los depósitos de calcio intracelulares (retículo endoplasmático) en la extensión de la onda se ha estudiado sólo de modo indirecto, por lo que, para esclarecer los mecanismos implicados en el origen y propagación de la onda de calcio, se elaboró este trabajo en el que se realizaron mediciones de calcio directas y simultáneas en citosol y en retículo endoplasmático mediante los sensores fluorescentes de calcio Fura-2 y erGAP3.

Se transfectó la línea ARPE-19 para conseguir un clon estable cuya característica fuera la expresión en retículo endoplasmático de la sonda de calcio fluorescente erGAP3. Se llevaron a cabo los experimentos en un microscopio de epifluorescencia con el cultivo de las células en monocapa, con estimulación mecánica. Para demostrar la implicación de los distintos receptores y canales celulares se utilizaron diversos fármacos y condiciones.

Los resultados obtenidos parecen indicar que el inicio de la onda de calcio se produce a través de la liberación de ATP desencadenada por la estimulación mecánica, por lo que, con la inhibición de los receptores purinérgicos con suramina y la degradación de ATP por la apirasa, se obtiene una disminución de intensidad de la onda y de su propagación. La implicación de las conexinas se estudió mediante células no confluentes y con el bloqueo mediante carbenoxolona; se obtuvo como resultado la onda de calcio sin aportación de calcio desde el retículo.

Podemos concluir que en las células ARPE-19/erGAP3 la propagación de la onda en las capas más proximales depende de las conexinas y en las capas más distales de la activación de los receptores purinérgicos mediante el ATP extracelular.

Palabras clave: epitelio pigmentario retiniano, onda de calcio intercelulares, sensores de calcio, retículo endoplasmático.

Introducción

La línea celular ARPE-19 es una línea celular procedente del epitelio pigmentario de la retina (EPR) de origen humano (1). Esta línea celular fue establecida a partir de cultivos primarios de ERP y son células que forman un epitelio monoestratificado, polarizado y con un cariotipo normal. El EPR posee un papel muy importante en el mantenimiento fisiológico de la retina, particularmente de los fotorreceptores (2). Es la capa más externa de la retina y entre sus funciones destacan el transporte de nutrientes desde la coroides, el establecimiento de la barrera hemato-retiniana y la absorción de luz dispersa (3). Es importante resaltar que el EPR fagocita los segmentos externos de los fotorreceptores, además de liberar factores tróficos que promueven la diferenciación y supervivencia de dichas células (4).

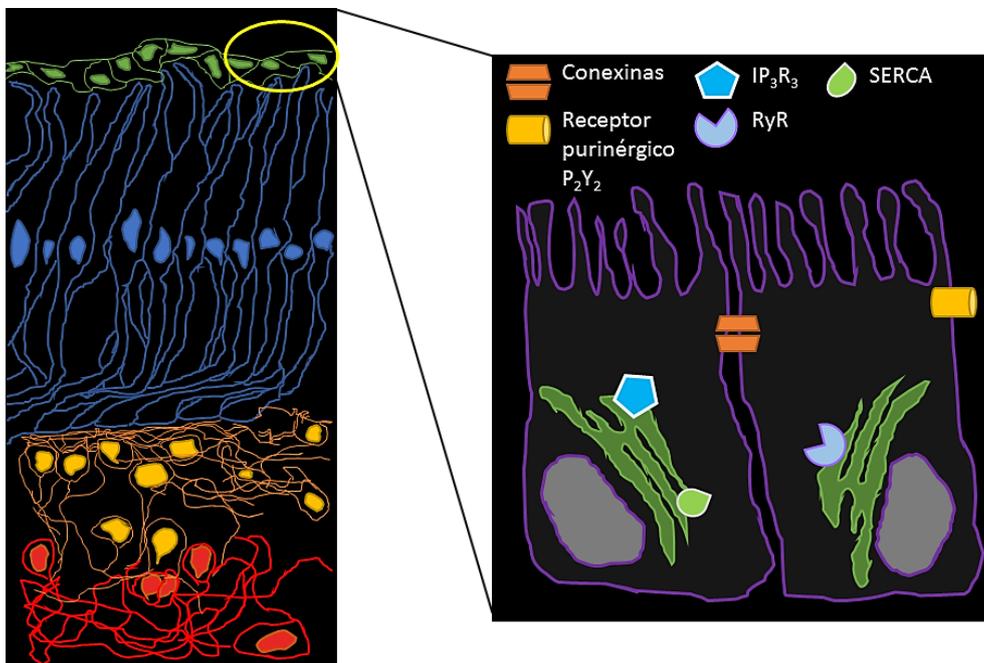


Figura 1: EPR. Su posición intrarretiniana con relación a los fotorreceptores y sus canales relacionados con el calcio y con posible implicación en las ondas a estudio.

En este tipo celular, se ha descrito la presencia de ondas de calcio (intercellular calcium wave – ICW) (5,6) generadas mediante estimulación mecánica y farmacológica. En dichas ondas de calcio se observa un rápido incremento de la concentración de calcio intracelular, que se expande a las células vecinas (7). Son ondas de calcio similares a las anteriormente descritas en células tales como hepatocitos (8), células gliales (9) o epiteliales (10).

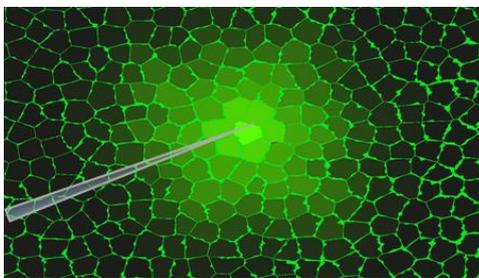


Figura 2: Estimulación mecánica con pipeta sobre el cultivo monocapa de ARPE-19.

Siendo el calcio una de las moléculas más importantes como segundo mensajero en la señalización celular y relacionada su acción con la diferenciación celular, la apoptosis y la liberación de factores de crecimiento, se remarca la importancia del estudio de dichas ondas de calcio que, se piensa, se propagan por varias vías, ya sea a través de uniones GAP o desde el exterior celular mediante un modo paracrino (6).

El tamaño y la velocidad de propagación de la onda dependen tanto de la naturaleza y fuerza del estímulo inicial, como de su mecanismo de extensión, en el que se implica a células contiguas.

En este proyecto se investiga el mecanismo mediante el cual se induce y propaga esta onda de calcio que aparece en cultivos monocapa de células de epitelio pigmentario de la retina humana, concretamente en la línea ARPE-19, a través de estimulación mecánica mediante mediciones simultáneas de los niveles de calcio citosólicos y reticulares mediante el empleo de los sensores fluorescentes Fura2 (citosólico) y GAP3.7 (retículo endoplasmático - RE) (11,12).

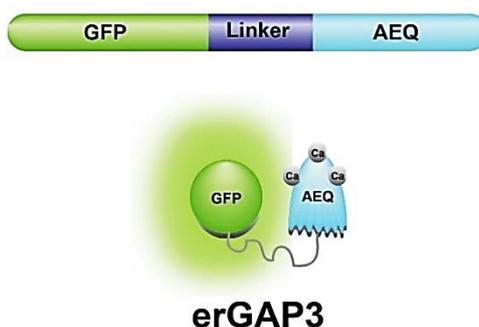


Figura 3: Sensor de Ca²⁺ GAP. Introducido en la línea celular mediante transfección viral, el sensor de calcio erGAP3 es la unión entre GFP (green fluorescent protein) y la proteína AEQ (apoaeguorin).

Este estudio tiene como objetivo aclarar la base y la cinética de las ICW, en concreto, el inicio de la onda de calcio, la propagación intracelular, la propagación intercelular y la generación de segundos mensajeros.

El comienzo de la onda, por norma general, se inicia con un aumento de la concentración del calcio intracelular, aunque se han documentado activaciones de la onda en medio libre de calcio (6), lo que añade una vía alternativa de señalización intracelular en la que estaría implicado el IP_3 como segundo mensajero. De manera intracelular se involucran los receptores de calcio presentes en el RE, el receptor de IP_3 y el receptor de rianodina. El primero de ellos posee tres isoformas diferentes con distinta susceptibilidad a la concentración de calcio, pero comparten el aumento de sensibilidad a calcio por aumento de calcio y un reclutamiento de receptores IP_3 contiguos, además de estar influenciados por la concentración de ATP citoplasmático, como los receptores de rianodina (RyR). El receptor presente en las células del RPE es IP_3R_3 (13). Los receptores RyR poseen dos isoformas, dependen, de nuevo, de la concentración de calcio en citosol, con activación con concentraciones micromolares y la inhibición con concentraciones milimolares (RyR2) y molares (RyR1); la sensibilidad del RyR a CICR (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release - CICR) (14) es mayor al disminuir la concentración de calcio en el lumen del RE y se inhibe con el aumento de este ion. Otros canales implicados en la liberación de calcio serían los canales de policistina-2 (Transient Receptor Potential – TRPP2) (15,16). También remarcar que el calcio liberado de esta organela será reintroducido mayoritariamente a través de la bomba de Ca^{2+} , dependiente de ATP al RE (Sarco/endoplasmic reticulum Calcium-ATPase - SERCA).

