



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y
Fisiología**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Investigación Biomédica
Curso 2022 – 2023

**ESTUDIO DE LA DINÁMICA DEL CALCIO
SUBCELULAR EN EL EPITELIO
PIGMENTARIO DE LA RETINA**

Autora: Cinthia Sánchez Rabadán

Tutores: María Teresa Alonso Alonso
Jonathan Rojo Ruiz

ÍNDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1.El ion calcio.....	7
1.2. Homeostasis del calcio libre	7
1.3. Mecanismo de propagación de las señales de calcio	8
1.4. Células de epitelio pigmentario retiniano.....	10
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. Cultivo celular	12
2.2. Mediciones de calcio	13
2.3. Estimulación mecánica.....	13
2.4. Análisis de datos.....	13
2.5. Análisis estadístico.....	14
3. RESULTADOS	15
3.1. Efecto del ATP extracelular sobre la dinámica del calcio reticular	15
3.2. Ondas de calcio intercelulares generadas mediante estimulación mecánica	15
3.3. Origen y propagación de la onda de calcio intercelular	18
3.3.1. Propagación de la onda de calcio vía gap-junction	22
4. DISCUSIÓN	23
5. CONCLUSIONES	26
6. BIBLIOGRAFÍA	27

ABREVIATURAS

∅	Diámetro
[Ca ²⁺]	Concentración del ion calcio
[Ca ²⁺] _C	Concentración del Ca ²⁺ citosólico
[Ca ²⁺] _E	Concentración del Ca ²⁺ extracelular
[Ca ²⁺] _{Intracelular}	Concentración del Ca ²⁺ intracelular
[Ca ²⁺] _{RE}	Concentración de Ca ²⁺ en el retículo endoplásmico
2-APB	2-aminoetoxidifenil borato
ATP	Adenosín trifosfato
cADP-ribosa	Adenosina difosfato-ribosa cíclica
CICR	Liberación de Ca ²⁺ inducida por Ca ²⁺ (<i>Calcium Induced Calcium Release</i>)
DIV	Días <i>in vitro</i>
EGTA	Ácido etilenglicol-bis-(β-amino-etil-éter)-N,N' - tetraacético
EPR	Epitelio pigmentario retiniano
IP ₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IP ₃ R	Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato
MCU	Uniportador mitocondrial de calcio
MEC	Medio extracelular
n	Número de experimentos válidos realizados
N.A.	Apertura numérica
NAADP	Ácido nicotínico de la adenosina difosfato
NB	Número de capa vecina (<i>Neighboring</i>)
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
PMCA	Ca ²⁺ -ATPasa de la membrana plasmática
RE	Retículo endoplásmico
ROC	Canales de calcio operados por receptor
ROI	Región de interés
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPasa del retículo (sarco)endoplásmico
SMOC	Canales de calcio operados por segundo mensajero
SOCE	Entrada capacitativa de calcio
TBH	2,5-di-tert-benzohidroquinona
TRP	Canales receptores de potencial transitorio
TRPC	Canales receptores de potencial transitorio de la familia canónica
TRPV	Canales receptores de potencial transitorio de la familia vanilloide
VOC	Canales de calcio operados por voltaje

RESUMEN

El ion calcio (Ca^{2+}) es un mensajero intracelular ubicuo que controla la mayor parte de las funciones celulares debido a sus múltiples patrones de señalización y a su compartimentalización en organelas como el retículo endoplásmico (RE), principal reservorio de Ca^{2+} . En los epitelios, existe una señal de Ca^{2+} característica denominada onda de calcio intercelular, que consiste en la propagación del aumento de calcio citosólico de una célula a otra.

Hemos estudiado la participación del RE en la onda de calcio intercelular desencadenada por un estímulo mecánico en un epitelio de retina humana registrando la $[\text{Ca}^{2+}]$, simultáneamente en el citosol y en el RE con dos indicadores específicos de Ca^{2+} . Hemos encontrado una onda de vaciamiento del Ca^{2+} del RE, que es más tardía y más lenta que la onda de calcio citosólica. Ni la onda citosólica ni la del RE dependen del Ca^{2+} extracelular, ya que ni la eliminación del mismo ni la adición de níquel las inhiben. Sin embargo, estos tratamientos provocan un vaciamiento lento y progresivo del RE, indicando que el Ca^{2+} extracelular es necesario para el mantenimiento del Ca^{2+} del RE. Además, hemos descubierto que el inhibidor de las uniones estrechas carbenoxolona, que se sabía que inhibe la onda de calcio citosólico, produce un gran vaciamiento del calcio del RE. Este resultado novedoso podría explicar la supuesta implicación de las uniones de tipo gap en la transmisión de la onda de calcio citosólica. Futuros estudios permitirán elucidar el mecanismo de vaciamiento del RE por este fármaco.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El ion calcio

El calcio es el elemento de número atómico 20 de la tabla periódica y en el *Homo sapiens* precisa ser incorporado por la dieta para convertirse en el elemento más abundante que no requiere de su unión a otros átomos.

En humanos, el 99% del calcio se localiza en los huesos en forma de hidroxapatita, y el 1% restante se distribuye como calcio iónico (también denominado calcio libre y representado como Ca^{2+}) actuando como principal segundo mensajero intracelular regulando procesos fisiológicos tales como la contracción muscular, la exocitosis de neurotransmisores en neuronas, la secreción de hormonas en células endocrinas y los procesos de proliferación y diferenciación celular (Baird, 2011; Shkempi and Huppertz, 2022); procesos que involucran a numerosas hormonas, canales iónicos, transportadores e intercambiadores: el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (NCX), la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA o ATP2B), la bomba del retículo (sarco)endoplásmico (SERCA o ATP1A) y/o el uniportador mitocondrial de calcio (MCU) (Krebs et al., 2015).

Además, el mantenimiento de su homeostasis es muy importante, pues una alteración de sus niveles desencadena numerosas enfermedades en función del órgano afectado (Guha et al., 2014; Tebben and Kumar, 2013).

1.2. Homeostasis del calcio libre

En células no estimuladas, la concentración de calcio citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) se mantiene en niveles muy bajos del orden de 10^{-7}M debido a la acción de bombas ATPasas localizadas en la membrana plasmática y el retículo endoplásmico (RE), que es el principal almacén de calcio celular; sin embargo, la activación celular mediante estímulos hormonales, neuronales o de otro tipo provoca la salida del calcio retenido en el RE hacia el citosol (mediante canales del RE sensibles al ion calcio o a otros segundos mensajeros como IP_3 , NAADP o cADP-ribosa), así como su entrada desde el medio extracelular a través de canales de calcio de tipo voltaje-dependientes (VOCs), operados por receptor (ROCs), operados por segundos mensajeros (SMOCs), etc. y como consecuencia, se produce el aumento transitorio de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y la respuesta celular (Berridge et al., 2003; García-Sancho, 1995)

Los principales canales de calcio presentes en el RE son:

- Receptores de IP_3 (IP_3R): son tetrámeros constituidos por seis dominios transmembrana que presentan tres posibles isoformas, sensibles a Ca^{2+} o a IP_3 . A concentraciones bajas de IP_3 , se encuentra inhibida la liberación del ion calcio, pero ante un aumento de los niveles de IP_3 , este es capaz de unirse al receptor, facilitando la apertura del canal lo que permite la liberación del Ca^{2+} contenido en el RE (Berridge et al., 2003). Además, en algunos estudios se ha observado que el proceso puede

estar influenciado por la concentración citoplasmática del ATP (Leybaert and Sanderson, 2012).

- **Receptores de rianodina (RyR):** son homotetrámeros formados por varias unidades, donde el RyR1 se expresa en el músculo esquelético y otros tejidos, el RyR2 se observa en músculo cardíaco y tejidos no musculares y el RyR3 es común en cerebro, bazo, corazón y testículos, pero debido a que su estructura no está bien dilucidada no se considera una nueva isoforma (Leybaert and Sanderson, 2012).

Estos dos tipos de receptores no se distribuyen uniformemente sobre la superficie del RE, sino que forman clústeres mezclados que constituyen un sistema de retroalimentación positivo denominado Calcium Induced Calcium Release (CICR), que permite que incrementos en la $[Ca^{2+}]_c$ por apertura de los IP₃R activen a su vez a los RyRs (Berridge et al., 2003; Leybaert and Sanderson, 2012).

1.3. Mecanismo de propagación de las señales de calcio

Ante estímulos de diversa índole, las células producen señales transitorias de Ca^{2+} que o bien afectan a la propia célula estimulada o bien se pueden propagar a células vecinas como ondas de calcio (Berridge et al., 2003; Stalmans and Himpens, 1999). Dichas ondas de Ca^{2+} pueden propagarse tanto por dentro de las células como externamente, existiendo actualmente varios modelos que explican su propagación.

- **Ondas de calcio intracelulares:** se propagan a través del citosol de la célula debido a la excitabilidad del calcio presente en el citosol, por lo que un incremento transitorio de la concentración de calcio citosólico ($[Ca^{2+}]_c$) puede amplificarse e iniciar el mecanismo de CICR (Leybaert and Sanderson, 2012).
- **Ondas de calcio intercelulares:** se han estudiado en diversos tejidos y órganos, como el cerebro, el hígado, el tejido vascular, la cóclea y la retina, y en múltiples tipos celulares como, por ejemplo, cardiomiocitos, hepatocitos, osteocitos, queratinocitos, células epiteliales, etc.

