

61
24

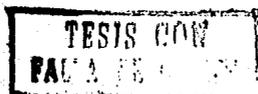
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DE LOS RECEPTORES A AMINOACIDOS EN CULTIVOS
PRIMARIOS DE EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA

TRABAJO DE TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BILOGO
PRESENTA

GABRIELA FRAGOSO CONTRERAS



ENERO DE 1990.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	página
I - INTRODUCCION.....	7
1 - MORFOLOGIA Y LOCALIZACION DEL EPR.....	7
2 - FUNCIONES DEL EPR.....	12
3 - CULTIVO PRIMARIO DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA.....	15
4 - RELACION EPR-RETINA.....	16
a) Durante el desarrollo y la diferenciación.....	16
b) En la retina adulta.....	17
5 - COMUNICACION ENTRE EL EPR Y LA RETINA.....	19
a) La taurina como posible mensajero.....	19
b) El ácido glutámico como posible mensajero.....	23
c) Receptores a posibles transmisores EPR-retina.....	26
d) Criterios para distinguir los receptores de recaptación de los postsinápticos.....	27
II - OBJETIVO.....	29
III - MATERIALES Y METODOS.....	30
-Cultivo.....	30
-Obtención de membranas.....	30
-Cuantificación de receptores por la técnica de unión de un ligando radiactivo.....	33
-materiales.....	33
IV - RESULTADOS.....	35
1 - Unión de taurina-H ³	35
-Efecto de la concentración de proteína sobre la unión del ligando.....	35
-Efecto de la temperatura y del Na ⁺	35
-Curva de saturación de la unión de taurina-H ³	35
-Farmacología de la unión de la taurina-H ³	38

2	-Unión de ácido L-glutámico-H ³	38
	-Efecto de la concentración de proteína sobre la concentración del ligando.....	38
	-Efecto de la temperatura y del Na ⁺	41
	-Cinética de la unión del ácido glutámico-H ³	41
	-Farmacología de la unión del ácido L-glutámico-H ³	41
V	- DISCUSION.....	46
	-Receptores a Taurina.....	46
	-Receptores a L-glutamico.....	49
VI	- BIBLIOGRAFIA.....	53

I.- INTRODUCCION

1 - MORFOLOGIA Y LOCALIZACION DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA

El epitelio pigmentario de la retina (EPR), es una capa celular importante del sistema visual, vital para el mantenimiento de la integridad de las células de la retina sensibles a la luz, los fotorreceptores.

El EPR está situado entre la coroides y la retina, íntimamente asociado a los fotorreceptores (Fig. 1 y 2). Histológicamente el EPR consiste de una monocapa continua de células, que comienza en el borde inicial del nervio óptico y se extiende periféricamente hacia la ora serrata, zona en la cual termina la retina. En la región anterior a la ora serrata, el EPR se continúa como el epitelio pigmentario del cuerpo ciliar (pars plana) (Fig 1).

En 1833 Whorton Jones ^{citado en 76}, describió la morfología del EPR, demostrando que este epitelio es una capa simple de células poligonales con aspecto hexagonal. Las células del EPR al igual que otras células epiteliales son asimétricas (Fig.3). Esta asimetría es esencial para muchas de las funciones llevadas a cabo por las células. La superficie apical del EPR que mira hacia la retina sensorial, está cubierta por procesos parecidos a microvellosidades, de 60 a 95 μm de largo; estos procesos se asocian estrechamente a los fotorreceptores, y se extienden hacia los segmentos internos (Fig. 4).

En su superficie lateral, cada célula de EPR está unida a su vecina por uniones intercelulares estrechas y desmosomas en

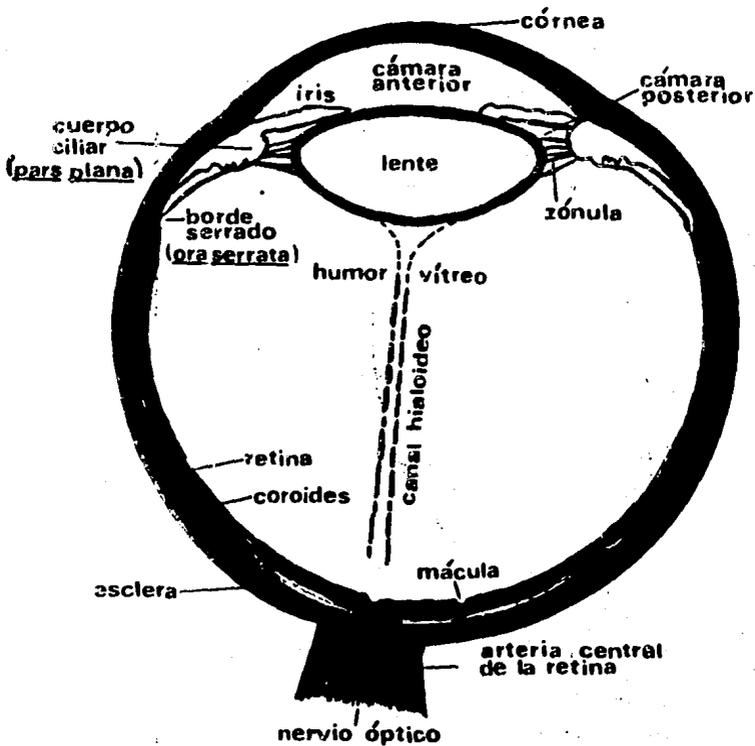


Figura 1- Diagrama del globo ocular de los vertebrados⁷⁶.

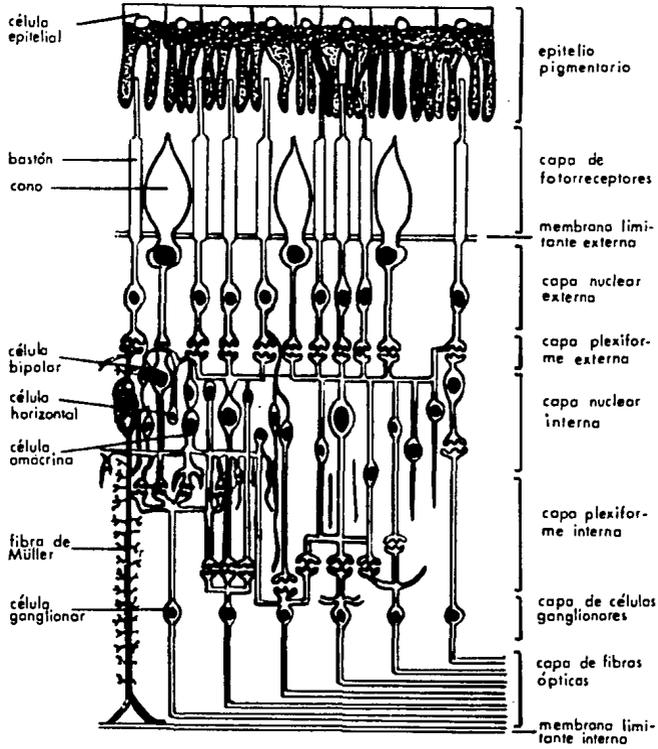


Figura 2-
 Relación entre el epitelio pigmentario y las demás capas de la retina de los vertebrados⁹.

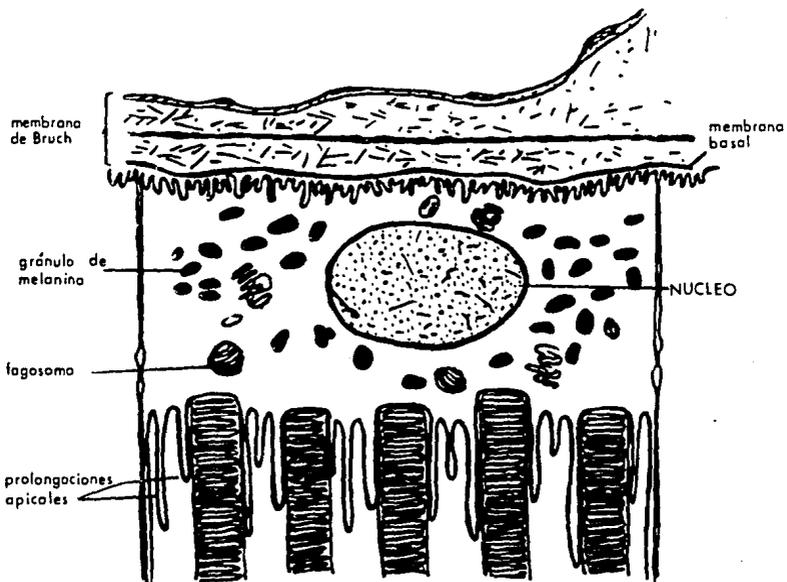


Figura 3-
Morfología celular del epitelio pigmentario de la retina en asociación con los segmentos externos de los fotorreceptores⁶.

banda. Este complejo de unión, también llamado de barra terminal, está localizado cerca de la región apical de la membrana plasmática e impide la difusión de moléculas de gran tamaño a través del espacio entre células adyacentes. El sistema de barra terminal es el responsable de mantener la barrera hemato-retiniana a nivel del riego sanguíneo corooidal⁷⁶.

La membrana plasmática de las células fotorreceptoras y las del EPR no poseen puntos de contacto, y están separados por el espacio subretinal, constituido por una capa de matriz viscosa extracelular^{6, 53}. Las células del EPR tienen un color pardo oscuro debido a sus gránulos de melanina. Las observaciones histológicas muestran que las células del EPR son más altas y contienen más melanina en la zona macular que en la periferia. Esto está de acuerdo con la observación de que la mácula tiene una apariencia más oscura que otras regiones retinianas⁷⁶.