Como se ha reseñado inicialmente, hay dos principales vías para la propagación de la ICW intercelular. La vía paracrina mediada por la liberación de ATP, cuya liberación es típicamente vesicular, pero en las células no neuronales, puede ser no vesicular (17), como a través de proteínas CFTR (chloride (Cl^-) channel cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), por ejemplo presentes en células del epitelio respiratorio (18). El ATP puede activar receptores ionotrópicos (P2X) o metabotrópicos (P2Y); los receptores P2Y son los estimulados en la ICW, tras lo cual activan proteínas G que promueven que la enzima PLC- β (Phospholipase C β) genere IP_3 . El resultado final es la liberación de calcio desde el RE gracias a IP_3R . En el RPE está presente el tipo metabotrópico P2Y2 (19,20).

Las uniones GAP o conexinas, proteínas implicadas en uniones célula-célula y, a través de las cuales se interconecta el citoplasma de dos células adyacentes, podrían estar

implicadas en la propagación intercelular (6,7), ya que proporcionan una vía de difusión directa entre las células para todas aquellas moléculas con un tamaño molecular menor a 43 kDa (21), por lo que tanto el calcio como el IP₃ serían permeables a través de estas conexinas, aunque se puede reseñar una diferencia destacable entre ambas moléculas, mientras el IP₃ no se quela por ninguna proteína presente en el citosol, para el calcio sí que existen proteínas quelantes y que limitarían su difusión espacial, siendo la circulación de este ion más lenta y restringida.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Los experimentos se llevaron a cabo en una línea celular humana comercializada de EPR (ARPE-19. Donada por el IOBA). Se cultivaron en un Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/F12, Invitrogen-Gibco, Paisley, UK), suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bobino, 2 mM L-glutamina, 100 µg/mL estreptomicina, 100 U/mL penicilina, y 5 µg/ml Plasmocin™ (InvivoGen). Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Para los experimentos se sembraron las células en cubreobjetos de 18 mm de diámetro revestidos de poli-L-lisina a una densidad de 200-300 células/mm² en gota. Las células sembradas se usaron de 2-4 días in vitro (DIV) tras alcanzar el cultivo la confluencia. Para la realización de los experimentos se emplearon células del pase 13 al 23.

Creación del clon estable

La obtención de un clon celular estable con expresión de la proteína GAP3.7 como sensor de calcio reticular se realizó de la siguiente manera: se sembraron células de la línea celular ARPE-19 (pase 9) en una placa de Petri p100, cuando el cultivo alcanzó el 80% de confluencia dichas células se transfectaron con 3 µg de crDNA3 GAP3.7kdel usando lipofectamina 2000 (Invitrogen), en proporción 1:3 en un medio DMEM + 10% FBS. Después de 24 horas, se cambió el medio de cultivo a un medio de cultivo (DMEM + 10% FBS) suplementado con el antibiótico G-418 (geneticina, [800 µg/ml]), seleccionando de esta manera aquellas células que, al transfectarse con el gen de interés, se han dotado de resistencia al antibiótico. Después de 2-3 días la población de células GFP positivas fue, a su vez, purificada mediante citometría de flujo (BD FACSAria™) con el objetivo de separación celular o sorter, utilizando para ello el láser violeta a 403 nm. Las células seleccionadas se reseleccionaron con el G-418 presente en el medio.

A partir de las colonias que presentaban una mayor expresión de GAP3.7, determinado por su intensidad de fluorescencia, se aislaron células (mediante digestión de la colonia con tripsina) con las que se generaron diferentes clones estables, obteniéndose de esta manera tres clones estables con una buena expresión de GAP3.7. Finalmente,

comparando el nivel de expresión y el porcentaje de células expresando GAP3.7, se decidió hacer el estudio con el clon nº 2.

Mediciones de calcio

Células ARPE-19 sembradas sobre cubreobjetos de 18 mm de diámetro se situaron sobre el estativo de un microscopio invertido Nikon Diaphot equipado con un objetivo de 20x PlanApoUV (NA 0,7; Olympus). Las células fueron perfundidas con un medio extracelular estándar de la siguiente composición (en mM): NaCl 145, KCl 5,1 CaCl₂, 1 MgCl₂, glucosa 10, y 10 HEPES-Na (pH 7,4); a 22-25°C y con una velocidad de flujo de 5-6 ml/min. Para realizar las mediciones de la fluorescencia mínima se perfundió un medio extracelular sin calcio, al que se le añadió 0,5 mM EGTA, 100 µM ATP y 10 µM TBH.

En los experimentos con parada de flujo se cerraron las válvulas de perfusión, manteniendo un volumen de medio extracelular sobre el cristal de alrededor de 700-800 µL.

Para registrar la $[Ca^{2+}]_{RE}$, mediante el sensor ratiométrico GAP, las células se epiluminaron alternativamente a 403 y 470 nm (por medio de los filtros 403/12 DF y 470/25 DF y de un espejo dicróico DM500) excitándose la GAP a ambas longitudes de onda y recogándose la luz emitida por encima de 520 nm (LP520) por medio de una cámara Hamamatsu C4742-98, todo ello controlado con el software PCI 6.6 Simple Hamamatsu.

Para el registro simultáneo de $[Ca^{2+}]_{RE}$ y $[Ca^{2+}]_i$ se incubaron las células ARPE-19/erGAP3.7 durante 45 min con Fura-2 AM (4-8 µM, Molecular Probes) en 200 µl de solución extracelular. Tras el tiempo de carga, las células se lavaron abundantemente en solución extracelular. El registro simultáneo se hizo excitando las células a 380 y 470 nm por medio de los filtros 380/10 y 470/25 DF y el espejo dicróico DM500, recogándose la luz emitida por encima de 510 nm (LP520).

También se realizaron mediciones de la $[Ca^{2+}]$ en las células ARPE-19 en un microscopio directo Zeiss Axioplan equipado con un objetivo 20x (W-Achroplan, Zeiss; NA 0,5), en el que las células se excitaron secuencialmente a 405 y 470 nm, y cuya fluorescencia emitida se leyó a > 590 nm (LP590).

Las imágenes obtenidas se analizaron digitalmente mediante el software libre ImageJ. La razón $\Delta F_{470}/\Delta F_{403}$ se utilizó como un índice de la $[Ca^{2+}]_{RE}$, expresado generalmente como R/R_0 . Cuando no fue posible medir el ratio, los resultados se expresaron como $\Delta F/F_0$ o $(\Delta F - F_m) / (F_0 - F_m)$. Tanto F_0 como R_0 fueron el promedio de los valores de fluorescencia

obtenidos durante los primeros 5-10 fotogramas, siendo F_{min} el valor mínimo promedio de fluorescencia obtenido mediante perfusión de medio sin calcio (0 Ca^{2+} + 0.1 mM EGTA, 10 mM TBH y 100 μ M ATP).

Inmunofluorescencia

Para corroborar la localización del sensor de calcio GAP3.7 en el RE, cultivos de ARPE-19 se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, tras 3 lavados con PBS, las células fueron permeabilizadas con Tx-100 al 0.5% y bloqueados los sitios de unión inespecífica con suero de cabra al 10% durante 20 minutos. Posteriormente, las células fueron incubadas durante toda la noche (a 4°C) con el anticuerpo primario anti-calreticulina (1:200; Ac policlonal de conejo frente a la calreticulina). Tras 3 lavados con PBS, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo AF568, 1:500 1h. Después, las células fueron lavadas con PBS 3 veces durante 5 minutos y, acto seguido, montadas para su posterior visualización al microscopio de epifluorescencia.

Estimulación mecánica

La estimulación mecánica se llevó a cabo al tocar y presionar físicamente la membrana celular de la célula diana, con pipetas de patch-clamp en cuya punta se situó un hilo de tungsteno (0.075 mm \varnothing) afilado mediante electrolisis. Con objeto de asegurar una estimulación constante e uniforme en todos los experimentos, el estímulo mecánico fue de tal magnitud que originaba la rotura de la célula diana.

Resultados

A través de la línea celular ARPE-19, se puede estudiar de manera *in vitro*, la fisiología del epitelio pigmentario retiniano con su cultivo en monocapa y además mediante la utilización de estimulación mecánica, podríamos simular lo que *in vivo* serían los daños intraoculares como el desprendimiento de vítreo o el retiniano.

En primer lugar, se creó un clon estable de la línea ARPE-19 expresando el sensor de calcio GAP en el RE para realizar las mediciones de este ión en esta organela. Para corroborar la correcta localización del sensor de calcio GAP en el retículo endoplasmático del clon estable ARPE-19/erGAP3 generado, se realizó una inmunocitoquímica. En la *figura 4* podemos observar como el patrón de fluorescencia de la GAP coincide con el de la tinción frente a la proteína calreticulina, denominada así por su unión a ión calcio y su localización en el retículo endoplasmático (22). El solapamiento de las señales debidas a la GAP y calreticulina indicaría la correcta localización del sensor de calcio GAP3 dentro del RE de las células ARPE-19 del clon generado.