En todos los casos se observa la propagación radial, desde el foco en el que se habían originado, de los incrementos de la concentración de calcio intercelular ($[Ca^{2+}]_{intercelular}$), adquiriendo una magnitud que depende tanto de la naturaleza como de la fuerza del estímulo inicial y donde parece ser el mecanismo fundamental para la coordinación de respuestas multicelulares; a pesar de que se desconoce en la actualidad cómo se propagan estas ondas de calcio intercelulares, algunas de las hipótesis que se barajan establecen que el mecanismo es mixto, combinando la propagación interna a través de uniones estrechas con la propagación externa mediada por una señalización paracrina (Leybaert and Sanderson, 2012; Pearson et al., 2005; Stalmans and Himpens, 1999):

- **Uniones estrechas o gap-junction:** son canales transmembrana que conectan el citoplasma de dos células adyacentes, proporcionando un camino de difusión para sustancias de entre 1000 – 1500 Da denominado conexón y formado por 6

conexinas. Hay dudas de si la molécula mensajera es el Ca^{2+} o el IP_3 , pues el Ca^{2+} se encuentra fuertemente amortiguado por el citoplasma dando lugar a un movimiento más lento y restringido que sólo se compensa aumentando el número de gap-junction, mientras que el IP_3 puede pasar de célula a célula estimulando al IP_3R con su unión a él y activando el mecanismo de CICR que provoca un incremento aún mayor de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (

- **Figura 1).**

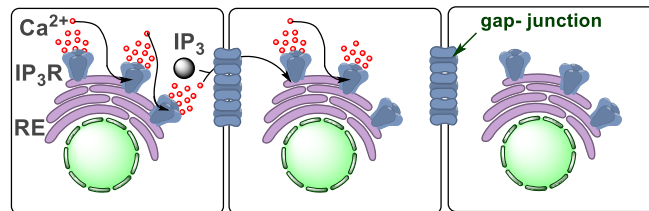


Figura 1. Mecanismo de propagación de la onda de calcio intercelular vía gap-junction, donde bien el Ca^{2+} o el IP_3 se desplaza a través del conexón promoviendo la liberación de Ca^{2+} reticular de la célula adyacente.

- **Vía de señalización paracrina a través de mensajeros extracelulares:** la molécula señalizadora es liberada por la célula al espacio extracelular, donde se une a los receptores de membrana de la célula vecina y provoca un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (
- **Figura 2).** Además, estudios previos realizados sobre células epiteliales, endoteliales, osteocitos, hepatocitos, células de epitelio pigmentario retiniano, etc. han demostrado la presencia de ATP transportado por vesículas y la participación de receptores purinérgicos P2 tanto de tipo metabotrópico (P2X) constituidos por canales permeables al ion calcio, donde el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que perciben depende de la concentración de calcio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_E$), como de tipo ionotrópico (P2Y) que son proteínas G acopladas que activan la fosfolipasa C, promotora de la generación de IP_3 que se une a los IP_3R ubicados en el RE, provocando la liberación de calcio (Leybaert and Sanderson, 2012; Peterson et al., 1997; Reigada and Mitchell, 2005; Ryu et al., 2010).

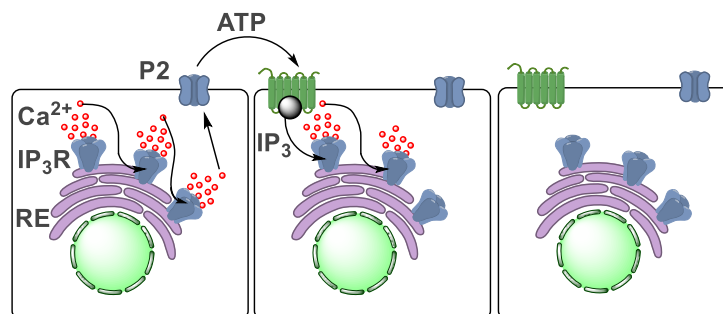


Figura 2. Mecanismo de propagación de la onda de calcio intercelular vía paracrina, donde la liberación de ATP al espacio extracelular favorece la unión a su receptor, promoviendo la generación de IP_3 que se une al IP_3R , produciendo la liberación de calcio reticular.

Por último, cabe destacar algunos estudios que revelan que las ondas de calcio intercelulares pueden desencadenarse espontáneamente en células de epitelio pigmentario retiniano *in vitro* e *in vivo*, en secciones de neocórtex de cerebro, en células de la glía de Bergmann y en astrocitos *in vivo* (Catsicas et al., 1998; Leybaert and Sanderson, 2012; Syed et al., 2004).

1.4. Células de epitelio pigmentario retiniano

Como previamente se ha comentado, algunos tipos celulares presentan un patrón de señales de calcio complejo basado en ondas de calcio intercelulares, cuyo mecanismo no está totalmente elucidado, aunque se cree que el RE participa y es necesario para su propagación. Uno de esos tipos celulares es el epitelio pigmentario retiniano humano (EPR) (Abu Khamidakh et al., 2013), concretamente la línea celular ARPE-19, empleada en el presente proyecto para abordar la contribución del RE a la propagación de dicha onda de calcio intercelular iniciada al aplicar directamente estimulación mecánica, permitiendo registrar de modo simultáneo a través de técnicas de imagen de microfluorimetría las señales procedentes de las ondas de calcio citosólica y del RE generadas, pues se siguen los cambios de fluorescencia gracias a la incorporación del indicador citosólico Fura-2AM y del indicador proteico dirigido al RE, GAP3.7.

El EPR es una monocapa celular polarizada localizada, en el caso de vertebrados, en el ojo entre la retina y la coroides (Lehmann et al., 2014), estando su parte apical en contacto con los fotorreceptores necesarios para llevar a cabo el proceso visual y su lado baso-lateral en contacto con los capilares de la coroides, donde se encuentra la membrana de Bruch (Bonilha, 2014; Zhao et al., 1997). Debido a que constituye la barrera hemato-retiniana, presenta funciones especializadas (Adijanto and Philp, 2014; Pfeffer and Philp, 2014; Rizzolo, 2014) como el transporte de iones, agua y metabolitos, la regulación de la composición del espacio sub-retiniano, el mantenimiento del pH ocular y además realiza la fagocitosis de los discos membranosos ubicados en el extremo externo de los fotorreceptores, donde su continua renovación compensa el ambiente oxidante de la retina (Mazzoni et al., 2014; Wittig et al., 2012).

Para el estudio del EPR humano se pueden utilizar cultivos primarios de células de epitelio pigmentario retiniano, pero los globos oculares humanos necesarios son difíciles de obtener y precisan una purificación, por lo que normalmente se usan líneas celulares humanas establecidas fortuitamente, como las líneas D407, hTERT-RPE1 y ARPE-19 (Boulton, 2014; Dunn et al., 1996).

Actualmente como modelo de EPR se utiliza principalmente la línea celular ARPE-19, tanto por su facilidad de manejo y uso experimental en el laboratorio, como por su semejanza con el EPR del que deriva. Dicha línea celular surgió espontáneamente en un laboratorio a partir de un proceso de tripsinización selectiva de un cultivo primario de células de epitelio pigmentario retiniano extraído de los globos oculares de un donante masculino de 19 años sin problemas oculares conocidos. Estas células muestran una elevada morfología de tipo epitelial, con una tasa de proliferación lo suficientemente rápida como para crear una monocapa confluyente que se inhibe por contacto, con elevadas tasas de éxito ante la

transfección y con un cariotipo normal diploide 46 XY (Dunn et al., 1996). Además, se ha descrito que presenta los principales receptores y canales presentes en el EPR, como los canales de calcio sensibles a la dihidropiridina (pertenecientes a canales del subtipo Cav1.3), canales Maxi-K⁺ dependientes del ion calcio, canales de Ca²⁺-ATPasa e intercambiadores de Na⁺/Ca²⁺, canales Orai y canales TRP de la familia canónica (TRPC1 y TRPC4) y vanilloide (TRPV2), etc. (Reichhart and Strauß, 2014).

25 años después del establecimiento de esta línea celular se ha realizado una validación (Pfeffer and Fliesler, 2022) que expresa cuán útil es para la investigación, donde se considera muy práctica por presentar fácil acceso a un módico precio, pero se remarcan varias consideraciones observadas con el tiempo como, por ejemplo, que presenta deficiencias como modelo de epitelio pigmentario retiniano debido a que sólo presenta 74 de los 154 genes característicos de cualquier tipo de epitelio y a que aparecen algunos genes menos expresados de lo normal, como sucede con el transportador basolateral bestrofina-1, las proteínas de melanogénesis y la enzima dopacromo tautomerasa y la molécula de adhesión E-cadherina. También, pese a que en sus orígenes se ha descrito como una línea celular inmortal y estable, han aparecido reducciones graduales de sus telómeros y de su viabilidad tras un elevado número de pases celulares, aparte de deleciones del brazo corto del cromosoma 8, pequeñas adiciones en el brazo largo del cromosoma 19 y casos de aneuploidías en células puntuales, lo que sugiere una cierta inestabilidad genómica.

No obstante, el proyecto no se va a ver afectado pese a las incidencias descritas y se puede considerar un modelo válido porque no se estudia la genómica, sino que se busca analizar la homeostasis del calcio libre y el mecanismo de propagación de ondas de calcio intercelulares originadas mecánicamente en células de EPR que simulan la retina humana y sobre las que se aplican diferentes fármacos y/o drogas que bloquean distintos canales y receptores implicados en la dinámica del ion calcio, y los resultados se podrían comparar en un futuro con los obtenidos en células de EPR humano procedentes de un cultivo primario fresco extraído de los globos oculares de un donante.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el desarrollo de la parte experimental de este proyecto se han utilizado diferentes reactivos (**Tabla 1**) procedentes de diversas casas comerciales y de pureza analítica, por lo que no ha sido necesario realizar purificaciones adicionales.

Tabla 1. Lista de reactivos empleados en el proyecto.

REACTIVO	[STOCK]	[EXPERIMENTOS]	REFERENCIA
Fura-2AM	2 mM	8 – 10 μ M	Molecular Probes™
ATP	0,1 M	100 μ M	Sigma-Aldrich, A3377
TBH	10 mM	10 μ M	Sigma-Aldrich, 112976
EGTA	1 M	0,2 mM	Molecular Probes™
Carbenoxolona	0,162 M	100 μ M	Sigma-Aldrich, C4790
Cafeína	1 mM	2 μ M	Sigma-Aldrich, C0750
Nifedipino	0,049 M	10 μ M	Sigma-Aldrich, N7634–25G
2-APB	-	50 μ M	Calbiochem, 524–95–8
NiCl ₂ · 6H ₂ O	-	5 mM	Merck, 106717

Los cubreobjetos de 12 mm y 18 mm \varnothing han sido autoclavados y manipulados bajo campana de flujo laminar vertical para garantizar su esterilidad; asimismo, el material de plástico y los medios empleados en los cultivos celulares se han abierto y utilizado bajo campana de flujo laminar vertical.