En la región basal del EPR, existe un complejo pentalaminar llamado la membrana de Bruch (Fig. 3). Los estudios con microscopía electrónica han demostrado que este complejo está constituido por la membrana basal del EPR, formado por una capa de colágena interna, la capa elástica media, la zona de colágena externa y la membrana basal de los coriocapilares⁵³.

El núcleo de la célula pigmentaria se localiza en la porción basal y mide aproximadamente de 8 a 12 μm de diámetro⁷⁶. Muchas de las células contienen varios núcleos, especialmente en la región de la ora serrata donde la relación de células mononucleadas y binucleadas es del orden de 30:1⁶⁰. En general el núcleo de la célula presenta un patrón de cromatina difusa y puede contener 1 o 2 nucleolos. Los microtúbulos y filamentos de 10 nm de

diámetro parecen intervenir en el movimiento de organelos, y ser constituyentes del citoesqueleto²⁸.

2 - FUNCIONES DEL EPR.

La estructura del EPR está íntimamente relacionada con muchas de sus funciones, que pueden clasificarse como funciones físicas, ópticas, bioquímico-metabólicas y de transporte⁷⁶.

Las funciones físicas del EPR consisten en mantener una barrera de protección de la retina neural al paso de moléculas procedentes de la circulación coroidal, así como ofrecer una gran fuerza de adhesión retina-EPR a través del transporte (bombeo) de fluidos específicos y la síntesis de algunos mucopolisacáridos hacia el espacio subretinal^{47, 48, 54}. Las microvellosidades del EPR también podrían intervenir en esta adhesión por su relación estructural tan estrecha con los segmentos externos de los fotorreceptores⁴⁶.

Las funciones ópticas que realiza el EPR consisten en disminuir la luz dispersa, lo que mejora la resolución de las imágenes, y absorber la energía luminosa por medio de los gránulos de melanina. Asimismo actúa como una barrera pigmentada para prevenir el daño fótico que causaría un exceso de luz, que podría traducirse en una disminución de la resolución de la imagen⁵⁹.

La función bioquímico-metabólica del EPR es la de fagocitar paquetes de discos de los segmentos externos de los fotorreceptores (Fig. 4)⁴⁶. El desprendimiento de los discos, definido como la eliminación de los discos del extremo

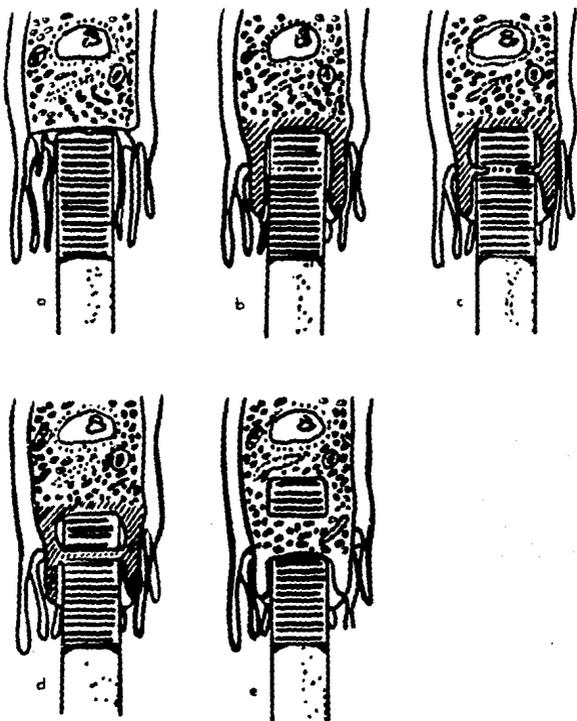


Figura 4- Desprendimiento de los segmentos externos de los fotorreceptores y su fagocitosis por el EPR^{ce}.

distal de los segmentos externos de conos y bastones, incluye la separación de grupos de discos, los cuales son fagocitados por las células adyacentes del EPR⁷⁶. Se estima que cada célula del EPR podría fagocitar en promedio los segmentos externos de 30 a 45 fotorreceptores⁶⁶. A este respecto, los estudios de Young (1971)^{citado en 76} en el mono rhesus, indicaron que cada bastón sintetiza de 80 a 90 nuevos discos del segmento externo cada 24 horas y el número de discos fagocitados por una célula de EPR diariamente es 2,000 en la parafovea, 3,500 en la perifovea y aproximadamente 4,000 en la periferia. Esto se debe a que la relación entre las células del EPR y los fotorreceptores no siempre es 1:1⁷⁶.

Young y Bok en 1969^{citado en 46}, usaron el término fagosomas para la inclusión de cuerpos con material de bastones y notaron que cada cuerpo estaba rodeado por dos membranas celulares separadas, la primera, ó membrana interna, derivada del segmento externo del fotorreceptor, la segunda o membrana externa, derivada de la célula del EPR.

Las células del EPR contiene numerosas enzimas hidrolíticas en sus lisosomas, que intervienen en la degradación de los restos de las membranas obtenidas de los segmentos externos de los fotorreceptores. Al fagocitarlos, en el interior celular se generan fagosomas, los cuales contienen dichas membranas. Posteriormente éstos se unen a los lisosomas y forman estructuras especializadas llamadas fagolisosomas, en los que se degradan las membranas fagocitadas⁶⁷. Por otra parte, el EPR metaboliza por esterificación, almacenaje y transporte, los precursores de los pigmentos visuales como la vitamina A⁶ y contiene enzimas como la

tirosinasa que interviene en la síntesis y renovación de los gránulos de melanina⁷⁶.

Las funciones de transporte que realiza el EPR, son la de llevar numerosos metabolitos hacia y desde las células retinianas a la circulación coroidal, entre los que se encuentran aminoácidos como la taurina y la metionina y azúcares como la glucosa³⁷⁻⁴⁷. Asimismo participa en el bombeo iónico, importante para mantener el equilibrio electroquímico del espacio subretiniano⁴⁸⁻⁵².

3 -CULTIVO PRIMARIO DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA

Se ha conseguido aislar^{11, 17} y cultivar^{7, 10, 11, 13, 27, 56, 70, 71} el EPR, como un método útil para el estudio de sus funciones biológicas, específicamente con el fin de esclarecer los factores que afectan la fagocitosis de los segmentos externos^{55, 68}. Los co-cultivos de EPR-retina se consideran un sistema adecuado para el estudio de la influencia que ejerce el EPR sobre la estratificación y diferenciación de las neuronas retinales y esta técnica ha permitido proponer modelos para explicar la proliferación y diferenciación de las neuronas de la retina del pollo^{70, 71}.

Los cultivos primarios se han utilizado también para estudiar las características metabólicas del EPR del humano⁷ y su modulación fenotípica por influencia de otros tejidos²⁷. Otros conocimientos derivados del uso de esta técnica se relacionan con el transporte de metabolitos¹⁰, así como con la presencia de receptores^{14, 18, 30, 31}.

4 - RELACION EPR-RETINA

a) Durante el desarrollo y la diferenciación.

Durante el desarrollo embrionario, el diencefalo, la segunda vesicula cerebral, da origen a las copas ópticas. La zona de la vesicula óptica opuesta a la superficie del ectodermo prolifera y forma una depresión que invagina la porción distal y media inferior lo que constituye la copa óptica, mientras que la superficie ectodérmica da origen a la vesicula del cristalino, que ocupa la concavidad de la copa óptica. La pared externa de la copa óptica permanece como una capa de células cuboidales que da origen al epitelio pigmentario de la retina, al cuerpo ciliar y al iris. La pared interna de la copa prolifera y da origen a la retina, al epitelio ciliar no pigmentado y al epitelio posterior del iris¹.

En las etapas primarias del desarrollo embrionario, el fondo de la copa óptica que da lugar a la retina y la capa externa que da lugar al EPR son equipotenciales. El transplante del epitelio pigmentario o de retina en el estadio de copa óptica a distintas regiones del encéfalo embrionario, demuestran que tanto una capa como otra tienen la capacidad de generar tanto tejido característico de la retina como del epitelio pigmentario^{6, 7}.

La futura retina pierde la característica de transformarse en epitelio pigmentario en el estadio que precede a su estratificación. El epitelio pigmentario conserva durante bastante más tiempo la facultad de transformarse en retina¹, un fenómeno denominado "metaplasia" o "transdiferenciación". Esto significa que el epitelio pigmentario tiene la capacidad de diferenciarse en retina neural en el caso de que durante el desarrollo embrionario la retina llegara a dañarse.

b) En la retina adulta.

La comunicación entre el epitelio pigmentario y la retina, es indispensable para el buen funcionamiento del proceso visual.

En los bastones el proceso de fototransducción comienza con la incidencia de un fotón sobre la rodopsina (Fig. 5), proteína integral de la membrana de los discos de los fotorreceptores, que es sensible a la luz. El 11-cis retinal es el grupo prostético de la rodopsina; las células del EPR incorporan el trans-retinal del plasma por un proceso que se supone es mediado por un receptor de membrana⁷. El trans-retinal es isomerizado a 11-cis-retinal y posteriormente esterificado a 11-cis-ester. El 11-cis-ester puede ser hidrolizado y el alcohol formado es entonces oxidado por una deshidrogenasa estereoespecífica a 11-cis retinaldehído. El 11-cis-retinaldehído es transferido a los segmentos externos de los fotorreceptores para posteriormente incorporarse a la opsina y formar la rodopsina⁸. El 11-cis-retinal parece ser específico del EPR ya que no se requiere en otra región del organismo.