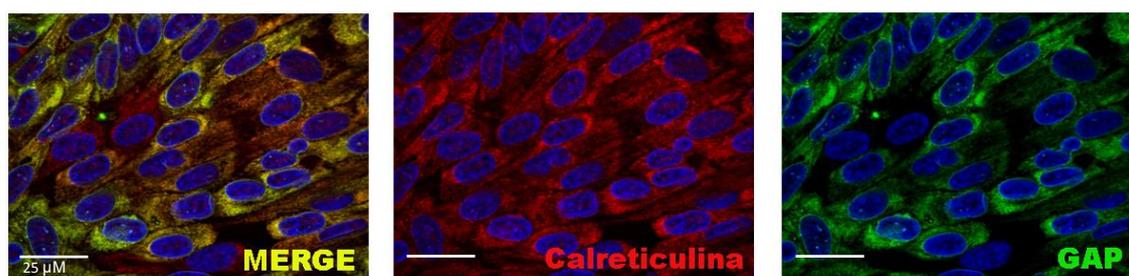


Figura 4: Inmunocitoquímica en células ARPE-19/erGAP3 frente a la calreticulina. En el panel central se observa la señal debida al anticuerpo anti-calreticulina (rojo). En el panel de la derecha, la señal fluorescente del sensor erGAP3. En el panel de la izquierda, se muestra la señal combinada de erGAP3 y el anticuerpo anti-calreticulina, coincidiendo el patrón de retículo endoplasmático en ambas (MERGE - amarillo). Tinción de los núcleos celulares con DAPI (azul).

Previamente en la literatura, se demostró la implicación de los receptores purinérgicos en la génesis de la onda de calcio inducida por estimulación mecánica en cultivos de células ARPE-19 (19,23). Por lo que, para confirmar la presencia de receptores funcionales de este tipo en la línea celular trasfectada, se caracterizó su respuesta a diferentes concentraciones del agonista no específico de receptores purinérgicos, ATP (24), realizándose un estudio dosis-respuesta de estas células frente a dosis crecientes de ATP.

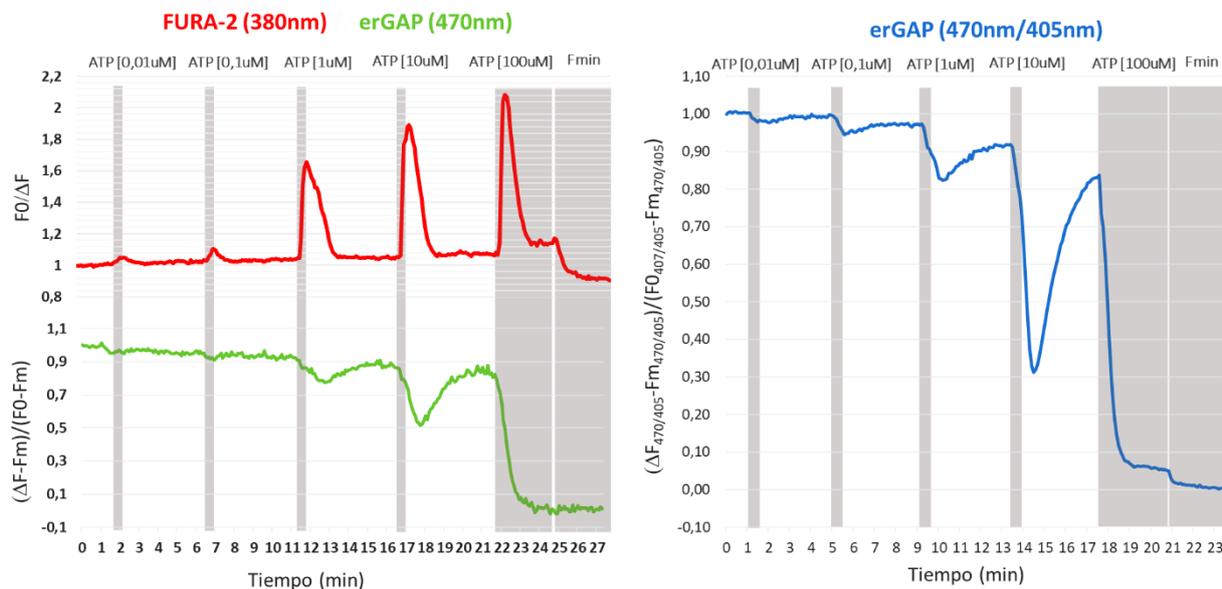


Figura 5: Gráfica dosis-respuesta obtenida en respuesta a breves aplicaciones (30s) de diferentes concentraciones de ATP. En las gráficas izquierdas, se registró simultáneamente la $[Ca^{2+}]$ en citosol con FURA-2 (trazado superior) y en el retículo mediante erGAP3 (trazado inferior). En la gráfica de la derecha el registro resulta de la medición de las dos longitudes de onda del sensor GAP, expresado mediante el ratio. Los registros muestran una respuesta dosis dependiente inducida por concentraciones comprendidas entre 0,01-100 μM de ATP (barras superiores). El registro de Fura-2 a 380 nm se ha invertido para facilitar la comprensión de la gráfica. Al final del experimento y con objeto de obtener la fluorescencia mínima (Fmin) se aplicó una solución sin Ca^{2+} y conteniendo 0,5 mM EGTA, 100 μM ATP, 10 μM TBH con objeto de vaciar completamente de calcio el retículo endoplasmático.

Como puede observarse en la *figura 5*, las células fueron estimuladas con concentraciones crecientes de ATP, siendo la duración de los estímulos de 30s y estando los mismos separados por períodos de lavado para garantizar un retorno a la basal de la respuesta.

Al final de los experimentos se obtuvo la Fmin depletando completamente el calcio del RE al perfundir las células con un medio libre de calcio y en presencia de 0.5 mM de EGTA, 10 μM TBH y 100 μM de ATP.

En la *figura 5* se observa como concentraciones de ATP por debajo de 1 μM no generan incrementos significativos del calcio citosólico, siendo las respuestas progresivamente mayores a concentraciones mayores de 1 μM y alcanzándose la

respuesta máxima en torno a 100 μM . A nivel reticular, el umbral de respuesta se sitúa también a concentraciones de ATP de 1 μM , obteniéndose también la respuesta máxima con 100 μM de ATP; concentración con la que se alcanza prácticamente un depletado completo del calcio del RE.

Por otro lado, se aprecia claramente que, aunque el inicio de la respuesta al agonista es el mismo para citosol y RE, el pico máximo de la respuesta en el citosol se alcanza mucho más rápidamente que en el RE.

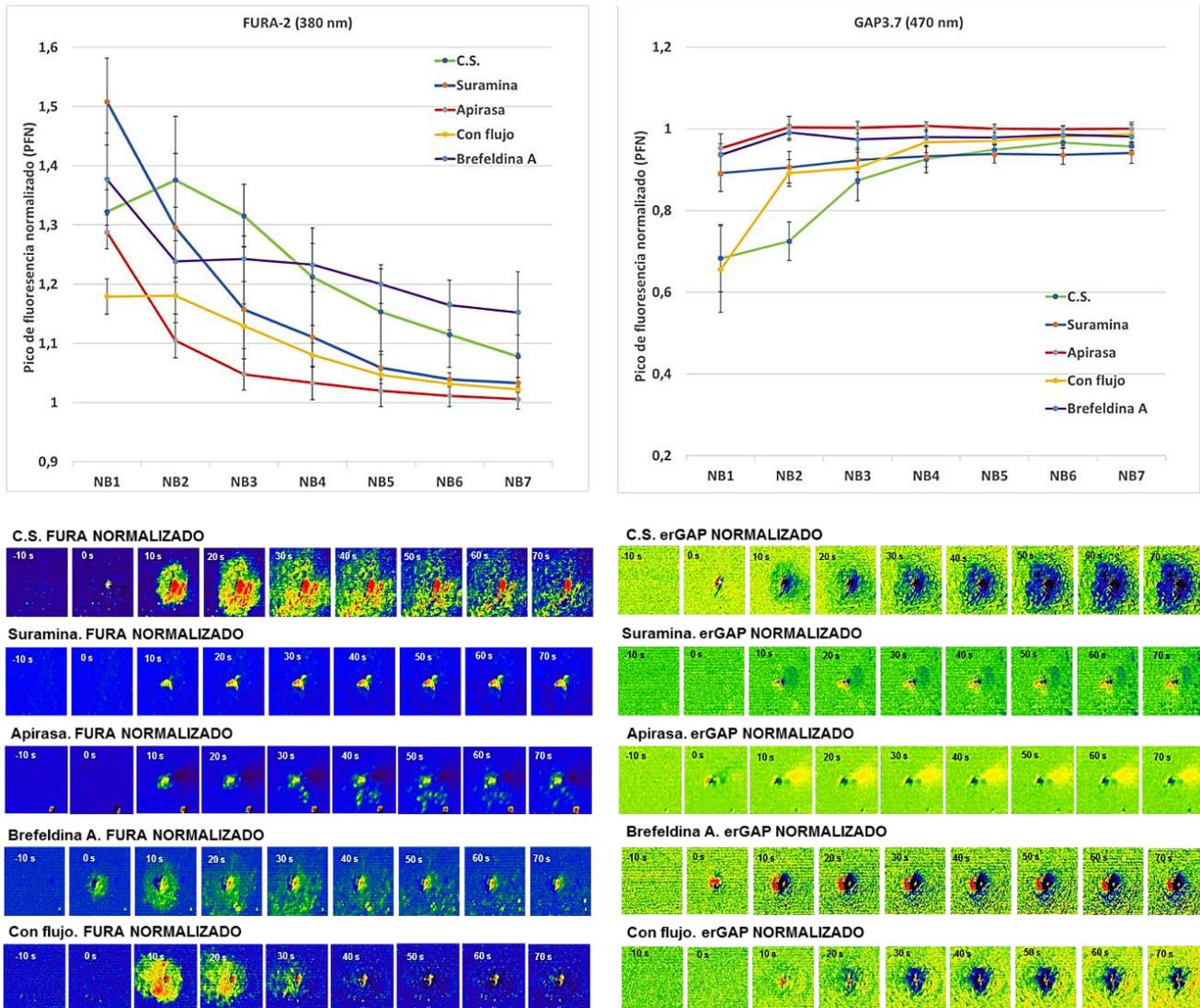


Figura 6: Efecto sobre la onda de calcio de la aplicación de suramina (antagonista de los receptores purinérgicos), apirasa (enzima que degrada el ATP), brefeldina A (inhibe el transporte de proteínas desde el RE al aparato del Golgi) y flujo, en comparación con la estimulación en condiciones estándar. En los paneles superiores se muestra la respuesta de calcio máxima alcanzada en citosol y retículo (en las capas celulares NB1 a NB7) tras la estimulación mecánica en condiciones estándar o en presencia de los fármacos nombrados: primero, la respuesta de las