2.1. Cultivo celular

Los experimentos se han realizado sobre un clon estable de la línea celular ARPE-19 (clon 2) que expresa el sensor de calcio dirigido al RE, GAP3.7., desarrollado previamente por el grupo de investigación a partir de un vial de la línea celular humanizada comercial de epitelio pigmentario retiniano, ARPE-19, donado por el IOBA.

Las células se cultivaron en una placa de Petri de 100 mm \varnothing (p100) con Medio de Eagle de mezcla de nutrientes F-12 modificado por Dulbecco DMEM/F-12 (1:1) (1X) + GlutaMAX™ -I (Referencia nº 31331-028; lote 2436618) suplementado con un 10% (vol./vol.) de suero fetal bovino y 1% (vol./vol.) penicilina/estreptomomicina y se conservaron en incubadores a 37°C con una atmósfera al 5% de CO₂.

Los experimentos se realizaron sobre células de los pases 4 al 14, sembradas en cubreobjetos de 12 mm o 18 mm \varnothing revestidos con poli – L – lisina y cultivadas entre 2 – 13 días *in vitro* (DIV) tras llegar el cultivo a confluencia. Además, periódicamente se han realizado revisiones de la fluorescencia de las células de la placa madre para verificar la expresión del sensor de calcio dirigido al RE, GAP3.7.

2.2. Mediciones de calcio

Para el estudio de la onda de calcio generada tras la aplicación de un estímulo mecánico se sembraron células ARPE-19 (clon 2) sobre cubreobjetos de 18 mm Ø, a una densidad celular de 15 000 células/gota 50 µL, se situaron sobre el estativo de un microscopio invertido Nikon Diaphot equipado con un objetivo 20X PlanApoUV (N.A. 0.7; Olympus) y fueron perfundidas con medio extracelular estándar con la siguiente composición: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂·2 H₂O, 1 mM MgCl₂·6 H₂O, 10 mM glucosa y 10 mM HEPES-Na⁺ (pH 7.4); a 22 – 25°C y con una velocidad de flujo de 4 – 6 mL/min.

Para registrar la concentración de calcio en el RE ([Ca²⁺]_{RE}) mediante el sensor ratiométrico GAP, las células se epi-iluminaron alternativamente a 403 nm y 470 nm por medio de los filtros 403/12 DF y 470/25 DF y el espejo dicróico DM500, excitándose la GAP a ambas longitudes de onda y recogiendo la luz emitida por encima de 520 nm (LP520) con una cámara Hamamatsu C4742-98, todo ello controlado mediante el software PCI 6.6 Simple Hamamatsu.

Sin embargo, para el registro simultáneo de la [Ca²⁺]_C y [Ca²⁺]_{RE}, las células ARPE-19 (clon 2) se incubaron durante 1 hora con Fura-2AM (10 µM; Molecular Probes™) en 600 µL de solución extracelular, con agitación y bajo oscuridad, de modo que, transcurrido el tiempo de carga, las células se lavaron abundantemente en solución extracelular. El registro simultáneo se hizo excitando alternativamente las células a 380 nm y 470 nm con los filtros 380/10 DF y 470/25 DF y el espejo dicróico DM500, recogiendo la luz emitida por encima de 510 nm (LP520)

A mayores, se realizaron mediciones de la [Ca²⁺]_{RE} al aplicar estímulos de concentraciones crecientes de ATP sobre células de ARPE-19 (clon 2) sembradas en cubreobjetos de 12 mm Ø, a una densidad celular de 10 000 células/gota 50 µL y situadas sobre el estativo de un microscopio directo Zeiss Axioplan equipado con un objetivo 20X (N.A. 0.5; W-Achroplan, Zeiss), por lo que las células se excitaron secuencialmente a 405 nm y 470 nm y se recogió la fluorescencia emitida por encima de 590 nm (LP590).

2.3. Estimulación mecánica

La estimulación mecánica se llevó a cabo mediante presión directa de una célula en el centro del campo visual del microscopio con un hilo de tungsteno (0,075 mm Ø) afilado por electrólisis. Con el fin de adquirir datos reproducibles, se aplicaron estímulos mecánicos cuya intensidad era capaz de provocar la ruptura de la membrana celular de la célula diana, tal y como está descrito en la literatura (Abu Khamidakh et al., 2013).

2.4. Análisis de datos

Los datos obtenidos se han analizado digitalmente utilizando el programa de análisis de imagen ImageJ, con el que se obtuvo y cuantificó la intensidad media de fluorescencia de las imágenes generadas durante los experimentos. Posteriormente, los datos se analizaron y graficaron mediante el programa de análisis de datos y generación de gráficos OriginPro8.

En los experimentos de la curva dosis-respuesta a ATP, los datos de la dinámica del calcio reticular se expresaron como F_{470}/F_{405} mientras que, en los experimentos de la onda de calcio,

se ha cuantificado la intensidad de la fluorescencia media de 7 capas vecinas concéntricas (“*neighboring*”; NB) determinadas como ROIs (*Regions Of Interest*) en forma de anillos concéntricos de 17,18 micras de ancho y cuyo origen es la célula estimulada mecánicamente: los datos de la dinámica del calcio reticular se expresaron como F_{470}/F_{403} y en los experimentos, puesto que se realizaron mediciones simultáneas de la $[Ca^{2+}]_C$ y $[Ca^{2+}]_{RE}$, se ha representado la normalización de la intensidad de fluorescencia media como F_0/F en el caso del citosol y como $(F-F_{Min})/(F_0-F_{Min})$ para el RE; se considera F_0 a la fluorescencia del estado basal calculada como el promedio del valor de los 10 primeros fotogramas y F_{Min} es la fluorescencia al depletar de Ca^{2+} el RE, calculada como la media de los 10 últimos fotogramas.

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media de la medida experimental \pm error estándar.

3. RESULTADOS

3.1. Efecto del ATP extracelular sobre la dinámica del calcio reticular

La línea celular ARPE-19 es utilizada en investigación como modelo de EPR por su semejanza con el epitelio pigmentario retiniano humano (Dunn et al., 1996; Klettner, 2020; Samuel et al., 2017), donde estudios previos han demostrado la presencia de ondas de calcio que se transmiten de célula a célula, cuando estas células se estimulan mecánicamente (Abu Khamidakh et al., 2013). Se ha descrito que la propagación de la onda de calcio puede realizarse tanto mediante “gap-junction” como por vía paracrina, con el ATP como molécula señalizadora a través de receptores purinérgicos y con contribución del Ca^{2+} liberado de depósitos intracelulares vía liberación de IP_3 , sin embargo, hay controversia tanto sobre el papel de las “gap-junction” como de los depósitos de Ca^{2+} intracelular en la génesis y transmisión de esas ondas de calcio intercelulares (Peterson et al., 1997; Ryu et al., 2010).

Usando un clon estable de la línea ARPE-19 que expresa el sensor de Ca^{2+} GAP3 en el RE, previamente creado en nuestro grupo (clon 2), se comprobó que dicha línea celular expresa receptores purinérgicos funcionales cuya activación por ATP producía la liberación de Ca^{2+} del RE. Para ello se estimularon las células con ATP y se registró la liberación de Ca^{2+} del RE.

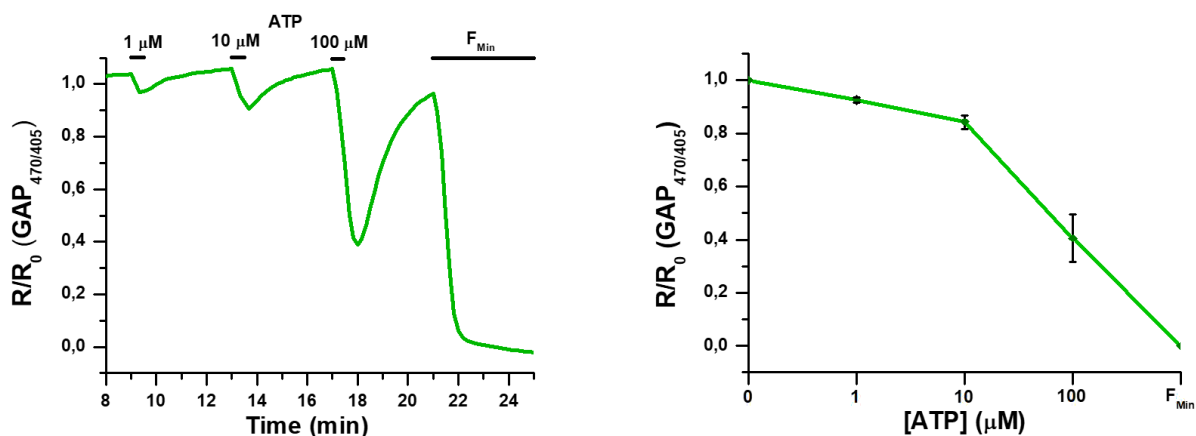


Figura 3. Curva dosis-respuesta obtenida tras la aplicación, durante 30 segundos, del agonista ATP de 1 a 100 μM ($n=4$).

Como muestra la **Figura 3**, las células respondieron de manera dosis-dependiente a la estimulación con ATP, de tal manera que al ATP a 1 μM apenas liberó Ca^{2+} del RE y a 100 μM produjo una liberación de más del 50% del Ca^{2+} reticular.

3.2. Ondas de calcio intercelulares generadas mediante estimulación mecánica

Es conocido que múltiples tipos celulares como cardiomiocitos, hepatocitos, osteocitos, células endoteliales, etc. presentan ondas de calcio que se propagan intercelularmente (Leybaert and Sanderson, 2012; Stalmans and Himpens, 1999) por mecanismos no del todo

descritos, pero en los que se valoran las contribuciones parciales o totales del Ca^{2+} reticular como segundo mensajero. Debido a la dificultad que presenta la realización de mediciones directas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$, tradicionalmente estos datos se han generado de modo indirecto a partir de medidas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$, sin embargo, gracias a la tecnología disponible en este grupo de investigación y al desarrollo del clon estable de la línea celular ARPE-19 que expresa el sensor de calcio reticular, se puede evaluar de modo directo y simultáneo las dinámicas del calcio citosólico y reticular tras la aplicación de un estímulo mecánico sobre cultivos confluentes y en monocapa.