Una de las actividades más importantes del EPR es su participación en el recambio de los segmentos externos de las células fotorreceptoras, al fagocitar paquetes de discos. En ratas con distrofia hereditaria de la retina, la actividad fagocítica se ve severamente reducida, lo que ocasiona la acumulación de membranas de los segmentos externos en el espacio subretinal y por consiguiente, la degeneración de los fotorreceptores^{9, 73}.

También se pone de manifiesto la interacción EPR-retina en la respuesta eléctrica de la retina, puesto que la onda "a" del electroretinograma (ERG) (Fig. 6) se origina en la capa de los

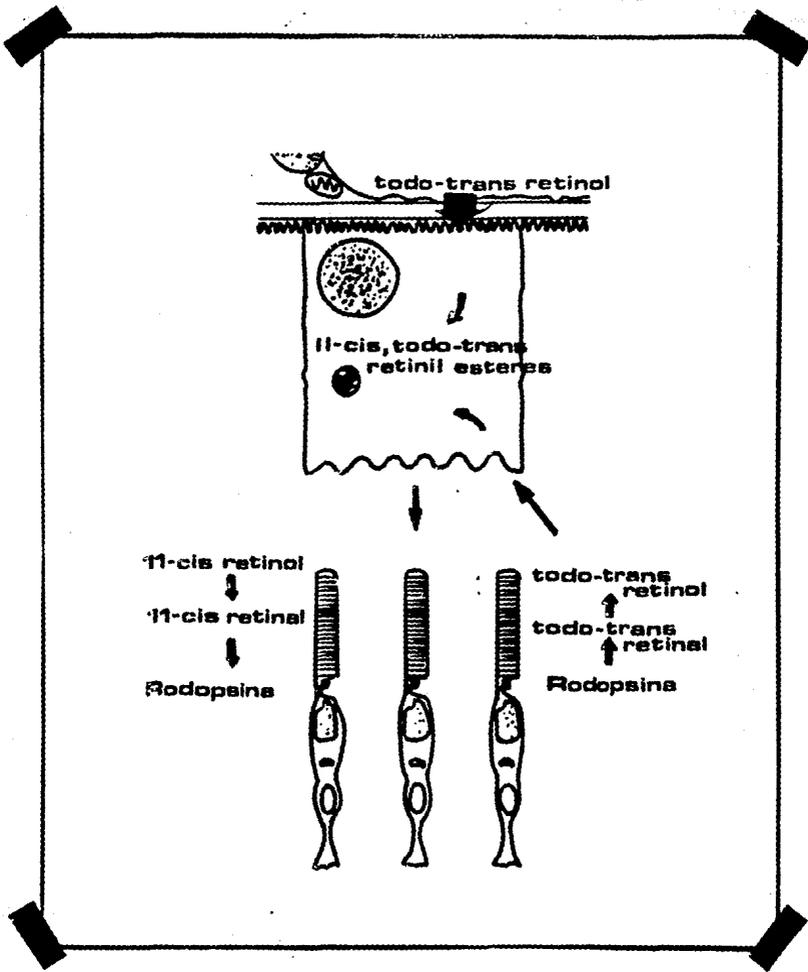


Figura 5-
Ciclo de la Rodopsina.

fotorreceptores, y la onda "b" se genera principalmente por la actividad de las células bipolares "on" y células de Müller y la onda "c" proviene principalmente de la despolarización de la membrana apical del EPR⁷⁶ (fig 6).

5 - COMUNICACION ENTRE EL EPR Y LA RETINA

a) La taurina como posible mensajero:

La taurina (ácido β -amino etanosulfónico) se encuentra en la mayoría de los grupos de vertebrados mientras lo contrario sucede en casi todos los tejidos de vegetales. Se presenta en concentraciones muy elevadas en la mayoría de los tejidos excitables: músculo (estriado, liso y cardiaco), SNC, retina, glándulas de secreción, páncreas, bazo, y en otros como el riñón, leucocitos y plaquetas^{24, 27}. Es uno de los aminoácidos libres más abundantes en la célula, ya que no se incorpora en otras macromoléculas y no interviene en reacciones metabólicas, excepto por su conjugación con el ácido cólico para formar ácido taurocólico en el hígado²⁸.

La vía metabólica para la síntesis de la taurina en los tejidos animales (Fig. 7) es a partir de un precursor endógeno, el aminoácido azufrado cisteína. En el tejido nervioso, la vía predominante se inicia con la oxidación de la cisteína por acción de la dioxigenasa de la cisteína que produce ácido cisteín sulfínico, el cual se descarboxila por una enzima dependiente de la vitamina B₆, la cisteín sulfinato descarboxilasa (L-cisteín sulfinato carboxi-lias) (CSD), que forma hipotaurina. La oxidación de la hipotaurina es el paso final de la vía y parece producirse sin catálisis enzimática. La CSD es la enzima

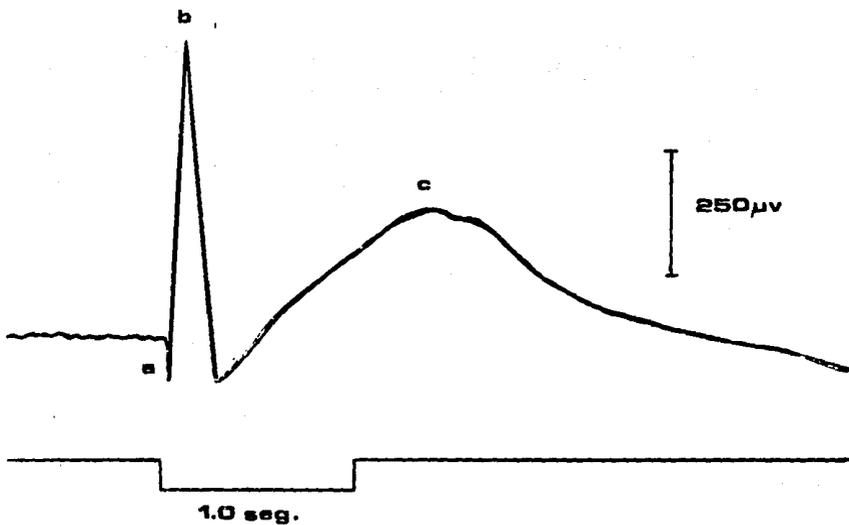


Figura 6-
Electrorretinograma^{7e}. Interacción EPR-retina
en la respuesta eléctrica de la retina.

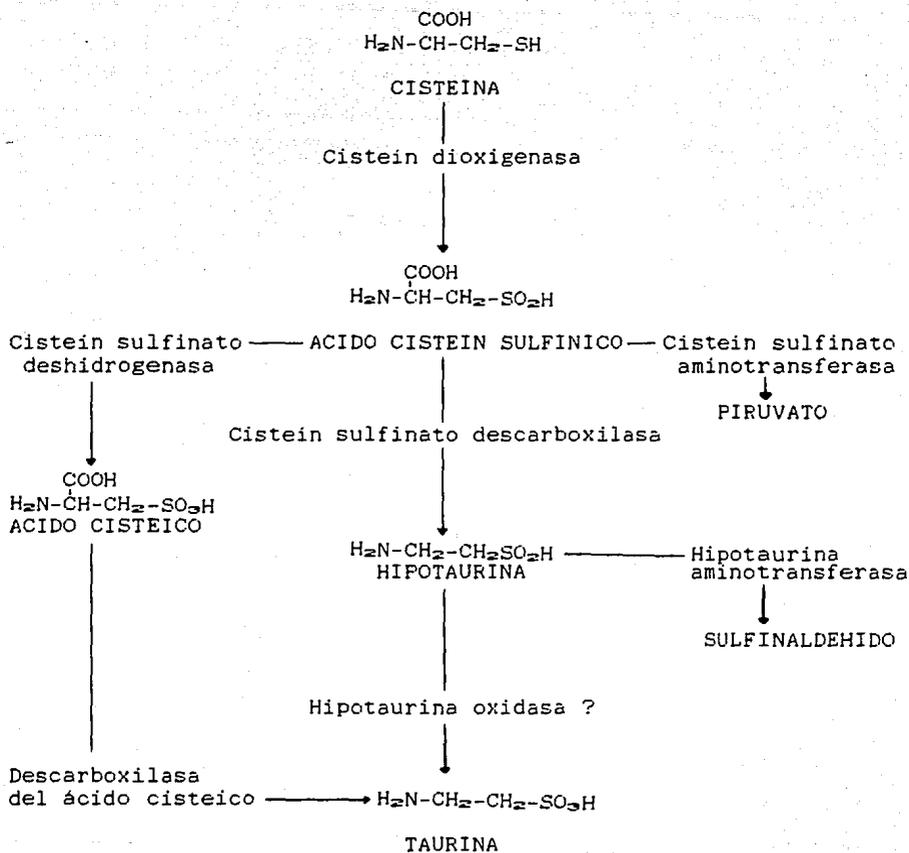


Figura 7-

Ruta metabólica para la síntesis de taurina a partir de cisteina²⁷.

reguladora de la vía⁵⁷.

En algunos organismos como gatos y monos, la enzima prácticamente no existe, por lo que dependen de la dieta para el mantenimiento de la concentración normal de este aminoácido⁵⁸.