células ante la estimulación mecánica en condiciones estándar (verde); segundo, la respuesta tras la incubación de 100 μM de suramina durante 15 minutos (azul); tercero, la respuesta a la degradación extracelular del ATP mediante la incubación de 1 μM de apirasa durante 15 minutos (rojo); en cuarto lugar, la perfusión de medio con calcio 1 mM a velocidad de flujo 6 ml/min (amarillo) y por último, la respuesta al bloqueo de transporte intracelular de vesículas con la incubación de 60 min de brefeldina A 2 $\mu\text{g/mL}$ (morado). La gráfica de la izquierda muestra los picos de máxima intensidad mediante el sensor citosólico Fura-2 y en la derecha se encuentran las intensidades referentes a la medición mediante el sensor GAP reticular; ambos representados con datos normalizados y barras de error estándar muestral. En las imágenes inferiores, las ondas intercelulares de calcio inducidas por estimulación mecánica que son dependientes de ATP liberado al medio extracelular, desde 10 segundos antes de la estimulación, en la estimulación (0 s) y posteriormente cada 10 hasta los 70 segundos. A la izquierda, se encuentran las mediciones realizadas mediante el sensor Fura-2 referentes al citosol. A la derecha, las imágenes tomadas del sensor reticular GAP.

El origen de la onda de calcio podría estar en la activación de receptores purinérgicos por el ATP liberado al medio extracelular por la célula estimulada mecánicamente y que daría lugar a la liberación de calcio desde el RE mediante la activación de los receptores de IP₃.

Con objeto de verificar si los receptores purinérgicos están implicados en la génesis de la onda de calcio inducida por estimulación mecánica en estas células, se estimularon las células mecánicamente en presencia del inhibidor de receptores purinérgicos suramina. Como se observa en la *figura 6*, la incubación de las células ARPE-19/erGAP3 durante 15 minutos en un medio conteniendo suramina a 100 μM produjo una disminución de la respuesta citosólica y reticular en las capas celulares desde NB2 respecto a las condiciones estándar (estimulación mecánica sin flujo en medio con calcio 1mM).

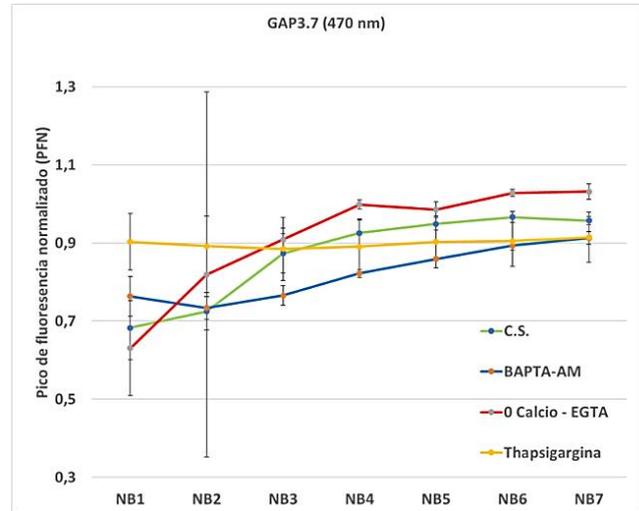
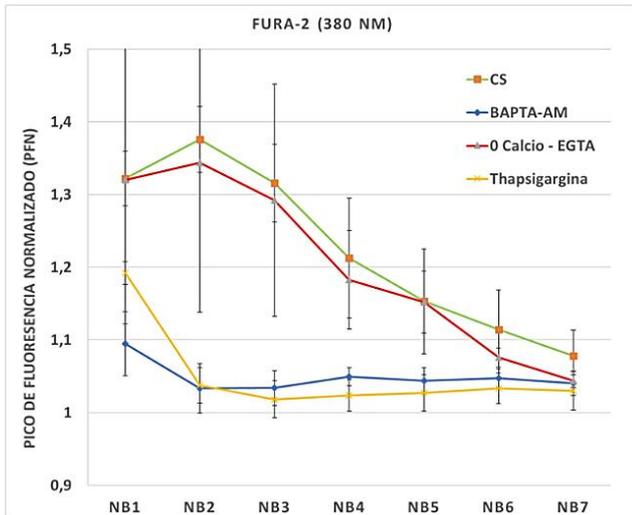
Con la misma idea de bloquear la onda de calcio intracelular vía receptores purinérgicos, se decidió realizar los experimentos en presencia de apirasa, una enzima que degrada el ATP (*figura 6*). La incubación de las células durante 15 minutos con 1 μM de esta enzima produjo una inhibición de la onda de calcio generada por estimulación mecánica, indicando que los receptores purinérgicos estarían implicados en la génesis de la onda y en su propagación. A través de la apirasa se consigue la degradación del ATP liberado al medio extracelular, por lo que los receptores P₂Y₂ no se activarían al no realizarse la unión de su ligando ATP, de nuevo produciéndose una disminución de la respuesta citosólica y reticular desde la capa NB2.

Cuando los experimentos se realizaron en presencia de perfusión del MEC en vez de en parada de flujo, se pudo observar como la onda de calcio citosólica generada se desviaba en la dirección del flujo (*figura 6*) siendo mayor el número de capas celulares estimuladas a favor de la perfusión y menor en contra. El resultado obtenido con este experimento en RE muestra la reducción de respuesta desde la capa NB3.

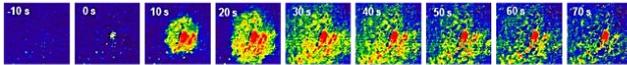
Los experimentos anteriores parecen indicar que la onda de calcio se propagaría gracias a la liberación del ATP por la célula estimulada, por lo que, si afectásemos el mecanismo de liberación de ATP, seguramente se vería afectada la onda de calcio. Para comprobar esta hipótesis, se incubaron las células en presencia de brefeldina A (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 60 minutos, antes de la aplicación del estímulo mecánico. Con la brefeldina A se valora si la excreción al medio es vesicular, ya que impide el transporte de proteínas desde el RE al aparato de Golgi inhibiendo por lo tanto la secreción de ATP al medio extracelular tras un estímulo fisiológico. Los datos obtenidos parecen indicar un ligero bloqueo en la señal de calcio generada por estimulación mecánica tan sólo en la capa NB2 (*figura 6*). Por lo que estos datos no parecen apoyar la hipótesis de que la onda de calcio se genere y/o propague por liberación paracrina de ATP.

El incremento del calcio citoplasmático que aparece en la onda de calcio generada tras la estimulación mecánica, podría tener su origen tanto en la liberación de calcio de depósitos intracelulares (RE) como en la entrada de calcio procedente del exterior celular. Para tratar de averiguar su origen se realizaron experimentos en medios extracelulares libres de Ca^{2+} y con presencia de quelantes para este ión (EGTA y BAPTA) o con thapsigargina (un inhibidor de la bomba SERCA).

Como se muestra en la *figura 7*, en condiciones de ausencia de calcio extracelular (0Ca-EGTA), la estimulación mecánica produjo una onda de calcio de magnitud similar al control lo que indicaría que el origen del calcio participante de esta ICW sería desde los depósitos de calcio intracelulares (RE). En cambio, al incubar las células con BAPTA-AM (10 μM , 45 minutos), un quelante de calcio que se acumula en el citosol celular, se produjo una reducción muy significativa en la intensidad de la respuesta de calcio citosólico en todas las capas estudiadas, sugiriendo una inhibición de esa respuesta inducida por ATP y una conservación de la respuesta reticular con menor diferencia de intensidad entre capas celulares respecto al control.