Para el estudio de la onda de Ca^{2+} intercelular se sembraron las células y se realizaron los experimentos tras 4 – 6 días *in vitro* (DIV) cuando el cultivo estaba confluyente y estaban conectadas unas células con otras mediante conexinas (Abu Khamidakh et al., 2013). Con objeto de estudiar la onda de Ca^{2+} en función de la distancia, se delimitaron una serie de regiones de interés (ROIs) en las que se midieron los cambios en las señales citosólicas y reticulares.

La cuantificación de los valores de fluorescencia se realizó delimitando 7 anillos concéntricos formados por células vecinas denominadas NB1 – NB7, como se observa en la **Figura 4A**.

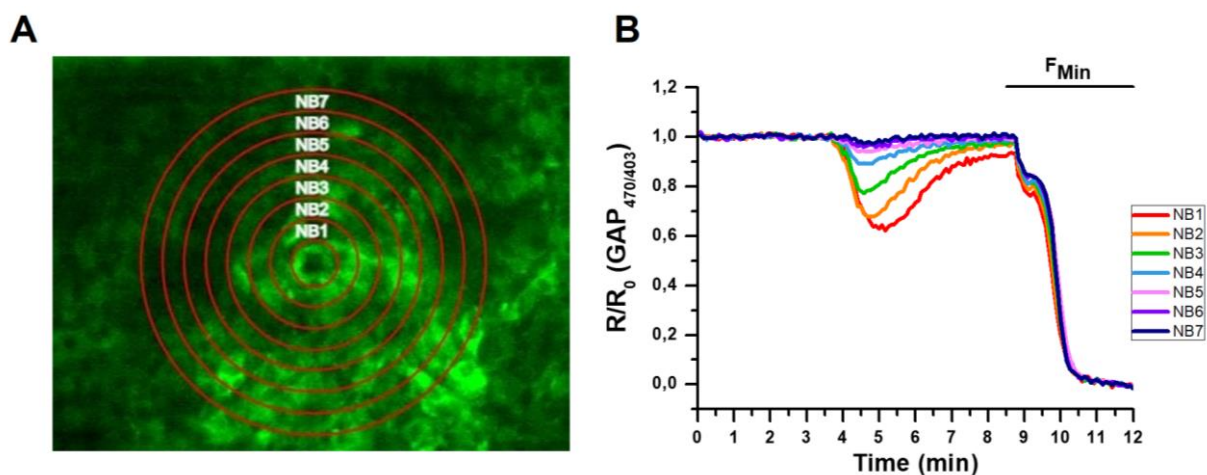


Figura 4. A) Imagen de células ARPE-19 en cultivo mostrando los ROIs utilizados en los análisis, donde NBx hace alusión al número de la capa que se está estudiando. B) Liberación de Ca^{2+} del retículo tras la estimulación mecánica en las células ARPE-19 (Clon 2) ($n=2$).

Tras la estimulación mecánica de las células se generó tanto una onda de elevación de Ca^{2+} citosólico como una de liberación de Ca^{2+} reticular.

Como se observa en la **Figura 4B**, la liberación de Ca^{2+} reticular fue mucho más intensa en las capas celulares más cercanas al punto de estimulación (con un pico de liberación en torno al 40% del contenido de Ca^{2+} total del retículo), y esta liberación disminuía conforme las células estaban más alejadas del punto de estimulación.

Al realizarse los experimentos registrando simultáneamente la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ a 470 nm y la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{c}}$ a 380 nm (mediante el indicador citosólico Fura-2AM), se observó que al igual que con el Ca^{2+} reticular, la señal de Ca^{2+} citosólico tras la estimulación era más alta en las capas más cercanas al estímulo y esta señal disminuía conforme las células estaban más alejadas del origen del estímulo (**Figura 5**). Además, se observó un desfase entre ambas ondas de Ca^{2+} ,

citósica y reticular (**Figura 5A**), a pesar de que ambas ondas se originaban a la vez (**Figura 5C**), de tal manera que la velocidad de la onda citósica era de $1,43 \mu\text{m/s}$ y la de la onda reticular era de $0,41 \mu\text{m/s}$.

En la **Figura 5B** se representan los picos de intensidad máxima de la onda de Ca^{2+} citósica y reticular para cada capa NB. Como puede observarse, la intensidad máxima de la onda de calcio tanto citósica como reticular va disminuyendo conforme se extiende la onda de calcio desde la capa más cercana a la más lejana del punto de origen.

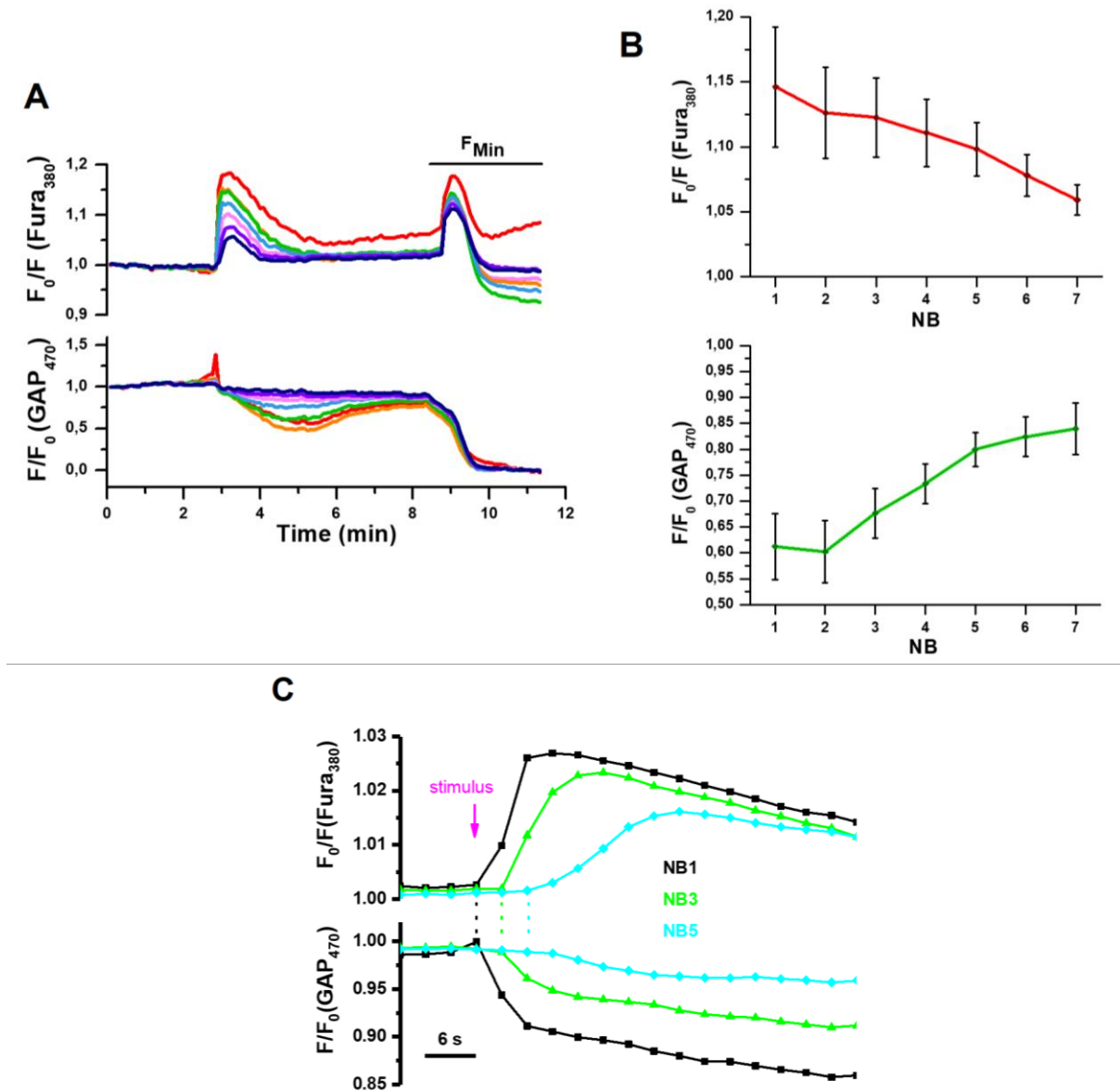


Figura 5. Dinámica del calcio citosólico y reticular en células de ARPE-19 tras la estimulación mecánica ($n=5$). A) Registro simultáneo de la liberación de Ca^{2+} en citosol (Fura-2AM) y retículo (GAP3), donde se aprecia el desfase temporal de ambas ondas. B) Picos de intensidad máxima de la onda de Ca^{2+} citosólica (color rojo) y reticular (color verde). C) Registro con alta adquisición temporal donde se observa el inicio simultáneo de la onda de calcio en citosol y RE.

3.3. Origen y propagación de la onda de calcio intercelular

Como se aprecia en los resultados mostrados anteriormente, la aplicación de un estímulo mecánico sobre células de la línea ARPE-19 generó una onda de calcio intercelular que conduce al incremento rápido de la $[Ca^{2+}]_c$, que puede estar originado por la entrada de calcio del medio extracelular, la liberación de calcio de depósitos subcelulares, o ambos.

Con objeto de determinar el origen de la onda de calcio y la contribución del retículo a la misma, se empleó una batería de inhibidores de receptores y canales implicados en la señalización del Ca^{2+} intracelular.

En estudios previos del laboratorio se demostró que los receptores purinérgicos presentes en las células ARPE-19 estaban implicados en la generación de la onda de Ca^{2+} , pero en dichas células están presentes tanto receptores de tipo P2Y (acoplados a proteínas G) como de tipo P2X (canales iónicos de membrana).

Para determinar si la liberación de Ca^{2+} reticular estaba implicada en la generación de la onda de Ca^{2+} intercelular, se estudió si la estimulación mecánica en presencia de un medio extracelular libre de Ca^{2+} era capaz de inducir ondas de Ca^{2+} . Como puede observarse en la **Figura 6**, en ausencia de Ca^{2+} todavía se inducían las ondas de Ca^{2+} tanto citosólica como reticular, aunque en el caso de la señal citosólica su señal máxima de NB1 a NB7 disminuyó con respecto al control (NB1: $1,08 \pm 0,04$), pero la liberación de calcio del retículo fue mayor (NB1: $0,4 \pm 0,03$). Además, curiosamente en el caso del retículo la liberación de Ca^{2+} no se recuperaba como en el control.