Los niveles de taurina en la retina de los vertebrados son marcadamente altos, en el intervalo de 10 a 50 mM, existen variaciones entre las especies⁵⁹: las retinas de animales no mamíferos, peces, aves y anfibios, muestran niveles relativamente bajos comparados con los mamíferos. La concentración de taurina en la retina de casi todas las especies de vertebrados, es más elevada que la del cerebro y de otros tejidos del mismo animal. Los altos niveles fisiológicos de taurina en la retina parecen ser necesarios para mantener la estructura y función de las células visuales, asimismo ejercen un efecto protector sobre éstas⁶⁰. In vivo, un decremento en la concentración del aminoácido en la retina, producido ya sea por una dieta deficiente en taurina o bien por bloqueadores del transporte de este aminoácido, produce una marcada alteración de la estructura de los fotorreceptores, seguida por disfunciones severas de la retina⁶¹. La capa de fotorreceptores contiene la concentración más alta de taurina en la mayoría de los vertebrados, ya que representa del 60 al 70 % del contenido total de taurina en la retina. Asimismo se ha demostrado que la taurina se libera de los fotorreceptores por estimulación luminosa, hacia el espacio subretiniano⁶¹, desde donde el EPR la transporta activamente a la coroides⁴⁷.

La concentración de taurina en la retina de casi todos los vertebrados, aumenta durante el desarrollo postnatal², en claro

contraste con lo que ocurre en el tejido cerebral de las mismas especies, donde se observa un decremento en los niveles de este aminoácido. El curso temporal del incremento de taurina en el desarrollo tardío corresponde con la diferenciación de los fotorreceptores, lo que sugiere que este incremento corresponde a su acumulación en estas células⁷.

b) El ácido glutámico como posible mensajero:

El glutamato es un aminoácido no esencial (Fig 8), que posee un poderoso efecto excitador sobre la mayor parte de las neuronas del SNC y se sintetiza en el sistema nervioso principalmente a partir de la glutamina por medio de la enzima glutaminasa⁷.

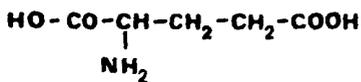
Werman en 1966⁷ estableció seis criterios básicos para que un compuesto pueda ser considerado como neurotransmisor:

- 1) su presencia en terminales sinápticas,
- 2) la presencia de un mecanismo de síntesis,
- 3) un sistema de recaptación de alta afinidad dependiente de Na^+ ,
- 4) el sistema de liberación del compuesto,
- 5) identidad farmacológica,
- 6) inducir el mismo resultado que el transmisor natural en la célula postsináptica.

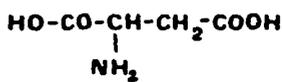
El ácido glutámico reúne la mayor parte de estos criterios en las neuronas del SNC de los vertebrados⁷:

El ácido glutámico representa del 10 al 15% de la poza de aminoácidos libres, su concentración es de aproximadamente 4 $\mu\text{mol/g}$. en la mayoría de las células de los vertebrados⁷.

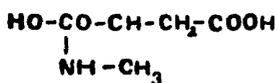
Las enzimas que catalizan la síntesis del glutamato, se



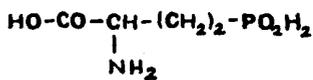
L-GLU



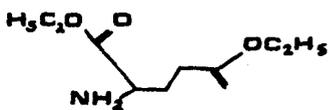
L-ASP



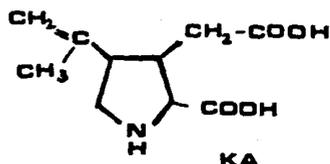
NMDA



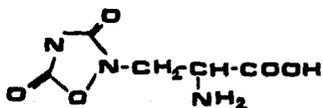
L-APB



GDEE



KA



QUIS

Figura 8-

Estructura química del ácido glutámico y de algunos análogos⁶⁵.

hallan concentradas en los segmentos internos de los fotorreceptores, lo cual podría indicar la participación de este compuesto como neurotransmisor²⁷.

El ácido glutámico se acumula en la retina por un sistema de captación de alta afinidad que depende de la presencia de sodio. Los estudios autorradiográficos retinas de rata y conejo¹⁷ indican que el ácido glutámico se acumula preferentemente en las células gliales. También se ha registrado su acumulación en fotorreceptores de varias especies⁷². Brandon y Lam en 1983 propusieron al ácido glutámico como candidato a neurotransmisor en los conos de la retina de rata. En cuanto a la liberación estimulada por despolarización, el ácido glutámico se libera de los fotorreceptores aislados, en forma dependiente de Ca^{++26} .

Por otra parte con respecto a su relación con el EPR se ha demostrado que el L-glutamato estimula el desprendimiento de los discos de los fotorreceptores²⁸, y se ha sugerido que los aminoácidos excitadores actúan vía un receptor del tipo del ácido kainico para inducir el desprendimiento de los mismos³; la localización celular del receptor propuesto se desconoce y existe la posibilidad de que se localice ya sea en las células fotorreceptoras o bien en las del EPR.

La clasificación de los receptores de glutamato basada en estudios bioquímicos y electrofisiológicos, señala la existencia de dos grandes grupos: el activado por N-metil-D-aspartato (NMDA), cuya acción se inhibe en presencia de Mg^{++} (20), y un segundo tipo de receptor activado por otros agonistas como el kainato (KA), el quisqualato (QA) y el ácido L-2-amino-4-fosfono-

butírico (APB); este último grupo es relativamente insensible a las altas concentraciones de Mg^{++} (20).

El ácido kainico y otros agonistas de los aminoácidos excitadores causan la liberación del ácido aspártico, ácido glutámico y taurina de los fotorreceptores y del ácido gamma amino butírico (GABA) y glicina de la capa plexiforme interna de la retina. Con excepción del GABA, estos agentes en altas concentraciones, pueden causar el desprendimiento de los discos de los fotorreceptores en Xenopus sp., por un mecanismo dependiente de Ca^{++} , lo que apoya la posibilidad de que el agente endógeno relacionado con el desprendimiento pudiera ser probablemente el mismo glutamato.

c) Receptores a posibles transmisores EPR-retina.

Los receptores a sustancias neuroactivas son macromoléculas, generalmente proteínas oligoméricas integrales de la membrana plasmática, cuya interacción con el ligando natural u otros análogos, genera una respuesta. Existen dos mecanismos básicos a través de los cuales la activación del receptor genera cambios en la célula: ionotrópico y metabotrópico¹⁶. El ionotrópico implica que el receptor esté acoplado a un canal iónico que se abre al interactuar el transmisor con el receptor. En el mecanismo metabotrópico, la interacción transmisor-receptor resulta en la activación de una enzima amplificadora por lo general la adenilato o guanilato ciclasa, a través de una proteína G. La adenilato ciclasa convierte el ATP en AMP cíclico y la guanilato ciclasa convierte el ATP en GMP cíclico. En general este segundo mensajero se une al componente regulador de una proteína cinasa, enzima

que activa respuestas celulares, al añadir grupos fosfato (PO_4^{3-}) a ciertas proteínas¹⁷.

Otra ruta metabotrópica generada por la interacción del mensajero con su receptor, es por activación de la enzima fosfodiesterasa (PDE) que transforma el 4,5-difosfato fosfatidilinositol en un par de segundos mensajeros: el diacilglicerol (DG) y el trifosfato de inositol (IP_3). Por una parte, el IP_3 induce la movilización de iones Ca^{++} del retículo endoplásmico, mientras que el diacilglicerol activa a la proteína cinasa-C que tiene capacidad de fosforilar a otras moléculas^{26, 72}. La activación de la PDE puede o no llevarse a cabo por medio de una proteína G. Una vez desencadenada la respuesta biológica, se produce la disociación del complejo ligando-receptor y la subsecuente inactivación del ligando ya sea por recaptura en terminales neuronales o glia y/o su catabolismo mediante enzimas que lo degradan²⁶.

d) Criterios para distinguir los receptores de recaptación de los postsinápticos.

La técnica para la medición de receptores postsinápticos in situ, que emplea un radioligando, fue desarrollada originalmente para el estudio de interacciones hormona-receptor y aplicada a los aminoácidos por Snyder y Bennett⁶⁴, y ha sido usada frecuentemente para diversos neurotransmisores. Esta técnica consiste en cuantificar la interacción del mismo neurotransmisor propuesto o de un agonista o antagonista específico, de alta actividad específica, con las membranas. Para receptores de aminoácidos, cuando el radioligando es el mismo aminoácido, es necesario discrimi-

nar entre los sitios de unión postsinápticos y los sitios de recaptación del compuesto. Es posible hacer esta diferenciación por medio de manipulaciones técnicas al medir los sitios de unión, así como por la caracterización farmacológica de la interacción. Así la unión del ligando a los sitios de recaptación, requiere de Na^+ , depende de la temperatura, y los sitios se inactivan con la congelación, mientras que la unión a los receptores sinápticos no se afecta por el Na^+ , no depende de la temperatura^{eo}, y en ocasiones se hace más evidente al congelar y descongelar las membranas.

II - O B J E T I V O

Como puede inferirse de los datos expuestos en la introducción, una de las funciones más importantes del EPR es la fagocitosis de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores, que mantiene así un equilibrio entre su síntesis y su degradación; sin embargo, se sabe muy poco acerca del mecanismo de comunicación que media la respuesta fagocítica entre células de la retina y las del EPR.

Al considerar la existencia de un mensajero químico liberado por la retina, el cual induce una respuesta en el EPR, debe existir el correspondiente receptor en la célula epitelial que medie la respuesta fisiológica. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo es identificar y caracterizar los receptores a taurina, ya que se ha demostrado que se libera en respuesta a la luz, y por lo tanto podría actuar como transmisor. También los receptores a glutamato, propuesto como neurotransmisor excitador en la retina incluyendo los fotorreceptores y del que se conoce que aumenta el desprendimiento de los discos. Esto durante el desarrollo embrionario en cultivo primario de células de EPR de pollo.