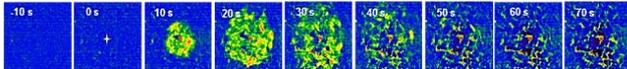
C.S. FURA NORMALIZADO



BAPTA-AM. FURA NORMALIZADO



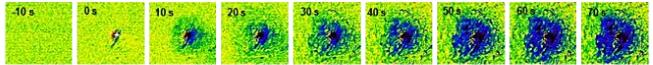
0Calcio-EGTA. FURA NORMALIZADO



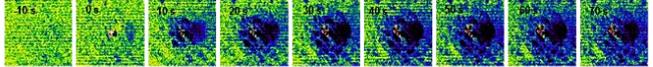
Thapsigargina. FURA NORMALIZADO



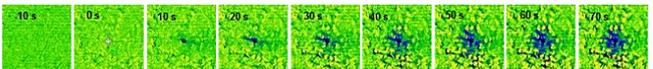
C.S. erGAP NORMALIZADO



BAPTA-AM. erGAP NORMALIZADO



0Ca²⁺ - EGTA erGAP NORMALIZADO



Thapsigargina. erGAP NORMALIZADO

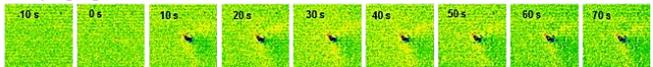


Figura 7: Efecto sobre la onda de calcio generada por estimulación mecánica de la aplicación de BAPTA-AM (quelante de calcio intracelular), thapsigargina (inhibidor de la SERCA) y de un medio libre de calcio (0Calcio-EGTA), en comparación con la estimulación en condiciones estándar. En los paneles superiores se muestra la respuesta de calcio máxima alcanzada en citosol y retículo (en las capas celulares NB1 a NB7) tras la estimulación mecánica en condiciones estándar, medio libre de calcio o en presencia de los fármacos nombrados: primero, la respuesta de las células ante la estimulación mecánica en condiciones estándar (verde); segundo, la respuesta tras la incubación de 10 μM del quelante de calcio BAPTA-AM durante 45 minutos (azul); tercero, la respuesta al medio libre de calcio con EGTA 0,5 mM (rojo) y, en último lugar, la incubación durante 10 min del inhibidor de la bomba de calcio del RE thapsigargina a concentración 1 μM (amarillo). La gráfica de la izquierda muestra los picos de máxima intensidad mediante el sensor citosólico Fura-2 y en la derecha se encuentran las intensidades referentes a la medición mediante el sensor GAP reticular ambas representados con datos normalizados y barras de error estándar muestral. En las imágenes inferiores, las ondas intercelulares de calcio inducidas por estimulación mecánica que son dependientes de ATP liberado al medio extracelular, desde 10 segundos antes de la estimulación,

en la estimulación (0 s) y, posteriormente, cada 10 hasta los 70 segundos. A la izquierda, se encuentran las mediciones realizadas mediante el sensor Fura-2 referentes al citosol. A la derecha, las imágenes tomadas del sensor reticular GAP.

Con objetivo de determinar la contribución del RE en la ICW (figura 7), se trató el cultivo celular con thapsigargina, un inhibidor de la bomba de calcio del RE (SERCA) que provoca un depletado irreversible del Ca^{2+} del RE. El resultado obtenido con esta molécula fue la abolición completa de la onda, lo que indicaría que la onda de calcio generada por estimulación mecánica en las células ARPE19/erGAP3 se origina por liberación de calcio desde el RE.

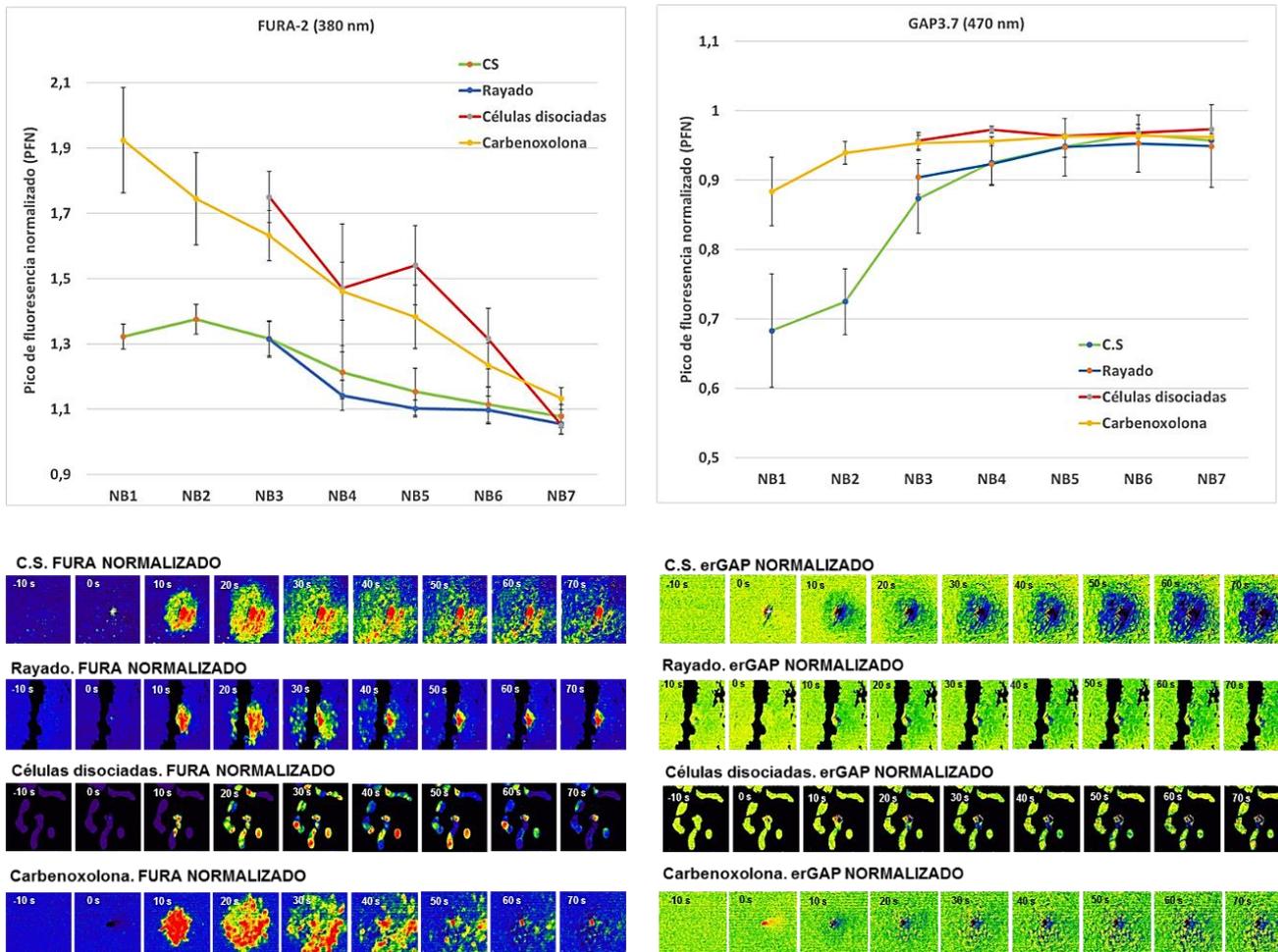


Figura 8: Efecto sobre la onda de calcio generada por estimulación mecánica de la aplicación de carbenoxolona (inhibidor de hemicanales), y de la discontinuidad de las células en cultivo, ya sea por cultivos no confluentes o por el realizado de un “rayado o separación” en el cultivo celular. Condiciones que se representan en comparación con la estimulación en condiciones estándar. En los paneles superiores se muestra la respuesta de calcio máxima alcanzada en citosol y retículo (en las capas celulares NB1 a NB7) tras la estimulación mecánica en condiciones estándar, en cultivo de células subconfluentes, en cultivo de células confluentes en el que se ha realizado un división mecánica mediante “rayado” o en presencia del

fármaco carbenoxolona: primero, la respuesta de las células ante la estimulación mecánica en condiciones estándar (verde); segundo, la respuesta celular en presencia del “rayado” creando un espacio intercelular (azul); tercero la respuesta en células disociadas (rojo), y, en último lugar, la incubación durante 30 min del inhibidor de las conexinas carbenoxolona a concentración 100 μM (amarillo). La gráfica de la izquierda muestra los picos de máxima intensidad mediante el sensor citosólico Fura-2 y, en la derecha, se encuentran las intensidades referentes a la medición mediante el sensor GAP reticular, ambas representadas con datos normalizados y barras de error estándar muestral. Se objetiva un aumento en la intensidad de los picos máximos medidos en citosol en el experimento con incubación de Carbenoxolona debido a una mayor carga del sensor Fura-2, por lo que no es un cambio significativo consecuencia de la inhibición de las conexinas. En las imágenes inferiores, las ondas intercelulares de calcio inducidas por estimulación mecánica que son dependientes de ATP liberado al medio extracelular, desde 10 segundos antes de la estimulación, en la estimulación (0 s) y posteriormente cada 10 hasta los 70 segundos. A la izquierda, se encuentran las mediciones realizadas mediante el sensor Fura-2 referentes al citosol. A la derecha, las imágenes tomadas del sensor reticular GAP.

Tal y como se ha descrito previamente en la literatura, parece ser que la onda de calcio podría propagarse también a través de las uniones GAP, ya sea por el paso a través de estos canales del IP3 o directamente del Ca^{2+} (7). Para confirmar esta hipótesis, se decidió bloquear los hemicanales con carbenoxolona (100 μM , incubación de 30 minutos). En la *figura 8* se muestra como la intensidad en el calcio citosólico aumenta en este experimento respecto a la estimulación en condiciones estándar, por una carga mayor del sensor Fura-2, los datos obtenidos no pueden tenerse en cuenta ya que no son representativos.

Otro abordaje experimental para verificar si existe propagación de la onda de calcio a través de uniones GAP, sería confirmar el paso o no de la onda de calcio a través de discontinuidades espaciales en el cultivo celular, siendo estas provocadas por una baja densidad celular del cultivo o por un “raspado” de un cultivo confluyente, condiciones en las que las células están separadas físicamente unas de otras impidiéndose una comunicación directa célula a célula vía uniones gap. Como se puede ver en la *figura 8*, en todos los experimentos en los que existían discontinuidades espaciales, ya sean los de “rayado” como los de las células disociadas, la ICW se propagó sin ningún problema de un lado a otro de la discontinuidad espacial, lo que sugeriría la presencia de algún factor paracrino implicado en la transmisión de la ICW.