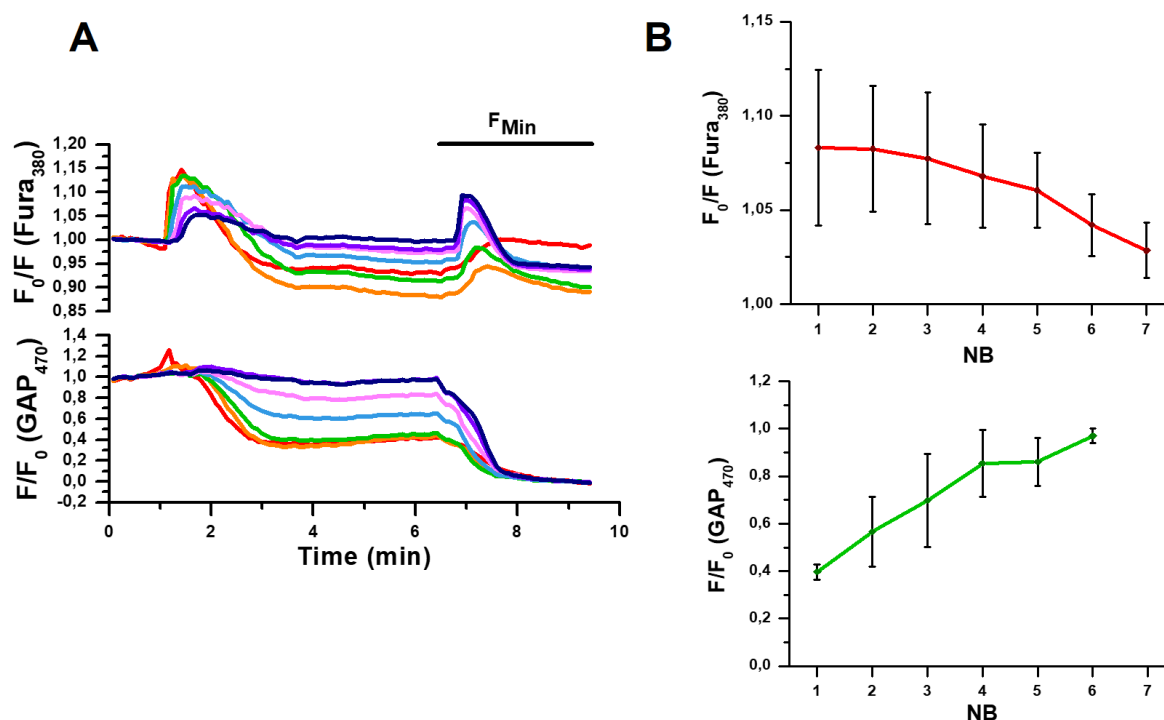


Figura 6. Dinámica del Ca^{2+} en citosol y retículo en células de ARPE-19 tras la aplicación, durante 10 minutos, de MEC 0 Ca^{2+} /EGTA (0,2 mM) ($n=3$). Se observó que la onda de calcio intercelular se inducía en ambos compartimentos celulares, donde la señal citosólica disminuyó con respecto al control y la señal reticular fue mayor que dicho control.

Se considera que la célula estimulada libera al espacio extracelular una molécula señalizadora que se une al receptor de membrana de la célula adyacente, desencadenando una respuesta que puede ser la entrada de calcio del medio extracelular o la liberación del calcio reticular, donde ambas posibilidades producen el incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ (Peterson et al., 1997).

En la membrana del retículo endoplásmico hay dos tipos de receptores implicados en la liberación de Ca^{2+} desde dicho depósito, los receptores de IP_3 y los receptores de rianodina. Para averiguar la implicación de dichos receptores en la onda de calcio se estudió la onda de calcio tras el estímulo mecánico en presencia de 2-APB que inhibe los receptores de IP_3 (Wimmers and Strauss, 2007) y en presencia de bajas concentraciones de cafeína con objeto de estimular los receptores de rianodina (Wimmers et al., 2008).

Como se observa en la **Figura 7**, la estimulación mecánica en presencia de una concentración 2 μM de cafeína inhibió la liberación de calcio del retículo y la señal de calcio citosólica cuando se compara con el control. Además, la respuesta reticular sólo alcanzó hasta la quinta capa (NB5) y, en cuanto a la respuesta citosólica, curiosamente en las capas NB2 a NB5 el pico máximo fue mayor que en la NB1, a diferencia de las respuestas control donde el pico de la respuesta citosólica iba disminuyendo capa a capa.

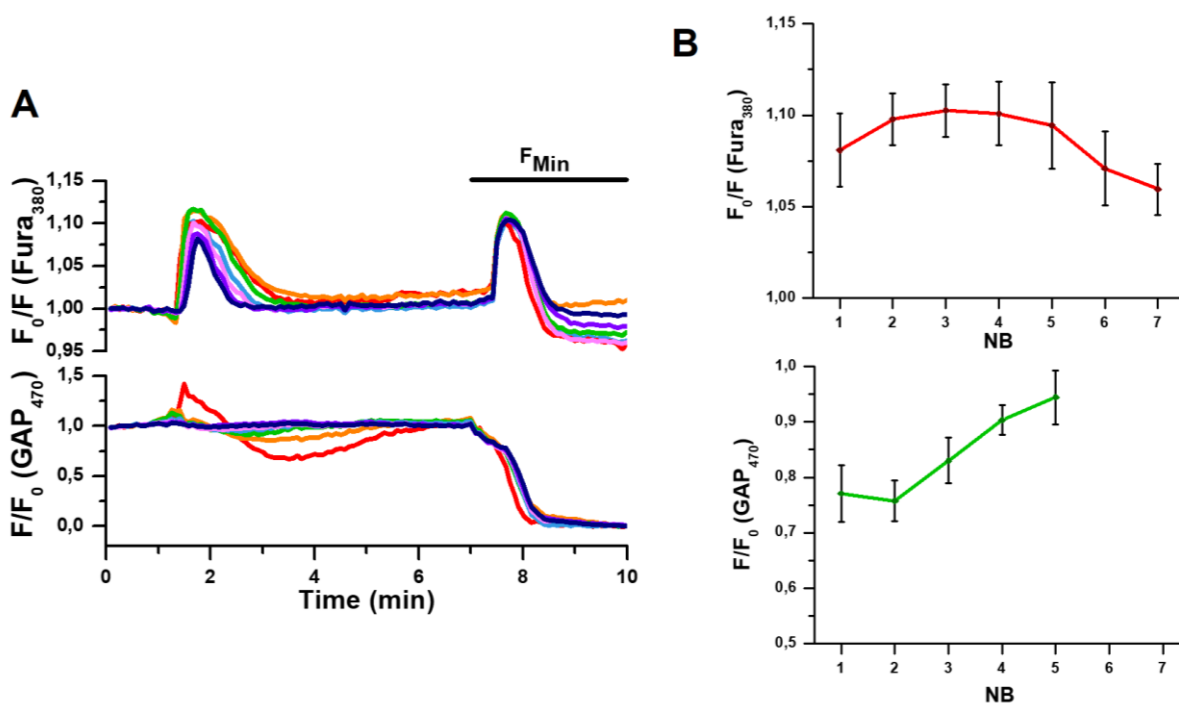


Figura 7. Registro simultáneo de la dinámica de Ca^{2+} en el citosol y el RE en células de ARPE-19 tras someter a las células a 10 minutos de perfusión con cafeína 2 μM , responsable de potencial los receptores de rianodina ubicados en la membrana del retículo endoplásmico ($n=5$). Se observó que la respuesta citosólica de las capas NB2 a NB5 es menor que la obtenida con el control, sin embargo, la respuesta del retículo es mayor que la de dicho control y sólo alcanza hasta la capa NB5.

En cuanto a los experimentos en presencia de 2-APB ($50 \mu\text{M}$), los datos representados en la **Figura 8** muestran que este inhibidor de los receptores de IP_3 apenas alteraba la señal de calcio citosólico generada respecto del control. Sin embargo, este tratamiento produjo a nivel del retículo un profundo cambio en la respuesta tras la estimulación mecánica de tal manera que no sólo provocó una mayor liberación de calcio de esta organela sino que posteriormente se indujo un intenso rellenado del depósito (NB1: $0,51 \pm 0,1$; NB2: $0,37 \pm 0,09$; NB7: $0,63 \pm 0,2$)

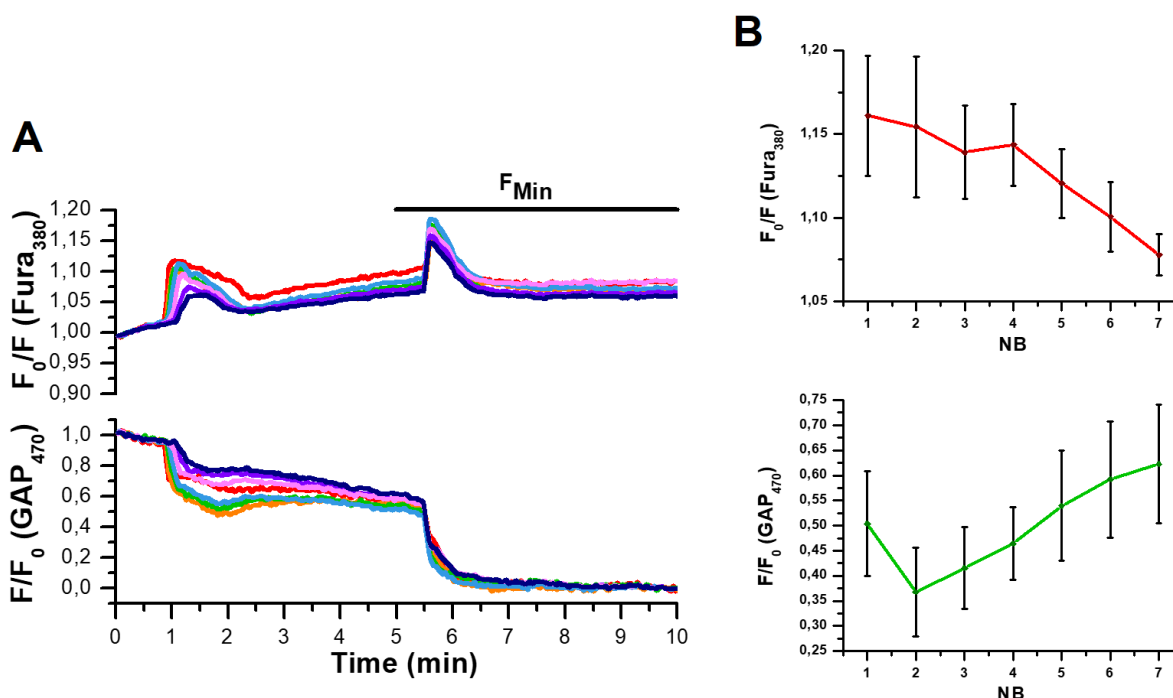


Figura 8. Dinámica del Ca^{2+} tanto citosólico como reticular obtenida en células ARPE-19 tras la aplicación de 10 minutos de 2-APB a una concentración de $50 \mu\text{M}$ ($n=2$) con objeto de que el tratamiento bloqueara los receptores de IP_3 del retículo endoplásmico.