III.- MATERIALES Y METODOS

Cultivo. Se utilizaron embriones de pollo (White Leghorn) de 7 días de desarrollo embionario a los cuales se les extrajo la copa óptica en condiciones estériles; a ésta se le hizo un corte ecuatorial, desechando la parte anterior, y de la posterior se extrajo el EPR. Se lavo el tejido obtenido con Ringer Krebs bicarbonato (KRB), compuesto por: NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, CaCl_2 2.5 mM, MgSO_4 1.17 mM, glucosa 1.6 mM y NaHCO_3 35 mM; centrifugando 5 minutos a 500 rpm a temperatura ambiente, la pastilla que se obtuvo se resuspendió en nueva solución Ringer y se centrifugó en las mismas condiciones. Se repitió la operación 3 veces mas. La disociación de las células se hizo incubándolas con tripsina 0.13% en PBS 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se sembraron en cajas Falcon de 20 cm^2 con medio de cultivo Difco TC-199 con 10% de suero de bovino fetal inactivado, 2mM de glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomomicina, a una densidad de 25,000 células por cm^2 y se mantuvieron a una temperatura constante de 37° C. El cambio de medio se realizó a intervalos de 5 días.

Obtención de membranas. Las células se cosecharon a los días de cultivo indicados para cada experimento. Después de eliminar el medio de cultivo y lavar con Ringer Krebs bicarbonato, las células se desprendieron mediante una espátula, y se resuspendieron en 5 ml de KRB. La resuspensión se centrifugó a 500 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla de

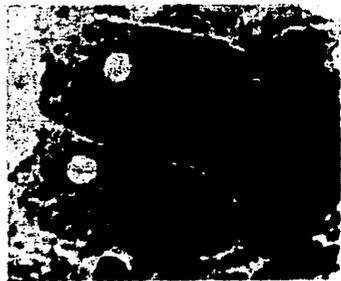
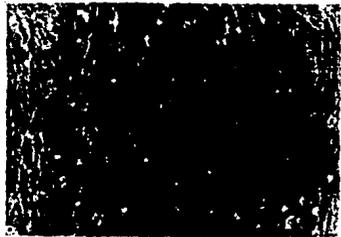
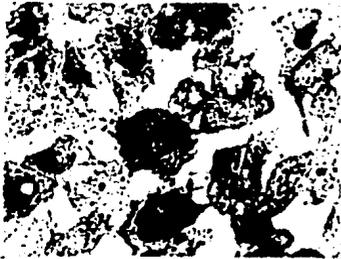
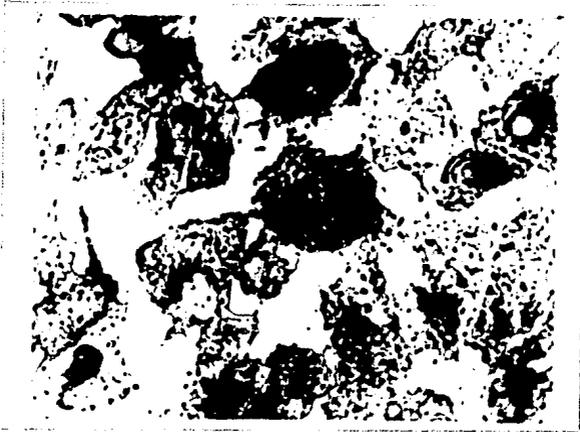


Figura 9- Cultivos primarios de células del Epitelio Pigmentario de la Retina.



células se homogeneizó a 4° C. en 20 volúmenes (p/v) de agua bidestilada; la suspensión se mantuvo 15 minutos en hielo con objeto de inducir la ruptura total de las células por choque osmótico. Se centrifugó a 45.000 xg durante 20 min para sedimentar las membranas y se lavó 2 veces resuspendiendo por homogeneización. Finalmente, las membranas se congelaron durante un mínimo de 48 hrs. a -70° C, o bien se emplearon frescas para los ensayos de medición de receptores.

Quantificación de receptores por la técnica de unión de un ligando radiactivo.

Los receptores se midieron por la unión específica de un radioligando tritiado (glutamato-H³ ó taurina-H³) a las membranas de células cultivadas durante 16 y 25 días. Los ensayos se realizaron por el método de filtración con filtros de fibra de vidrio Whatman (GF/B). Las membranas se homogeneizaron en Buffer Tris-HCl 0.1 M a un pH de 7.4 con o sin NaCl 118 mM, y a temperatura de 4° ó 37° C, para dar una concentración aproximada de proteína de 0.2 mg/ml. Los aminoácidos marcados se añadieron a una concentración de 50 nM con variaciones según el experimento. La unión inespecífica se tomó como la radiactividad que permanece unida a las membranas en presencia de 1 mM de los compuestos fríos, agonistas o antagonistas.

Los filtros se disolvieron en 10 ml de Tritosol¹² y la radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y col¹³.

Materiales. La taurina-H³ (Act Esp 20-30 Ci/mmol) se obtuvo de

New England Nuclear (Boston, MA, USA.) y el ácido L-glutámico- H^3 (Act Esp 48 Ci/mmol) se obtuvo de Amersham International PLC (Amersham, UK). Los filtros de fibra de vidrio (GF/B) se obtuvieron de Whatman. El medio de cultivo TC-199 y el suero de bovino fetal se adquirió de Difco (Detroit, Michigan, USA). Los demás reactivos fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO., USA.).

IV.- RESULTADOS

1.-UNION DE TAURINA-H³

Efecto de la concentración de proteína sobre la unión del ligando. Variando la concentración de proteína de 50 a 350 ug/ml, se mostró una unión específica óptima en el nivel de 20 a 35 ug/ensayo. Por consiguiente todos los demás experimentos se realizaron a esta concentración, en los cuales el nivel de unión específica alcanzó el 40% de la unión total (Fig. 10).

Efecto de la temperatura y del Na⁺. Con el objeto de determinar si la unión de taurina al EPR mostraba características similares a los receptores de tipo postsináptico o de recaptación, descritos previamente en el sistema nervioso central y la retina, probamos el efecto del Na⁺ (118 mM NaCl) y de la temperatura sobre la unión, en membranas frescas y congeladas. Estos experimentos se realizaron a dos diferentes edades del cultivo: en un estado no confluyente (16 DIV) y en un estado confluyente (25 DIV), con el objeto de determinar si los cambios en el desarrollo afectaban las propiedades de la unión al receptor. Se obtuvo una mayor unión de taurina en membranas congeladas que en membranas frescas, independientemente de la presencia de Na⁺, en todas las condiciones exploradas (Fig 11). Sin embargo, la unión se incrementó (30-40 %) cuando los ensayos se realizaron a una temperatura de 37°C, comparada con la de 4°C. en todas las condiciones.

Curva de saturación de la unión de taurina-H³. La unión de taurina-H³ a membranas de EPR se estudió en un intervalo de

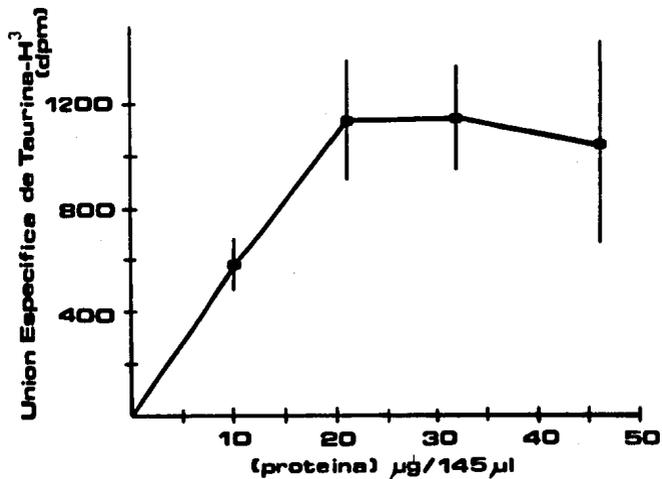


Figura 10-
Efecto de la concentración de proteína sobre la
unión de Taurina-H³.

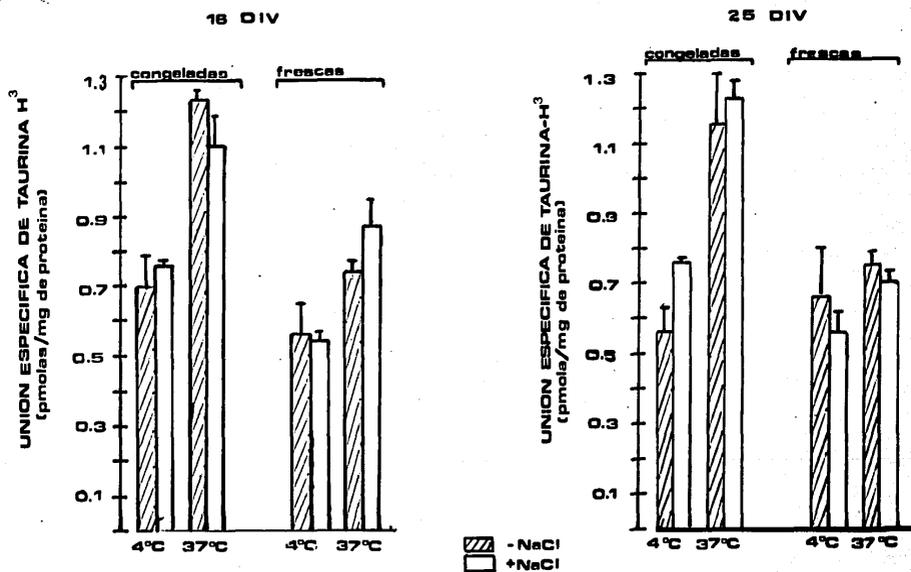


Figura 11- Efecto de la temperatura y del Na⁺.

concentraciones entre 25 nM y 2µM. La unión específica fue saturable y reversible (Fig. 12) con una $K_D=237$ nM y una $E_{max}=2.8$ pmol/mg de proteína. El análisis de Scatchard de los datos indicó la presencia de una sola población de receptores de alta afinidad.