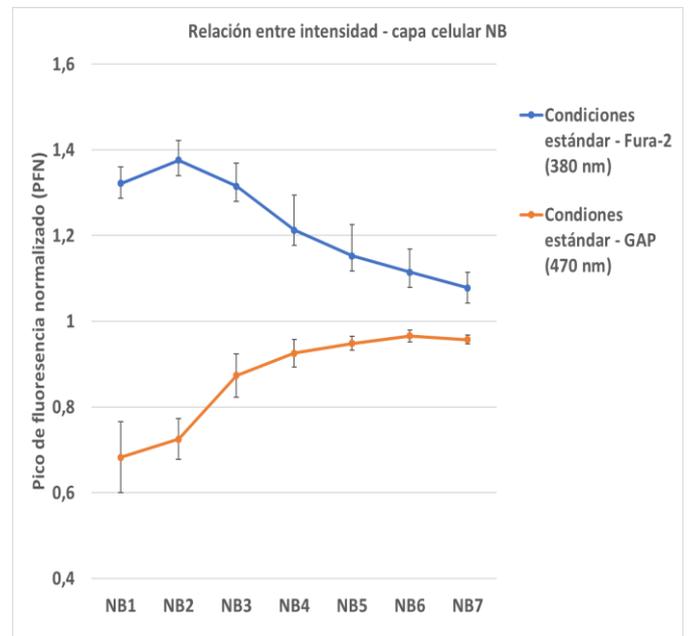
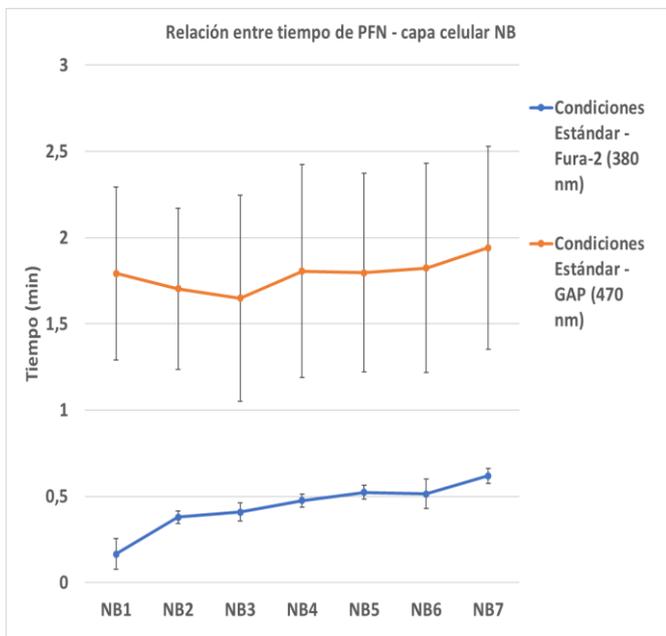


Figura 9: Valoración de los parámetros tiempo e intensidad en la propagación de la onda de calcio en condiciones estándar. Estudio de la relación entre el tiempo y la respuesta de calcio máxima alcanzada en citosol y retículo (en las capas celulares NB1 a NB7) tras la estimulación mecánica en condiciones estándar: respuesta citosólica (azul) y respuesta reticular (naranja). La gráfica de la izquierda muestra el tiempo en el que se produce el pico máximo de fluorescencia por capa, medido simultáneamente en citosol y retículo endoplásmico. La gráfica de la derecha muestra los picos de máxima intensidad mediante el sensor citosólico Fura-2 y el sensor reticular GAP en cada capa celular (NB1-NB7). Ambas representan datos normalizados y barras de error estándar muestral.

Por último, la cinética de la fluorescencia (*figura 9*) refleja que el tiempo en alcanzar el pico de máxima respuesta en la onda reticular es mayor que en la onda citosólica. En este último caso, ese tiempo va aumentando hasta que parece estabilizarse en torno a 0,5 segundos, siendo más rápido que el componente del RE. En el retículo, el tiempo en alcanzar el pico de máxima respuesta es igual en todas las capas celulares, mucho más retrasado que en el caso citosólico a pesar de que ambas respuestas se inician al mismo tiempo.

Discusión

El epitelio pigmentario de la retina es de gran importancia en la viabilidad de la función ocular, sobre todo a través de la estrecha relación reguladora y metabolizadora con los fotorreceptores y, muy importante a su vez, la función de barrera hemato-retiniana. Estas células están implicadas en diversas patologías oculares, es el caso de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o el desprendimiento de retina. La señalización de daño en estas patologías puede ofrecer un desequilibrio entre riesgo y beneficio importante, como es la liberación de factores angiogénicos en la DMAE, lo que resulta en una evolución tórpida de la enfermedad. El estudio de esta señalización, que se produce a través de ondas de calcio, puede ser importante como diana terapéutica y diagnóstica en la investigación médica.

Estas señales intra e intercelulares de calcio se inducen mecánicamente para su estudio produciendo daño celular a través de la estimulación mecánica, como en anterior bibliografía (6). En nuestros experimentos, las ICW se estudian hasta la capa número siete, pero en literatura previa se ha documentado hasta NB13 relacionando la causa con el número de uniones intercelulares presentes (6). En este estudio, la intensidad de fluorescencia se normaliza dentro de cada una de las capas del cultivo de las ARPE-19/erGAP3, obteniéndose como resultado una menor intensidad a mayor número de capa, tanto en la onda reticular como en el citosol. Ocurre lo mismo al valorar el tiempo en el que se alcanza el pico máximo de fluorescencia, más lento a mayor número de capa.

Las ondas de calcio intercelulares presentes en el epitelio pigmentario de la retina y en las células ARPE-19 (y en muchas otras células) son fenómenos complejos que muestran una respuesta coordinada de las células frente a un estímulo y cuya función todavía no están completamente esclarecida. Estudios previos presentes en la literatura (6,19) concluyen que en la génesis y propagación de la ICW están implicados tanto factores intracelulares (que difundirían a través de uniones GAP) como extracelulares (ATP) que actuarían de modo paracrino. Además, en el caso de la contribución del RE a la onda de calcio todos los estudios se han realizado de modo indirecto. En este estudio se realizan por primera vez medidas directas de la $[Ca^{2+}]_{RE}$, lo que permite un mejor estudio y comprensión de la contribución de esta organela a la génesis y propagación de las ondas de calcio intercelulares.

Con el objetivo de comprobar si el clon estable generado para este estudio (erGAP3/ARPE-19) presentaba receptores purinérgicos funcionales implicados en la ICW, se evaluó la respuesta generada tanto a nivel citosólico como reticular tras la estimulación de las células erGAP3/ARPE-19 con diferentes concentraciones de ATP. La respuesta obtenida fue dosis dependiente y de magnitud similar a la obtenida por otros grupos en este tipo celular, datos que además validan nuestro modelo para este estudio.

Los efectos sobre la ICW de la suramina y de principalmente la apirasa, muestran que al bloquearse los receptores purinérgicos o degradarse el ATP extracelular se obtiene un potente bloqueo de la ICW, indicando un papel relevante del ATP en la génesis y propagación de la onda de calcio generada mediante estimulación mecánica. La mayor parte de los experimentos de este estudio se realizaron en condiciones de parada de flujo, obteniéndose respuestas perfectamente concéntricas a partir de la célula estimulada. Curiosamente cuando los mismos experimentos se realizaban en presencia de flujo extracelular, la onda de calcio perdía su simetría deformándose en la dirección del flujo, y sugiriendo de nuevo que la liberación de un factor extracelular (el ATP) sería el responsable de la ICW. Al hilo de estos datos y con idea de bloquear la liberación de ATP (bloqueando por lo tanto la ICW) se realizaron experimentos en los que se bloqueó el transporte vesicular mediante incubación con brefeldina A. Paradójicamente los datos obtenidos no muestran ningún efecto significativo de la incubación de la droga sobre la onda de calcio generada mediante estimulación mecánica, descartándose una liberación paracrina de ATP, célula a célula, como responsable de la onda de calcio. Estos datos (junto a los anteriores) nos podría llevar a pensar en una onda de calcio generada por el ATP liberado al romperse la célula que se estimula mecánicamente y que generaría una onda de calcio hasta el límite de su difusión. De todas maneras, esto es pura especulación y más experimentos son necesarios para esclarecer esta cuestión.

En cuanto a los resultados obtenidos de la ausencia de calcio extracelular, en los que no se afecta la onda de calcio, claramente se deduce que la onda de calcio citosólica es generada por liberación de calcio desde el RE (seguramente a través de un aumento de IP3 en el citosol), no contribuyendo aparentemente el calcio del exterior celular. Estos datos irían en consonancia con la abolición de la ICW observada al depletar irreversiblemente el calcio del RE mediante incubación de las células con thapsigargina, demostrándose que el RE es indispensable para la génesis de la ICW. Otro dato que refuerza esta idea es el bloqueo de la onda de calcio citosólica generado al incubar las células con BAPTA-AM, este bloqueo sin embargo no afecta a la liberación de Ca^{2+} del RE que se desarrolla y extiende

a las diferentes capas celulares de igual modo que en los controles e incluso con una respuesta potenciada.