Las células ARPE-19 presentan canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes en su membrana plasmática que podrían estar implicados en la generación de la onda de Ca^{2+} intercelular. Para averiguar su posible implicación en dicha onda de Ca^{2+} se utilizaron dos antagonistas de los mismos, el nifedipino, un antagonista de los canales de Ca^{2+} de tipo L, (Busch et al., 2023; Tapias et al., 2023) y el cloruro de níquel (NiCl_2) que antagoniza los canales iónicos en general (A.G.García, 1995; Gorji et al., 2000).

Como puede observarse en la **Figura 9**, el nifedipino bloqueó la respuesta de calcio citosólico mientras que el NiCl_2 no (**Figura 10**). En cuanto al nivel de respuesta del retículo, en ambos casos las respuestas fueron similares al control, aunque en el caso del NiCl_2 no hubo rellenado del retículo tras la liberación inicial inducida por el estímulo mecánico.

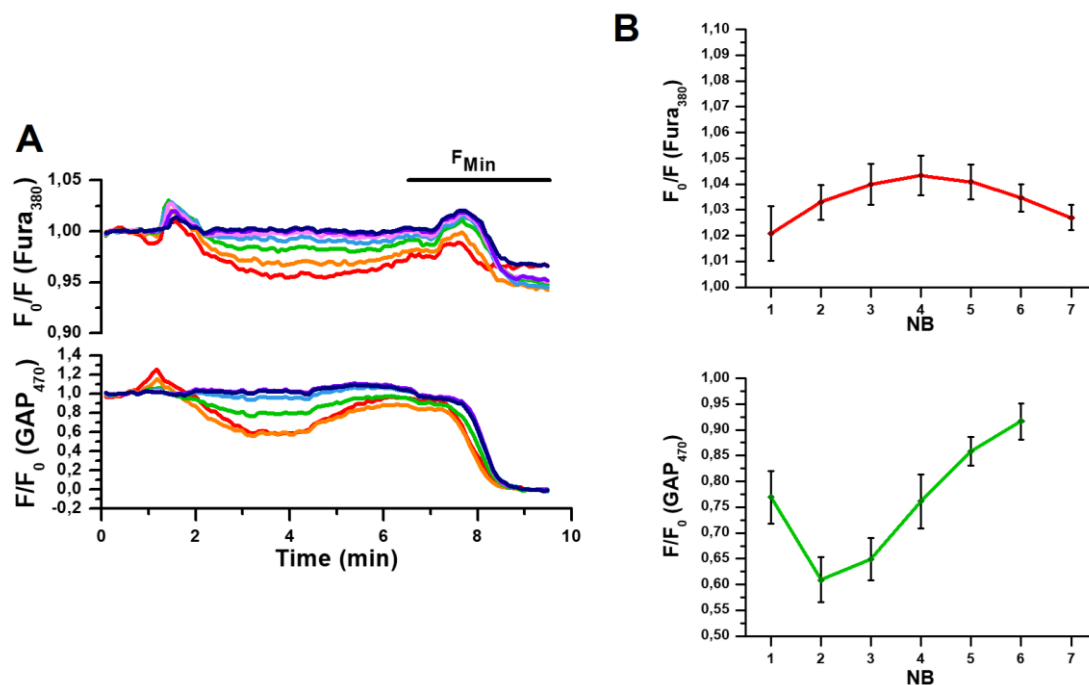


Figura 9. Registro simultáneo de la dinámica del Ca^{2+} tanto en citosol como en retículo endoplásmico tras someter a las células de la línea ARPE-19 a una perfusión, durante 10 minutos, con nifedipino $10 \mu M$ con el fin de bloquear los canales voltaje-dependientes de tipo L presentes en la membrana plasmática ($n=6$). Las respuestas obtenidas son similares a las del caso control.

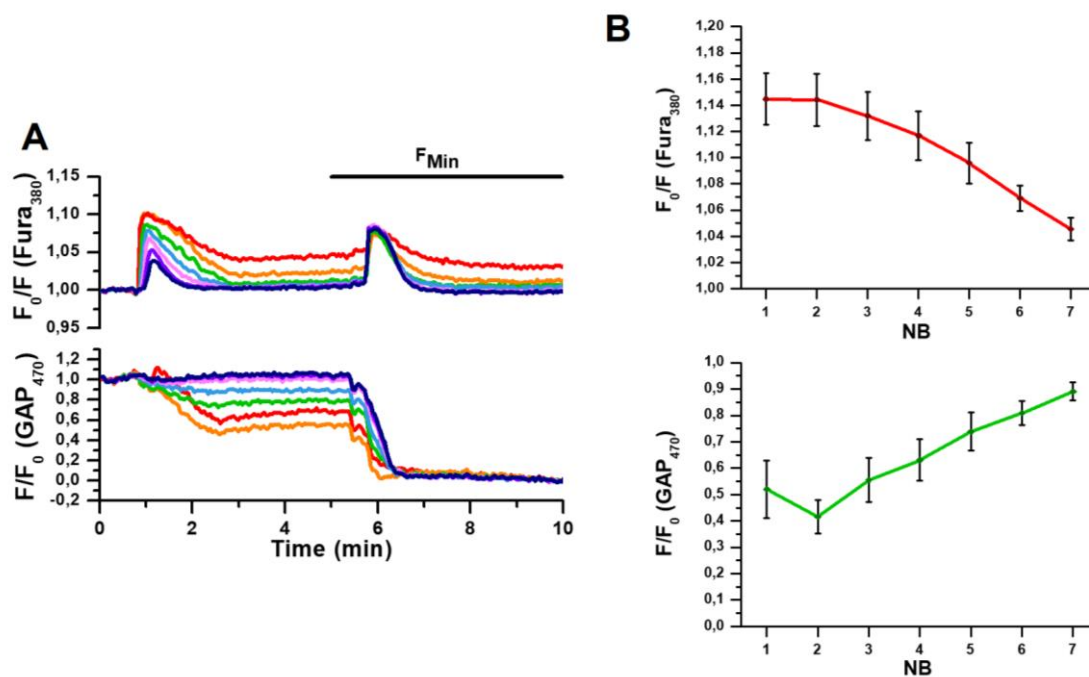


Figura 10. Dinámica del calcio citosólico y reticular en células ARPE 19 incubadas durante un periodo de entre 5– 10 minutos con $NiCl_2$ ($5 mM$); el tratamiento inhibe de manera general los canales de tipo iónicos ($n=6$) y la respuesta observada es parecida a la del control, salvo por que no aparece relleno del retículo endoplásmico tras alcanzar el punto de máximo vaciamiento.

3.3.1. Propagación de la onda de calcio vía gap-junction:

Estudios previos en la literatura sugieren que la onda de Ca^{2+} intercelular presente en las células ARPE-19 se transmite, al menos parcialmente, a través de uniones célula a célula del tipo gap-junction a través de las cuales moléculas como el Ca^{2+} o el IP_3 pasarían de una a otra promoviendo el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y, por lo tanto, la propagación de la onda de calcio intercelular (Akanuma et al., 2018; Kim et al., 2022). Para confirmar esto, se realizaron experimentos ($n=5$) en presencia de carbenoxolona a $100 \mu\text{M}$ durante una hora, debido a que es un conocido bloqueante de las gap-junction, en los que se observó un bloqueo total tanto de la onda de calcio citosólica como de la liberación de calcio del retículo (**Figura 11**).

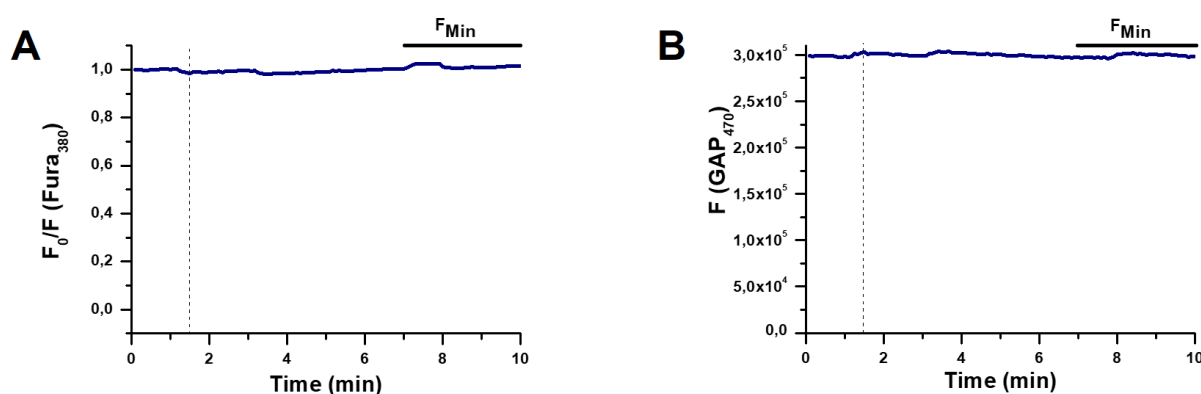


Figura 11. A) Registro normalizado de la fluorescencia en el citosol, donde no se aprecia respuesta alguna ante la estimulación mecánica. B) Cuentas totales de la fluorescencia registrada en el retículo endoplásmico, donde al igual que en el citosol, se observó que no había respuesta.