Farmacología de la unión de taurina- H^3 . Se usó una serie de compuestos que tienen influencia sobre el efecto fisiológico de la taurina, como inhibidores, a una concentración de 1 mM, de la unión específica de 50 nM de taurina- H^3 . Se obtuvo una eficiencia en el desplazamiento en el siguiente orden: taurina > estri-
c-
nina > glicina = β -alanina > GABA > bicuculina > L-glutamato. Debido a que la taurina, la glicina y la estri-
c-
nina tuvieron la misma eficiencia a una concentración de 1 mM, se determinó su IC_{50} probando nueve concentraciones: 5, 10, 50, 100 y 500 nM; 1, 10 y 100 µM y 1 mM de estos compuestos en presencia de taurina-
H³ a una concentración de 100 nM. Se calculó gráficamente el valor de sus IC_{50} : 252 nM para taurina, 630 nM para glicina y 316 nM para estri-
c-
nina (Fig. 13).

2.-UNION DE L-GLUTAMICO- H^3

Efecto de la concentración de proteína sobre la unión del ligan-
do. La concentración de proteína necesaria para obtener la unión específica óptima fue de 0.15 - 0.2 mg/ml. Debido a esto los experimentos posteriores se realizaron usando esta concentra-
ción (Fig. 14).

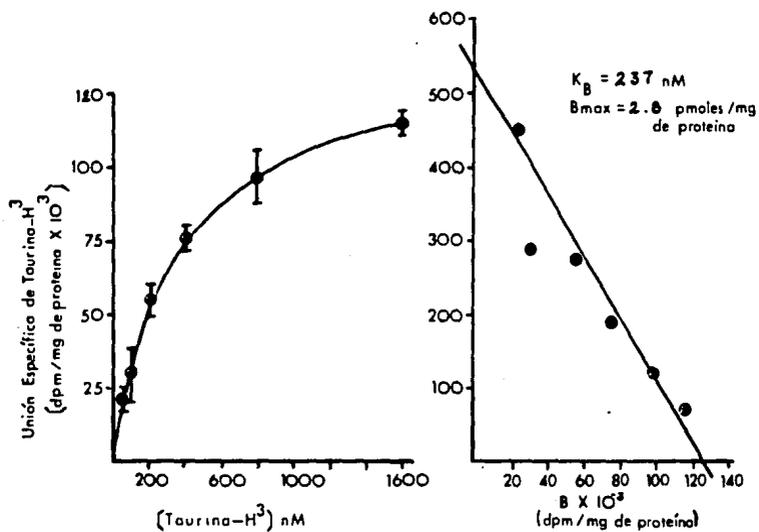


Figura 12-

Curva de saturación de la unión de Taurina-H³ a membranas de células de 16 DIV.

DESPLAZAMIENTO DE LA UNION ESPECIFICA DE
TAURINA-H³ POR DIVERSOS FARMACOS.

COMPUESTO (1 mM)	UNION ESPECIFICA (pmolas/mg de prot)	IC ₅₀ (nM)
TAURINA	0.56 + 0.8	2.52
GLICINA	0.47 + 0.04	630
GABA	0.34 + 0.01	-
β-ALANINA	0.47 + 0.05	-
L-GLUTAMATO	0.25 + 0.02	-
ESTRICNINA	0.50 + 0.02	316
BICUCULINA	0.31 + 0.05	-

Figura 13-

Farmacología de la union de taurina usando membranas congeladas de células de 16 días de cultivo a la temperatura de 37°C.

Efecto de la temperatura y del Na⁺. Investigando el efecto del Na⁺ en la unión del ligando en membranas congeladas, se obtuvo una mayor unión específica de L-glutámico en presencia de 118 mM de NaCl a las dos edades de cultivo, en estado no confluyente (16 DIV) y en el estado confluyente (25 DIV), siendo mayor a la primera edad (Fig. 15).

Cinética de la unión del L-glutámico-H⁺. Variando la concentración del ligando radiactivo en los niveles de 25 a 2000 nM, se obtuvo una unión saturable y reversible con una B_{max}=3.2 pmol/mg de proteína y una K_d=333 nM. El análisis de Scatchard mostró una sola población de receptores (Fig. 16).

Farmacología de la unión de L-glutámico-H⁺. Se estudió el efecto de agonistas y antagonistas específicos de los receptores de L-glutamato: L y D-glutamato, L y D-aspartato, como agonistas generales, el dietil ester del glutamato (GDEE), antagonista de los receptores tipo Quiscualato, el quiscualato (QA), agonista de los receptores tipo Quiscualato, el N-metil-D-aspartato (NMDA), agonista de los receptores tipo NMDA, el ácido 2-amino-5-aminofosfonovalérico (APV), antagonista de los receptores tipo NMDA, el kainato (KA), agonista del receptor tipo kainato y el L-glutamato-4-monohidroxamato, inhibidor de la captación de glutamato y el DL-aspartato-β-hidroamato, inhibidor de la captación de glutamato como inhibidores de la unión de L-glutamato-H⁺ 50 nM. El orden en la potencia de desplazamiento de éstos compuestos utilizados a una concentración de 1 mM fue el siguiente: L-glu > L-Asp > D-glu = D-Asp > GDEE > QA > NMDA > APV = L-glu-OH = DL-Asp-OH (Fig.).

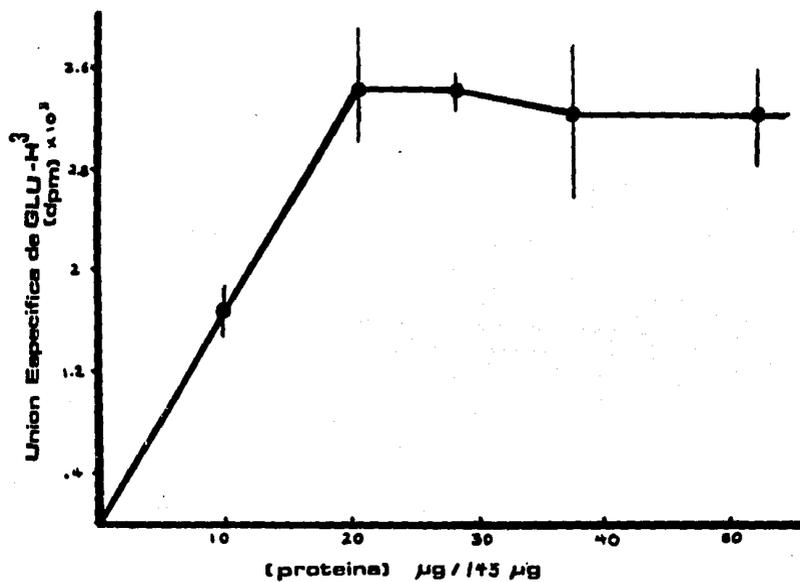


Figura 14 - Efecto de la concentración de proteína. Membranas de células de 16 DIV. El experimento se realizó con Na^+ .

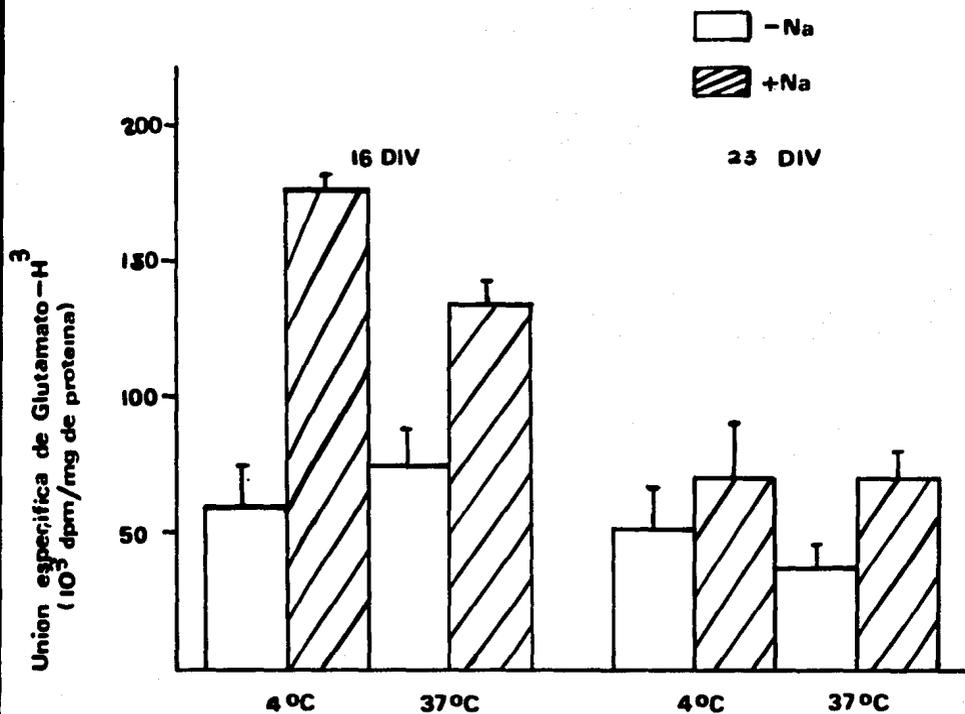


Figura 15 - Efecto de la temperatura y el Na⁺ sobre la unión específica de Glutamato a membranas congeladas.