Los datos presentes en la literatura muestran la implicación de algún factor intracelular en la propagación de la ICW, a través de uniones GAP. Los posibles candidatos que se barajan son el propio Ca^{2+} y el IP_3 . Si esto fuera así, la ICW se vería afectada o anulada al perderse la continuidad celular, hecho que en nuestras manos no ha sucedido ya que tanto en los experimentos con baja densidad celular como en aquellos en los que se ha rayado el cultivo separando las células a un lado y otro, la onda de calcio se ha propagado sin aparentes problemas a través de la discontinuidad.

Con la novedosa aportación de la cuantificación simultánea de la implicación del calcio a nivel de citoplasma y de retículo in vitro, se abre una vía de investigación hacia los proyectos in vivo con ratones transgénicos para el sensor erGAP en RPE. Y como futuros proyectos, se pueden plantear experimentos con las células ARPE-19/erGAP3 para descubrir la vía de liberación del ATP, averiguar qué moléculas se transportan entre células a través de las conexinas, e incluso, el estudio de terapias.

Conclusiones

Los resultados demuestran que el clon estable ARPE-19/erGAP3 presenta ondas de calcio intercelulares producidas mediante estimulación mecánica. Estas ondas, de extensión limitada a unas 7 capas celulares, no son autorregenerativas y parecen estar originadas por difusión del ATP liberado en la estimulación mecánica. Se excluye una participación significativa de las uniones GAP (en las condiciones utilizadas) en el origen y/o extensión de la onda. Por otro lado, se demuestra que la ICW es independiente de la $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular, siendo originada por liberación de Ca^{2+} desde el RE, probablemente vía IP_3 . Que sepamos, hemos realizado las primeras medidas directas de la implicación del RE en la ICW, que han mostrado un desfase temporal muy acusado entre la onda de calcio citosólica y la liberación de Ca^{2+} desde el RE que origina esa onda citosólica, estando la onda de liberación de calcio del RE muy retrasada temporalmente con respecto a la onda de calcio citosólica a pesar de que ambos fenómenos se inician al mismo tiempo. Estas células ARPE-19/erGAP3 podrían convertirse en un modelo de experimentación con objeto de investigar más a fondo las ICW y su implicación en la fisiopatología del EPR in vivo.

Onda de calcio intercelular en epitelio pigmentario de la retina humano: mediciones directas de calcio reticular

González-Zamora J, Álvarez-Sánchez S, Rojo-Ruiz J, Alonso-Alonso MT y García-Sancho J.

Introducción

Hasta el más simple órgano de la visión se compone de al menos dos tipos celulares: los fotorreceptores y las células pigmentadas, demostrando la vital importancia de su interacción. En vertebrados, el epitelio pigmentario de la retina (EPR) se localiza entre los segmentos externos de los fotorreceptores y los capilares de la coroides y desde esta posición estratégica realiza una gran variedad de funciones: absorbe luz, actúa de barrera hemato-retiniana, secreta numerosos factores, recicla el fotopigmento de los fotorreceptores y fagocita sus segmentos externos entre otras muchas funciones. El Ca^{2+} es un señalizador intracelular ubicuo responsable del control de un extraordinario número de procesos celulares y el EPR no es una excepción, en él se han descrito multitud de procesos en los que está implicado una señal de calcio, incluyendo ondas de Ca^{2+} intercelulares (OCI) que se extienden radialmente desde el foco en que se originan.

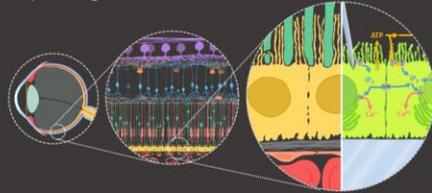


Figura 1. Localización del EPR (amarillo) dentro del ojo (izquierda) y de la retina (central) y relación que establece con la coroides y los fotorreceptores (derecha). La teoría propuesta para explicar la génesis de OCI tras estimulación mecánica se representa esquemáticamente.

En EPR y otros tipos celulares que presentan OCI se hace referencia al incremento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático $[Ca^{2+}]_{cit}$ desde los depósitos intracelulares, cuyo principal exponente es el retículo endoplasmático (RE), sin embargo mediciones directas de la concentración de Ca^{2+} reticular $[Ca^{2+}]_{RE}$ no habían sido realizadas debido a la dificultad para medir precisamente la $[Ca^{2+}]_{RE}$. En el presente trabajo usamos el nuevo sensor de calcio recientemente descrito por nuestro grupo, GAP3, en la línea celular de EPR humano ARPE-19 para profundizar en los mecanismos y realizar las primeras mediciones de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ durante la OCI.

Materiales y métodos

En primer lugar se creó un clon estable de la línea ARPE-19 expresando el sensor de calcio GAP3 en el RE. Dicho clon se sembró en cubreobjetos y tras 2-4 días, alcanzada la confluencia, se realizó el registro simultáneo de $[Ca^{2+}]_{RE}$ y $[Ca^{2+}]_{cit}$ previa incubación con Fura-2 AM, sensor de Ca^{2+} citosólico. La estimulación mecánica se llevó a cabo con micropipetas en cuya punta se situó un filamento de tungsteno. Las imágenes obtenidas se analizaron digitalmente mediante el software libre ImageJ. Se cuantificó el valor de intensidad de fluorescencia media en cada fotograma del registro en 7 capas concéntricas a la célula estimulada mecánicamente [(NB1-BN7) determinadas por regiones de interés (ROI)]. Los resultados se expresaron como $\Delta F/F_0$ en las mediciones reticulares, a 470 nm, y como $F_0/\Delta F$ las mediciones citosólicas, a 380 nm.

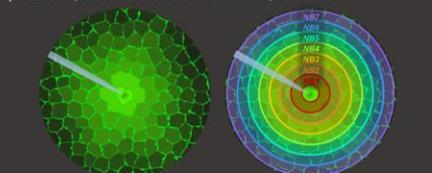


Figura 2. Representación gráfica del cultivo en monocapa de ARPE-19 durante la estimulación mecánica e hipotética variación en la fluorescencia emitida por un sensor de calcio consecuencia de la OCI. A la derecha se muestra la configuración de las ROI empleadas en el análisis (NB1-NB7).

Resultados

Creado el clon estable ARPE-19/erGAP3, se confirmó la expresión del sensor GAP3 en el interior del RE realizando una inmunofluorescencia con un anticuerpo frente a calreticulina, una proteína que se localiza exclusivamente en el RE. Tal como se observa en la figura 3, el patrón de fluorescencia emitido por la GAP3 coincide con el obtenido con el anticuerpo frente a la calreticulina, lo que nos indicaría una expresión selectiva de GAP3 en el retículo (erGAP3).

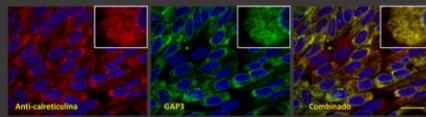


Figura 3. Inmunofluorescencia de células ARPE-19/erGAP3 teñidas con anticuerpos frente a calreticulina. De izquierda a derecha: señal debida a anti-calreticulina (rojo), GAP3 (verde) y superposición de los anteriores; los núcleos están teñidos en azul. Barra de escala: 25 µm.

Para confirmar la existencia de receptores purinérgicos funcionales en el clon ARPE-19/erGAP3 se estudió la respuesta al agonista inespecífico de dichos receptores, el ATP, estudiando tanto a nivel citosólico como reticular, el efecto de concentraciones crecientes de dicho agonista.

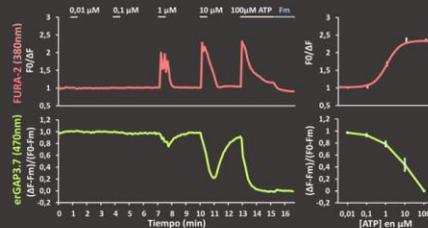


Figura 4. Registro representativo (izquierda) y curva dosis-respuesta (derecha) obtenidos en respuesta a breves aplicaciones (30s) de diferentes concentraciones de ATP. En rojo las medidas citosólicas y en verde las reticulares.

El estudio de la dinámica del calcio citosólico durante la OCI, se llevó a cabo mediante estimulación mecánica en cultivos de células ARPE-19/erGAP3 en confluencia. Los registros de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ con FURA-2 muestran un rápido incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ tras el estímulo mecánico que se inicia en la capa NB1 y se extiende posteriormente capa a capa, disminuyendo en velocidad e intensidad. Simultáneamente registrada, la $[Ca^{2+}]_{RE}$ sigue una cinética muy diferente.

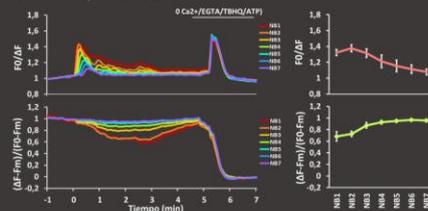


Figura 5. Propagación de la OCI en las células ARPE-19/erGAP3 tras estímulo mecánico (barra vertical discontinua) en las capas NB1-NB7. Al final del registro se inicia perfusión con la solución ya descrita para vaciar el retículo (barra superior). A la izquierda análisis estadístico de la intensidad de fluorescencia del pico en las diferentes capas.

Condiciones estándar (380 nm y 470 nm)

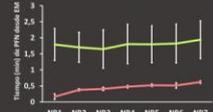


Figura 6. Tiempo que tarda en alcanzarse la respuesta máxima en citosol o RE en cada capa, tras la aplicación del estímulo mecánico.

Es de destacar el gran retraso temporal existente entre los picos de respuesta máxima en el citosol y retículo en cada una de las capas estudiadas tras la estimulación mecánica, a pesar de que el inicio de la respuesta en ambos compartimentos es simultáneo.