Para confirmar que el efecto observado en la onda de calcio se debía a la inhibición de las uniones estrechas y no a la depleción de calcio del retículo, se realizaron registros temporales midiendo la dinámica del calcio del retículo endoplásmico en perfusión constante de esta sustancia. Los experimentos mostraron que la carbenoxolona era capaz de depletar completamente el calcio del retículo en unos 12 – 15 minutos (**Figura 12**).

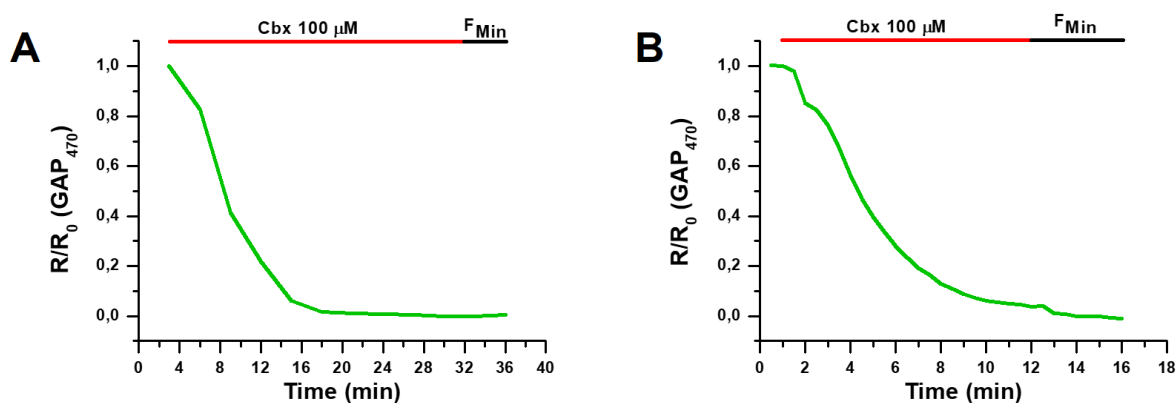


Figura 12. Curso temporal de la liberación de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico. A) Registro a 36 minutos. B) Registro a 16 minutos.

4. DISCUSIÓN

La célula es la unidad básica de todos los seres vivos y desde que se produce su diferenciación en la embriogénesis va a tener designadas una localización y función, pero las células no se comportan como entidades aisladas, sino que interaccionan entre sí y con el medio que las rodea, creando complejos sistemas perfectamente coordinados y comunicados gracias a la presencia de los segundos mensajeros, donde cabe destacar al ion calcio, muy importante en la regulación de procesos fisiológicos tales como la contracción muscular, la exocitosis de neurotransmisores en las neuronas, la secreción hormonal en células endocrinas, etc (Baird, 2011; Shkempi and Huppertz, 2022).

Como el grupo de investigación con el que he tenido la oportunidad de trabajar está especializado en el estudio de las dinámicas intracelulares del ion calcio, se ha estudiado el mecanismo de comunicación celular basado en ondas de calcio intercelulares, que son aquellas ondas que difunden de célula a célula, cuyo mecanismo de propagación no está totalmente elucidado. A lo largo de este proyecto se ha mencionado que estas ondas de calcio están presentes en numerosos tipos celulares, pero para la realización de este estudio nos hemos centrado en la línea celular ARPE-19, un conocido y ampliamente utilizado modelo de epitelio pigmentario de retina humana sobre el que se ha realizado un estudio simultáneo de las dinámicas del calcio citosólico (mediante el sensor químico Fura-2AM) y reticular (mediante la GAP3.7., sensor proteico codificado genéticamente y desarrollado por el grupo de investigación) con objeto de estudiar la comunicación intercelular vía ondas de Ca^{2+} inducidas por estimulación mecánica y, dado que en la literatura se ha sugerido previamente que dichas ondas de calcio se transmiten tanto por vía paracrina como a través de gap-junction, en este Trabajo fin de Máster se ha estudiado la implicación de ambas vías en la génesis y transmisión de dicha onda de Ca^{2+} intercelular.

Las curvas dosis-respuesta al ATP realizadas inicialmente verifican que las células en cultivo confluyente son funcionales y presentan receptores purinérgicos, probablemente del tipo P2Y_1 y/o P2Y_{12} descritos previamente en las células ARPE-19 WT (Tovell and Sanderson, 2008), y probablemente implicados en la onda de Ca^{2+} intercelular como ha sido sugerido por otros autores (Ryu et al., 2010). En cuanto a la posible presencia de receptores ionotrópicos del tipo P2X en este tipo celular, su presencia se descartó puesto que en otros trabajos han descartado la implicación de este tipo de receptores en la onda de Ca^{2+} inducida por estimulación mecánica en estas células (Ryu et al., 2010).

En nuestras manos la estimulación mecánica de estas células produjo ondas de calcio que se extendían al menos hasta un máximo de 7 capas celulares (NB1 a NB7) con potentes respuestas citosólicas y reticulares en todas sus capas, siendo más discretas de media en las capas más alejadas, aunque con respuestas cinéticas diferentes en el citosol y en el RE: se produjo un incremento radial de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ cuya intensidad de respuesta disminuyó de manera directamente proporcional a la distancia a la que se encontraba situada la capa estudiada respecto del punto de estimulación; en el RE la respuesta fue similar, sin embargo se observó un desfase temporal entre la onda citosólica y reticular, siendo la onda citosólica más rápida que la reticular a pesar de que ambas se originaban a la vez (Figura 5), estando esta situación generada porque en el retículo, la rápida liberación inicial del calcio que contiene tras el estímulo va seguido de un vaciado prolongado en el tiempo, de tal manera que mientras el

citosol ha recuperado su nivel basal (debido a la rápida y efectiva acción de los mecanismos de extrusión del calcio citosólico celular por medio de la mitocondria y las bombas de calcio tanto citosólicas como reticulares que devuelven el calcio citosólico a sus niveles basales rápidamente), el RE continua liberando calcio durante un tiempo prolongado, generando ese desfase entre una y otra respuesta.

La estimulación mecánica de las células en un medio extracelular libre de iones calcio (con EGTA como quelante del calcio libre que pudiera estar presente en el medio extracelular), no anuló la onda de calcio citosólica obtenida (Figura 6), pero la señal citosólica generada disminuyó con respecto al control, de NB1 a NB7, indicando que probablemente parte de la onda de calcio citosólica está generada por la entrada de calcio desde el exterior celular. En cuanto a la liberación de calcio del retículo, este fue paradójicamente mayor que en los controles y curiosamente la concentración de calcio en el RE no se recuperó como en dichos controles, probablemente debido a la inhibición de la entrada de calcio desde el exterior, seguramente causado por la inhibición del mecanismo de SOCE.

La presencia de onda de calcio en ausencia de calcio extracelular claramente indica que la liberación de calcio del RE es importante en la génesis y transmisión de la onda de calcio intercelular. A este respecto hay dos canales de calcio en el RE que podrían estar involucrados en ello, los receptores de rianodina y los receptores de IP_3 . Teniendo en cuenta que se ha descrito en la literatura que el ATP vía receptores purinérgicos de tipo metabotrópico está implicado en la génesis de esta onda de calcio extracelular, esperaríamos que al menos los receptores de IP_3 estuvieran implicados en la génesis y transmisión de la onda de calcio (Leybaert and Sanderson, 2012).

Como se puede observar en la Figura 8, al bloquear los receptores de IP_3 con 2-APB apenas hubo cambios en las respuestas citosólicas y reticulares, como cabría esperar si este fuera el principal mecanismo generador de la onda de calcio, lo que sugiere que probablemente otros receptores/canales del retículo están implicados en la onda de calcio intercelular. Por otra parte, la estimulación de los receptores de rianodina con bajas concentraciones de cafeína durante la estimulación mecánica de estas células inhibió tanto la magnitud de la onda de calcio citosólica como la liberación de calcio reticular, llegando esta última tan sólo a la quinta capa, sugiriendo un papel de los receptores de rianodina en la onda de calcio intercelular.

La posible implicación en la onda de calcio intercelular de calcio procedente desde el exterior celular nos indujo a buscar un posible canal iónico que pudiera estar implicado. En estas células está descrita la presencia de canales de calcio voltaje-dependientes (Reichhart and Strauß, 2014), por lo que es de esperar que su bloqueo afecte a la onda de calcio intercelular. En los datos mostrados en la Figura 9, donde se usó nifedipino como bloqueante de los canales de calcio de tipo L, se observa que este antagonista específico de dichos canales de calcio de tipo L bloqueó la respuesta citosólica inducida por estimulación mecánica, sin afectar a la respuesta del retículo, lo que claramente sugiere una implicación de estos canales en la onda de calcio intercelular. Por otro lado, cuando se empleó $NiCl_2$, que antagoniza los canales iónicos en general, no se observó un bloqueo en la respuesta citosólica ni tampoco del retículo, aunque en este último caso, tras la liberación de calcio del RE, este no recuperó sus niveles iniciales, sugiriendo un bloqueo de su relleno por SOCE.

Estudios previos indican que la transmisión de la onda de calcio intercelular es, al menos parcialmente, a través de uniones célula a célula del tipo gap-junction (Stalmans and Himpens,

1999) a través de las cuales moléculas como el Ca^{2+} o el IP_3 pasarían de una a otra promoviendo el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y, por lo tanto, la propagación de la onda de calcio intercelular (Wimmers and Strauss, 2007; Wittig et al., 2012).

En este sentido se realizaron experimentos bloqueando dichas uniones intercelulares para comprobar la posible propagación de la onda de calcio vía gap-junction. Tal y como refleja la Figura 11, la estimulación mecánica de las células en presencia de carbenoxolona a una concentración $100 \mu\text{M}$ durante una hora bloqueó completamente la onda de calcio intercelular, tanto a nivel citosólico como de liberación de calcio del retículo, mientras que en incubaciones de 10 minutos, el bloqueo fue parcial (datos nos mostrados, $n=7$). Estos datos, en su conjunto, nos llevaron a pensar en un posible efecto de la droga sobre los niveles de calcio del retículo que pudieran explicar esos datos.

Para confirmar esto último se realizaron experimentos donde se registró a lo largo del tiempo los niveles de calcio del retículo al perfundir de modo constante la droga sobre las células. Como puede apreciarse en la Figura 12, la carbenoxolona depleta completamente el calcio del RE en unos 12 – 15 minutos, lo que explica que en incubaciones de la droga de más de 15 minutos, el RE esté vacío de calcio y se inhiba completamente la onda de calcio intercelular. Además, estos datos indican un papel preponderante del RE en la génesis y propagación de la onda de calcio intercelular en las células ARPE-19.