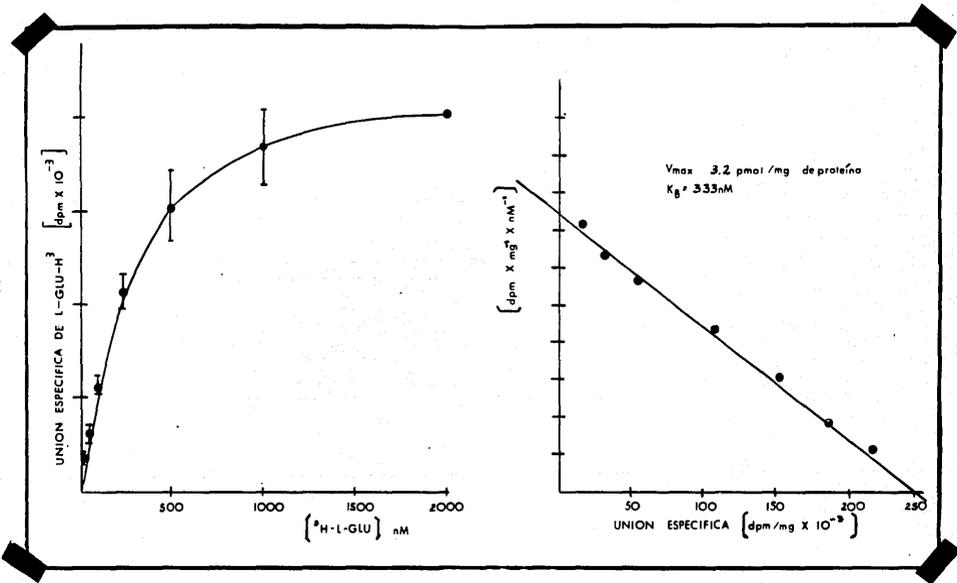


Figura 16- Curva de saturación de la unión de Glutámico- H^3 en membranas de células de 16 DIV, a $37^\circ C$.

DESPLAZAMIENTO DE LA UNION ESPECIFICA DE
 GLUTAMATO-H⁺ POR COMPUESTOS ANALOGOS

COMPUESTO (1 mM)	UNION ESPECIFICA (pmol/mg de proteina)
L-GLUTAMATO	0.55 + 0.05
L-ASPARTATO	0.36 + 0.03
D-GLUTAMATO	0.30 + 0.02
D-ASPARTATO	0.30 + 0.03
G D E E	0.28 + 0.07
QUISCUALATO	0.25 + 0.05
N M D A	0.20 + 0.06
A P V	0.06 + 0.03
OH-GLUTAMATO	0.05 + 0.005
OH-ASPARTATO	0.05 + 0.009
KAINATO	sin desplazamiento

Figura 17-

Farmacología de la unión de glutamato usando membranas congeladas de células de 16 días de cultivo a la temperatura de 37° C.

V.- D I S C U S I O N

Se ha considerado la posibilidad de que un mensajero se libere de la célula fotorreceptora y desencadene la actividad fagocítica del EPR. La taurina está presente en altas concentraciones en la retina y en el EPR, además de otros tejidos excitables como el SNC, el sistema cardiovascular y el músculo²⁴.²⁵.²⁷. A pesar de que a la taurina se le han adjudicado diversas acciones biológicas en estos órganos²⁴, se desconoce la función que pudiera llevar a cabo en el EPR. En el presente trabajo se demostró la existencia de la unión de taurina a células del EPR en cultivo primario. La unión a estos sitios fue independiente de Na^+ , aumentó después de congelar las membranas y fue óptima a temperatura fisiológica (37°C), con una $K_D=237\text{nM}$. El análisis cinético mostró la presencia de una sola población saturable de receptores de alta afinidad y baja capacidad (Fig. 12).

Asimismo, se demostró la presencia de receptores de L-glutamato, de alta afinidad ($K_D=333 \text{ nM}$) y saturables. El análisis de Scatchard indicó la presencia de una sola población de receptores tanto en los cultivos confluentes como en los no confluentes (Fig. 16).

Receptores a taurina: La taurina se ha propuesto como neurotransmisor en el SNC²².³²⁻³⁵ y en la retina³⁷.⁶⁹, ya que se libera por estímulos despolarizantes²⁰, además de ejercer un claro efecto inhibitor sobre las neuronas del SNC²⁴, y ser capturada por un mecanismo de alta afinidad y dependiente de Na^+ .²⁴. Sin embargo no se ha descubierto la existencia de

receptores que muestren las características descritas previamente para receptores postsinápticos.

En el organismo adulto, el EPR se encuentra en estrecha relación con la retina, y participa en algunas funciones comunes con ésta; asimismo se ha demostrado la influencia que ejerce el EPR en la organización de la retina durante su desarrollo¹, y con relación al desarrollo y diferenciación de los fotorreceptores, el transporte de taurina desde la sangre y a través del EPR hasta la retina parece ser esencial^{2, 76}. A este respecto, los trabajos de Scharschmidt y col.⁶³ indican que la membrana apical del EPR posee un mecanismo de cotransporte bidireccional taurina/Na⁺.

El EPR también participa en la regulación iónica en el espacio subretinal²⁹, de manera que una variación en la concentración de taurina aunada a un cambio en la concentración de K⁺, produce cambios en las propiedades eléctricas de las células epiteliales⁴⁷.

Por otra parte, la luz induce la liberación de taurina de los segmentos externos de los fotorreceptores⁶¹, y produce el desprendimiento de los discos⁵⁵ y su subsecuente fagocitosis por las células del EPR^{46, 62}. Debido a que la actividad retinal induce cambios en la concentración de taurina en el espacio subretinal, en este trabajo se ha tratado de determinar si este compuesto podría ejercer un efecto sobre el EPR a través de receptores específicos en la membrana.

En este trabajo las características de la unión de taurina a membranas del EPR semeja en algunos aspectos a las descritas en la corteza cerebral^{32, 40}, ya que la afinidad por el receptor es

similar (237 nM), aunque la capacidad máxima del sistema es mayor en el EPR (2.8 pmol/mg. de proteína) (Fig. 12). La unión es independiente de Na^+ y es más evidente en membranas congeladas (Fig. 11), lo cual está también de acuerdo con las características de los receptores sinápticos en el sistema nervioso central (SNC). Sin embargo la unión se incrementó al aumentarse la temperatura; esto podría deberse a una suma del efecto de los receptores de recaptación y los de la postsinápsis, en contra de lo que ocurre en el SNC, donde la unión a estos receptores disminuye un 80% por la congelación y depende de Na^+ . Para discernir entre los receptores de recaptación y los de tipo postsináptico, se comparó los resultados de este trabajo con los resultados obtenidos en sistemas de recaptación en células cultivadas de EPR durante la diferenciación (Salceda, en prensa), y se encontró que los resultados no son paralelos en el tiempo de desarrollo, lo que indica que los receptores descritos en el presente trabajo no son de recaptación.

Respecto a la especificidad de los receptores de taurina, puesto que la glicina y la estricnina desplazan eficientemente a la taurina (Fig. 13), con potencia similar a la de la taurina misma, podría sugerirse una interacción de la taurina con sistemas glicinérgicos, no obstante que en el SNC la taurina tiene una alta afinidad por los sitios de unión de estricnina- H^3 , pero no desplaza a la glicina- ^3H . Sin embargo, estos datos no excluyen la posibilidad de que la taurina y la glicina pudieran unirse a receptores distintos en el SNC y a un mismo receptor en el EPR. En apoyo de que los receptores de taurina en el EPR pudieran ser diferentes a los descritos en el SNC, se demostró que a diferen-

cia de lo que sucede en el SNC, donde la taurina desplaza al GABA de su receptor membranal³⁴ en nuestro sistema tanto el GABA como la bicuculina sólo desplazan a la taurina a altas concentraciones (Fig. 13).

El significado fisiológico de la presencia de receptores a taurina en el EPR diferentes a los sitios de captación, y también de sitios sinápticos reportados para otros aminoácidos en el SNC, no se ha aclarado. En el sarcoplasma de corazón, se ha demostrado la existencia de unión de taurina de manera independiente de Na^+ , la cual aumenta la afinidad del Ca^{++} por los fosfolípidos de la membrana²⁴. Estos resultados abren la posibilidad de que la taurina pudiera modular, a través de una modificación de los fosfolípidos, a proteínas membranales como serían otros receptores y canales iónicos en células de tejidos excitables.

Receptores a L-glutámico: El ácido glutámico se considera como el transmisor excitador más común en el SNC, ejerce su acción a través de receptores específicos en la membrana^{17, 26, 60}. En la retina se ha sugerido que pudiera ser el neurotransmisor liberado por los fotorreceptores, ya que además de encontrarse en altas concentraciones en la capa externa de la retina, numerosos experimentos electrofisiológicos demuestran su capacidad de despolarizar tanto a las neuronas de segundo como a las de tercer orden en la retina de diversas especies³⁷.

Los receptores para el ácido glutámico en la retina de pollo se han identificado y caracterizado bioquímicamente³⁸, de esta forma se demostró la presencia tanto de unión de glutámico dependiente de Na^+ y sensible a la congelación receptores de capta-

ción, como de unión independiente de Na^+ que no se afecta por la congelación con una $K_D=0.55 \mu\text{M}$, receptores postsinápticos. En el presente trabajo se encontró la unión de ácido L-glutámico- H^+ a membranas de células de EPR en cultivo primario, con características similares a las establecidas para receptores de tipo postsináptico en el SNC, la cual no se afecta por la congelación²⁰. Aunque la interacción no depende de Na^+ , la presencia de este ión aumenta la unión.