Bibliografía

- Abu Khamidakh AE, Juuti-Uusitalo K, Larsson K, Skottman H, Hyytinen J. Intercellular Ca^{2+} wave propagation in human retinal pigment epithelium cells induced by mechanical stimulation. *Exp Eye Res.* 2013;108:129-39.
 Vainio I, Abu Khamidakh A, Paci M, Skottman H, Juuti-Uusitalo K, Hyytinen J, et al. Computational Model of Ca^{2+} Wave Propagation in Human Retinal Pigment Epithelial ARPE-19 Cells. *PLoS ONE.* 2015;10(6):e0128434.
 Rodríguez-García A, Rojo-Ruiz J, Navas-Navarro P, Aleustia FJ, Gallego-Sandín S, García-Sancho J, et al. GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca^{2+} in organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2584-9.

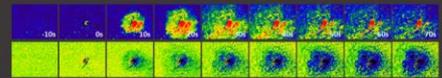


Figura 7. Secuencia de imágenes antes (tiempo -10s), durante (tiempo 0s) y posteriormente a la estimulación mecánica (tiempo 0.70s) en condiciones estándar. Fila media: onda citosólica normalizada. Fila inferior: onda reticular normalizada.

Con el fin de determinar el origen del calcio que aumenta en el citosol tras el estímulo mecánico, se empleó una solución extracelular libre de calcio y se depletó el RE con taspigargina, observándose que era el RE el principal responsable de la OCI. Confirmándose esto último al ver que se mantenía la propagación de la onda reticular tras quelarse el calcio citosólico con BAPTA-AM.

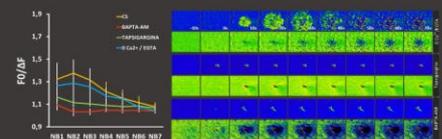


Figura 8. Gráfica del efecto de 0 Ca^{2+} /EGTA, taspigargina y BAPTA-AM en el pico de $[Ca^{2+}]_i$ tras estímulo mecánico y secuencias de imágenes normalizadas de la onda citosólica y reticular.

La supuesta propagación de la OCI, célula a célula, vía mensajeros intracelulares se estudió bloqueando las uniones gap y mediante ruptura del contacto intercelular. En ambos casos la OCI permaneció inalterada.

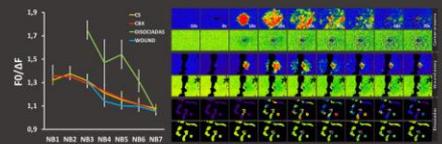


Figura 9. Gráfica del efecto de carbenoxolona, wound-assay y cel. disociadas en el pico de $[Ca^{2+}]_i$ tras estímulo mecánico y secuencias de imágenes normalizadas de la onda citosólica y reticular.

La desviación de la OCI en presencia de flujo y su anulación con apirasa, un enzima que hidroliza el ATP del medio externo, indica que la propagación principal es paracrina y mediada por ATP.

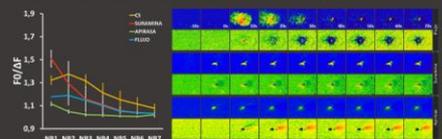


Figura 10. Gráfica del efecto con flujo, suramina y apirasa en el pico de $[Ca^{2+}]_i$ tras estímulo mecánico y secuencias de imágenes normalizadas de la onda citosólica y reticular.

Conclusiones

Se confirma la existencia de una OCI desencadenada por estímulo mecánico en la línea ARPE-19, de extensión limitada a unas 7 capas celulares. El ATP difunde extracelularmente, a partir de la célula estimulada, y es la principal molécula implicada en la propagación de la OCI descartándose una contribución significativa de las gap junctions en el origen y/o extensión de la OCI. Por otro lado, se demuestra que la OCI es independiente del $[Ca^{2+}]_e$ extracelular, siendo originada por liberación de calcio desde el RE. Realizamos las primeras medidas directas de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ durante la OCI. Destaca un vaciamiento del RE más dilatado en el tiempo que el pico citosólico abriendo la posibilidad a nuevos efectos de la OCI en la fisiología celular y la fisiopatología oftalmológica.

Agradecimientos

Nos gustaría agradecer a Dña. Miriam Daniela García Cubillas su ayuda en la obtención del clon ARPE-19/erGAP3 y en el cuidado de cultivos. También agradecer la cesión desde IOBA de la línea celular.

Bibliografía

1. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res.* febrero de 1996;62(2):155-69.
2. Mazzoni F, Safa H, Finnemann SC. Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture. *Exp Eye Res.* septiembre de 2014;126:51-60.
3. Nevala H, Ylikomi T, Tähti H. Evaluation of the selected barrier properties of retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 for an in-vitro blood-brain barrier model. *Hum Exp Toxicol.* octubre de 2008;27(10):741-9.
4. German OL, Buzzi E, Rotstein NP, Rodríguez-Boulan E, Politi LE. Retinal pigment epithelial cells promote spatial reorganization and differentiation of retina photoreceptors. *J Neurosci Res.* diciembre de 2008;86(16):3503-14.
5. Himpens B, Stalmans P, Gomez P, Malfait M, Vereecke J. Intra- and intercellular Ca²⁺ signaling in retinal pigment epithelial cells during mechanical stimulation. *FASEB J.* 1999;13 Suppl:S63-68.
6. Abu Khamidakh AE, Juuti-Uusitalo K, Larsson K, Skottman H, Hyttinen J. Intercellular Ca²⁺ wave propagation in human retinal pigment epithelium cells induced by mechanical stimulation. *Exp Eye Res.* marzo de 2013;108:129-39.
7. Stalmans P, Himpens B. Confocal imaging of Ca²⁺ signaling in cultured rat retinal pigment epithelial cells during mechanical and pharmacologic stimulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* enero de 1997;38(1):176-87.
8. Dupont G, Tordjmann T, Clair C, Swillens S, Claret M, Combettes L. Mechanism of receptor-oriented intercellular calcium wave propagation in hepatocytes. *FASEB J.* febrero de 2000;14(2):279-89.
9. Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron.* junio de 1991;6(6):983-92.
10. Sanderson MJ, Charles AC, Dirksen ER. Mechanical stimulation and intercellular communication increases intracellular Ca²⁺ in epithelial cells. *Cell Regul.* julio de 1990;1(8):585-96.
11. Rodríguez-García A, Rojo-Ruiz J, Navas-Navarro P, Aulestia FJ, Gallego-Sandin S, García-Sancho J, et al. GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca²⁺ in organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 de febrero de 2014;111(7):2584-9.
12. Alonso MT, Rojo-Ruiz J, Navas-Navarro P, Rodríguez-Prados M, García-Sancho J. Measuring Ca²⁺ inside intracellular organelles with luminescent and fluorescent aequorin-based sensors. *Biochim Biophys Acta.* junio de 2017;1864(6):894-9.
13. LeBeau AP, Yule DI, Groblewski GE, Sneyd J. Agonist-dependent phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: A possible mechanism for agonist-specific calcium oscillations in pancreatic acinar cells. *J Gen Physiol.* junio de 1999;113(6):851-72.
14. Roderick HL, Berridge MJ, Bootman MD. Calcium-induced calcium release. *Curr Biol.* 27 de mayo de 2003;13(11):R425.
15. Anyatonwu GI, Ehrlich BE. Calcium signaling and polycystin-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1 de octubre de 2004;322(4):1364-73.
16. Sammels E, Devogelaere B, Mekahli D, Bultynck G, Missiaen L, Parys JB, et al. Polycystin-2 activation by inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release requires its direct association with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in a signaling microdomain. *J Biol Chem.* 11 de junio de 2010;285(24):18794-805.
17. Bodin P, Burnstock G. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem Res.* septiembre de 2001;26(8-9):959-69.
18. Okada SF, Nicholas RA, Kreda SM, Lazarowski ER, Boucher RC. Physiological Regulation of ATP Release at the Apical Surface of Human Airway Epithelia. *J Biol Chem.* 11 de agosto de 2006;281(32):22992-3002.
19. Sullivan DM, Erb L, Anglade E, Weisman GA, Turner JT, Csaky KG. Identification and characterization of P2Y2 nucleotide receptors in human retinal pigment epithelial cells. *J Neurosci Res.* 1 de julio de 1997;49(1):43-52.
20. Vainio I, Abu Khamidakh A, Paci M, Skottman H, Juuti-Uusitalo K, Hyttinen J, et al. Computational Model of Ca²⁺ Wave Propagation in Human Retinal Pigment Epithelial ARPE-19 Cells. *PLoS ONE.* 2015;10(6):e0128434.
21. Janssen-Bienhold U, Dermietzel R, Weiler R. Distribution of connexin43 immunoreactivity in the retinas of different vertebrates. *J Comp Neurol.* 6 de julio de 1998;396(3):310-21.
22. Smith MJ, Koch GL. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J.* 1 de diciembre de 1989;8(12):3581-6.
23. Reigada D, Mitchell CH. Release of ATP from retinal pigment epithelial cells involves both CFTR and vesicular transport. *Am J Physiol, Cell Physiol.* enero de 2005;288(1):C132-140.
24. Peterson WM, Meggyesy C, Yu K, Miller SS. Extracellular ATP activates calcium signaling, ion, and fluid transport in retinal pigment epithelium. *J Neurosci.* 1 de abril de 1997;17(7):2324-37.