5. CONCLUSIONES

1. Se confirma la existencia de una **onda intercelular de Ca^{2+} citosólica** desencadenada por un estímulo mecánico en el modelo epitelial de células ARPE-19. Esta onda está producida por el transitorio de Ca^{2+} citosólico que va viajando de capa a capa celular y es consecuencia de la liberación sincrónica, rápida y reversible del Ca^{2+} del RE.
2. De forma coordinada pero retrasada a la onda de Ca^{2+} citosólica existe **una onda de vaciamiento del Ca^{2+} en el RE**, que se propaga más lentamente que aquella hasta un máximo de 7 capas celulares. Esta onda comienza cuando el citosol ya ha recuperado su nivel basal de calcio tras la onda de Ca^{2+} citosólica.
3. **Ni la onda citosólica ni la del RE dependen del Ca^{2+} extracelular**, ya que ni eliminación del mismo ni la adición de níquel, un inhibidor específico de los canales de Ca^{2+} de la membrana plasmática, las inhiben. Sin embargo, el calcio extracelular es necesario para el mantenimiento del nivel del Ca^{2+} en el RE, puesto que su eliminación o el bloqueo de la entrada provocan una alteración del patrón de la onda de liberación del Ca^{2+} del RE, que se vacía progresivamente y no retorna a sus niveles de llenado basales.
4. **El inhibidor de las uniones estrechas carbenoxolona produce un vaciamiento del calcio del RE**. Esto explicaría la implicación de estas uniones intercelulares en la propagación de las ondas de Ca^{2+} citosólica, extensamente citada en la literatura. Nuestros datos sugieren que las uniones de tipo gap no participarían en la propagación de la onda de Ca^{2+} de forma directa, sino indirectamente vaciando el Ca^{2+} del RE. Se prevé que este efecto de la carbenoxolona, inadvertido hasta ahora, tendría importantes implicaciones, ya que este fármaco es ampliamente utilizado en muy diversos campos.

6. BIBLIOGRAFÍA

A.G.García, J.G.-S., 1995. Monografías Dr. Antonio Esteve. Farmacología de los canales iónicos., Madrid.

Abu Khamidakh, A.E., Juuti-Uusitalo, K., Larsson, K., Skottman, H., Hyttinen, J., 2013. Intercellular Ca²⁺ wave propagation in human retinal pigment epithelium cells induced by mechanical stimulation. *Experimental eye research* 108, 129-139.

Adijanto, J., Philp, N.J., 2014. Cultured primary human fetal retinal pigment epithelium (hfRPE) as a model for evaluating RPE metabolism. *Experimental eye research* 126, 77-84.

Akanuma, S.-i., Higashi, H., Maruyama, S., Murakami, K., Tachikawa, M., Kubo, Y., Hosoya, K.-i., 2018. Expression and function of connexin 43 protein in mouse and human retinal pigment epithelial cells as hemichannels and gap junction proteins. *Experimental eye research* 168, 128-137.

Baird, G.S., 2011. Ionized calcium. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 412, 696-701.

Berridge, M.J., Bootman, M.D., Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 4, 517-529.

Bonilha, V.L., 2014. Retinal pigment epithelium (RPE) cytoskeleton in vivo and in vitro. *Experimental eye research* 126, 38-45.

Boulton, M.E., 2014. Studying melanin and lipofuscin in RPE cell culture models. *Experimental eye research* 126, 61-67.

Busch, C., Rau, S., Sekulic, A., Perie, L., Huber, C., Gehrke, M., Jousen, A.M., Zipfel, P.F., Wildner, G., Skerka, C., Strauß, O., 2023. Increased plasma level of terminal complement complex in AMD patients: potential functional consequences for RPE cells. *Frontiers in Immunology* 14.

Catsicas, M., Bonness, V., Becker, D., Mobbs, P., 1998. Spontaneous Ca²⁺ transients and their transmission in the developing chick retina. *Current biology* : CB 8, 283-286.

Dunn, K.C., Aotaki-Keen, A.E., Putkey, F.R., Hjelmeland, L.M., 1996. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental eye research* 62, 155-169.

García-Sancho, J., 1995. Farmacología de los canales iónicos, pp. 79-86.

Gorji, A., Scheller, D., Tegtmeier, F., Köhling, R., Straub, H., Speckmann, E., 2000. NiCl₂ and amiloride induce spreading depression in guinea pig hippocampal slices. *Cephalalgia* 20, 740-747.

- Guha, S., Coffey, E.E., Lu, W., Lim, J.C., Beckel, J.M., Laties, A.M., Boesze-Battaglia, K., Mitchell, C.H.**, 2014. Approaches for detecting lysosomal alkalization and impaired degradation in fresh and cultured RPE cells: evidence for a role in retinal degenerations. *Experimental eye research* 126, 68-76.
- Kim, A.A., Nguyen, A., Marchetti, M., Du, X., Montell, D.J., Pruitt, B.L.**, 2022. Independently paced Ca²⁺ oscillations in progenitor and differentiated cells in an ex vivo epithelial organ. 135.
- Klettner, A.K.**, 2020. Retinal Pigment Epithelium Cell Culture, in: Klettner, A.K., Dithmar, S. (Eds.), *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. Springer International Publishing, Cham, pp. 295-305.
- Krebs, J., Agellon, L.B., Michalak, M.**, 2015. Ca²⁺ homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460, 114-121.
- Lehmann, G.L., Benedicto, I., Philp, N.J., Rodriguez-Boulan, E.**, 2014. Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: past, present and future. *Experimental eye research* 126, 5-15.
- Leybaert, L., Sanderson, M.J.**, 2012. Intercellular Ca(2+) waves: mechanisms and function. *Physiological reviews* 92, 1359-1392.
- Mazzoni, F., Safa, H., Finnemann, S.C.**, 2014. Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture. *Experimental eye research* 126, 51-60.
- Pearson, R.A., Dale, N., Llaudet, E., Mobbs, P.**, 2005. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 46, 731-744.
- Peterson, W.M., Meggyesy, C., Yu, K., Miller, S.S.**, 1997. Extracellular ATP Activates Calcium Signaling, Ion, and Fluid Transport in Retinal Pigment Epithelium. *The Journal of Neuroscience* 17, 2324-2337.
- Pfeffer, B.A., Fliesler, S.J.**, 2022. Reassessing the suitability of ARPE-19 cells as a valid model of native RPE biology. *Experimental eye research* 219, 109046.
- Pfeffer, B.A., Philp, N.J.**, 2014. Cell culture of retinal pigment epithelium: Special Issue. *Experimental eye research* 126, 1-4.
- Reichhart, N., Strauß, O.**, 2014. Ion channels and transporters of the retinal pigment epithelium. *Experimental eye research* 126, 27-37.
- Reigada, D., Mitchell, C.H.**, 2005. Release of ATP from retinal pigment epithelial cells involves both CFTR and vesicular transport. *American journal of physiology. Cell physiology* 288, C132-140.

Rizzolo, L.J., 2014. Barrier properties of cultured retinal pigment epithelium. *Experimental eye research* 126, 16-26.

Ryu, S.Y., Peixoto, P.M., Won, J.H., Yule, D.I., Kinnally, K.W., 2010. Extracellular ATP and P2Y2 receptors mediate intercellular Ca(2+) waves induced by mechanical stimulation in submandibular gland cells: Role of mitochondrial regulation of store operated Ca(2+) entry. *Cell Calcium* 47, 65-76.

Samuel, W., Jaworski, C., Postnikova, O.A., Kutty, R.K., Duncan, T., Tan, L.X., Poliakov, E., Lakkaraju, A., Redmond, T.M., 2017. Appropriately differentiated ARPE-19 cells regain phenotype and gene expression profiles similar to those of native RPE cells. *Molecular vision* 23, 60-89.

Shkempi, B., Huppertz, T., 2022. Calcium Absorption from Food Products: Food Matrix Effects. *Nutrients* 14, 180.

Stalmans, P., Himpens, B., 1999. Properties of intra- and intercellular Ca²⁺-wave propagation elicited by mechanical stimulation in cultured RPE cells. *Cell Calcium* 25, 391-399.

Syed, M.M., Lee, S., He, S., Zhou, Z.J., 2004. Spontaneous waves in the ventricular zone of developing mammalian retina. *Journal of neurophysiology* 91, 1999-2009.

Tapias, V., González-Andrés, P., Peña, L.F., Barbero, A., Núñez, L., Villalobos, C., 2023. Therapeutic Potential of Heterocyclic Compounds Targeting Mitochondrial Calcium Homeostasis and Signaling in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Antioxidants* 12, 1282.

Tebben, P.J., Kumar, R., 2013. Chapter 65 - The Hormonal Regulation of Calcium Metabolism, in: Alpern, R.J., Moe, O.W., Caplan, M. (Eds.), *Seldin and Giebisch's The Kidney (Fifth Edition)*. Academic Press, pp. 2249-2272.

Tovell, V.E., Sanderson, J., 2008. Distinct P2Y Receptor Subtypes Regulate Calcium Signaling in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49, 350-357.

Wimmers, S., Halsband, C., Seyler, S., Milenkovic, V., Strauss, O., 2008. Voltage-dependent Ca²⁺ channels, not ryanodine receptors, activate Ca²⁺-dependent BK potassium channels in human retinal pigment epithelial cells. *Molecular vision* 14, 2340-2348.

Wimmers, S.n., Strauss, O., 2007. Basal Calcium Entry in Retinal Pigment Epithelial Cells Is Mediated by TRPC Channels. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48, 5767-5772.

Wittig, D., Wang, X., Walter, C., Gerdes, H.-H., Funk, R.H.W., Roehlecke, C., 2012. Multi-Level Communication of Human Retinal Pigment Epithelial Cells via Tunneling Nanotubes. *PLOS ONE* 7, e33195.

Zhao, S., Rizzolo, L.J., Barnstable, C.J., 1997. Differentiation and Transdifferentiation of the Retinal Pigment Epithelium, in: Jeon, K.W. (Ed.), *International Review of Cytology*. Academic Press, pp. 225-266.