Aunque estos receptores comparten propiedades con los receptores sinápticos caracterizados en el SNC, tanto el efecto del Na^+ , que ya se mencionó, como su perfil farmacológico, sugieren un receptor diferente tanto de los postsinápticos para el L-glutamato, como de los receptores de recaptación para el mismo. Así la unión de ácido L-glutámico- H^+ se inhibe con GDEE y QA, los cuales interactúan con el receptor de L-glu de tipo quisquálico, y no por NMDA, 2-APV (agonista y antagonista de los receptores tipo NMDA) ni por KA (agonista de los receptores tipo KA), lo cual podría indicar que se trata de un receptor sináptico de tipo QA. Sin embargo, el L-aspartato (agonista del receptor tipo NMDA) es un inhibidor más potente que los anteriores (tipo QA), y también lo son los D-isómeros del glutamato y aspartato. Esto nos indica que el receptor no es estereoespecífico, lo cual está en desacuerdo con lo reportado para los receptores de QA en el SNC²¹. Por otra parte, dadas las condiciones del método del ensayo y la resistencia a la congelación, así como la independencia de Na^+ de los sitios que se estudiaron, es factible descartar la posibilidad de que se tratara de sitios de recaptación del

aminoácido. Esto queda reforzado desde el punto de vista farmacológico, por el hecho de que ni el 4-monohidroxamato del L-glutamato ni el 4-monohidroxamato del L-aspartato, inhibidores de la captación, inhibieron significativamente la unión de L-glu-H³ (Figura 17). Así pues, los resultados del presente trabajo sugieren que las células del EPR poseen receptores para L-glutamato, que además de ser específicos, muestran características bioquímicas y farmacológicas diferentes de las descritas para receptores tanto sinápticos como de captación para estos compuestos.

La aparición de los receptores para aminoácidos excitadores en la retina durante el desarrollo embrionario, muestra diferencias en cuanto a la edad en que se expresan y muestra cambios en su proporción relativa, afinidad y especificidad farmacológica⁶⁵. En los experimentos de este trabajo también se hallaron cambios en los dos estadios de diferenciación estudiados, en presencia de Na⁺ fue mayor la proporción de receptores en el estado no confluyente (16 DIV) que en el estado confluyente (25 DIV) (Fig. 15).

Respecto al posible significado fisiológico de la existencia de receptores específicos para taurina y L-glutamato en el EPR, los datos obtenidos están de acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo. Así los aminoácidos señalados podrían participar en la comunicación EPR-Retina, y particularmente en el fenómeno de la inducción de la fagocitosis de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores por parte del EPR.

Besharse y Spratt en 1988³ demostraron que el L-glutamato y algunos análogos de los aminoácidos excitadores, son capaces de inducir la fagocitosis; por sus características farmacológicas el receptor a través del cual se induce este efecto parece

corresponder al de tipo KA. Los resultados del presente trabajo estan en desacuerdo con esto, ya que el ácido kainico no tuvo efecto sobre la unión de L-glu-H³, a diferencia de otros agonistas como el QA o el NMDA (Fig. 17). Sin embargo, a diferencia del estudio anterior, la caracterización farmacológica se realizó en este trabajo a la edad de 16 días in vitro, el estado no confluyente del cultivo en el cual las células se hallan en estado no diferenciado, con forma fibroblástica. Si establecemos un paralelismo entre el desarrollo del EPR y la retina -ya que ambos tienen el mismo origen embrionario³ pueden incluso transdiferenciarse- nuestros datos indicarian que los receptores de kainato no se expresan en en el EPR sino hasta las etapas finales del desarrollo, en forma similar a lo que sucede en la retina⁶⁰.

Por otra parte, suponemos que si el EPR interviene en el proceso de diferenciación de la retina, estos receptores a ácido L-glutámico y taurina, pudieran mediar efectos tróficos durante el desarrollo embrionario para llevarse a cabo el correcto desarrollo de ambas estructuras.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- 1 - BARNSTABLE C, J., 1987. A molecular view of vertebrate retinal development. Mol Neurobiol 1:9-46.
- 2 - BASKIN, S. I., E. M. COHN y J. J. KOCSIS, 1976. Taurine changes in visual tissues with age. En Taurine editado por R. Huxtable y A. Barbeau. Raven Press, New York. Pags. 201-208.
- 3 - BESHARSE, J. C. y G. SPRATT, 1988. Excitatory amino acids and rod photoreceptor disc shedding: analysis using specific agonists. Exp Eye Res 47:609-620.
- 4 - BESHARSE, J. C. y D. A. DUNIS, 1983. Rod photoreceptor disc shedding in eye cups: relationship to bicarbonate and amino acids. Exp Eye Res 36:567-580.
- 5 - BRIDGES, C. D. B., S. L. FONG, G. I. LJOU, R. A. ALVAREZ y R. A. LANDERS, 1984. Transport, utilization and metabolism of visual cycle retinoids in the retina and pigment epithelium. En Progress in retinal research vol. 2. Editado por Newille Osborne y G. Chader. Pergamon Press. Pags. 137-162.
- 6 - CLARK, V. M., 1986. The cell biology of the retinal pigment epithelium. En The retina a model for cell biology studies. Parte II. Editado por R. Adler y D. Farber. Pags. 129-169.
- 7 - DAS, S. R. y P. GOURAS, 1988. Retinoid metabolism in cultured human retinal pigment epithelium. Biochem J 250:459-465.
- 8 - DEFOE, D. M., B. MATSUMOTO y J. C. BESHARSE, 1989. Cytochalasin D inhibits L-glutamate-induced disc shedding without altering L-glutamate-induced increase in adhesiveness. Exp Eye Res 48:641-652.
- 9 - DOWLING, J. E. y BOYCOTT, B. B., (1966). Organization of the primate retina electron microscopy. Proc R Soc Lond B 166:80-111.
- 10 - EDWARDS, R. B., 1977. Accumulation of taurine by cultured retinal pigment epithelium of the rat. Invest Ophthal 16:201-208.
- 11 - EDWARDS, R. B., 1981. The isolation and culturing of retinal pigment epithelium of the rat. Vision Res 21:147-150.
- 12 - FRICKE, V., 1975. Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100. Anal Biochem 63:555-558.
- 13 - FRIEDMAN, Z., S. F. HACKETT y P. A. CAMPOCHIARO, 1977. Characterization of adenylate cyclase in human retinal pigment epithelial cells in vitro. Exp Eye Res. 44:471-479.
- 14 - FRIEDMAN, Z., S. F. HACKETT y P. A. CAMPOCHIARO, 1988. Human

retinal pigment epithelial cell possess muscarinic receptors coupled to calcium mobilization. Brain Res 446:11-16.

15 - FRIEDMAN, Z., S. F. HACKETT, J. LINDEN y P. A. CAMPOCHIARO, 1989. Human retinal pigment epithelial cells in culture possess A_2 -adenosine receptors. Brain Res 492:29-35.

16 - FOSTER, A. C. y FAGG, G., 1984. Acid amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. Brain Res Rev 7:107-164.

17 - GAETANO DI CHIARA, M. D. y G. L. GESSA, (1981). Glutamate as a neurotransmitter. Raven Press. New York. 445 pp.

18 - HAYES, K. C., CAREY, R.E y SCHMIDT, S. Y. (1975). Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. Science 188:949-951.

19 - HELLER, J. y P. JONES, 1980. Purification of bovine retinal pigment epithelial cells by dissociation in calcium free buffers and centrifugation in ficoll density gradients followed by "recovery" in tissue culture. Exp Eye Res 30:481-487.

20 - HOLOPAINEN, I., P. KONTRÖ y S. S. OJA, Release of taurine from cultured cerebellar granule cells and astrocytes: correlate with glutamate. Neuroscience 29(2):425-432.

21 - HONORE, T., 1989. Excitatory amino acid receptor subtypes and specific antagonists. Medicinal Res Rev 9(1):1-23.

22 - HRUSKA, R. E., A. PADJEN, R. BRESSLER y H. I. YAMAMURA, 1978. Taurine: sodium-dependent, high-affinity transport into rat brain synaptosome. Mol Pharmacol 14:77-85.

23 - HUGHES, B. A., S. S. MILLER y T. E. MACHEN, 1984. Effects of cyclic AMP on fluid absorption and ion transport across frog retinal pigment epithelium. J Gen Physiol 83:875-899.

24 - HUXTABLE, R. J. y SEBRING, L. A., 1986. Towards a unifying theory for the actions of taurine. TIPS 7:481-485.

25 - HUXTABLE, R. J., 1989. Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine. Prog Neurobiol 32:471-533.

26 - JOHNSTON, G. A. R., 1979. Central nervous system receptors for glutamic acid. En Glutamic acid: advances in Biochemistry and Physiology. Editado por Filer L. J. Jr. Raven Press, New York. Pags. 177-185.

27 - KIRCHHOF, B., E. KIRCHHOF, S. J. RYAN y N. SORGENTE, 1988. Human retinal pigment epithelial cell cultures: phenotypic modulation by vitreous and macrophages. Exp Eye Res 47:457-463.

28 - KLINE, M. A. y M. A. ALI, 1981. Microtubules and 10 nm filament in the retinal epithelium during the diurnal light-dark-

cycle. Cell Tissue Res 214:397-405.

29 - KOH, S-W. M. y G. J. CHADER, 1984a. Agonist effects on the intracellular cyclic AMP concentration of retinal pigment epithelial cells in culture. J Neurochem 42:287-289.

30 - KOH, S-W. M. y G. J. CHADER, 1984b. Retinal pigment epithelium in culture demonstrates a distinct β -adrenergic receptor. Exp Eye Res 38:7-13.

31 - KOH, S-W. M. y G. J. CHADER, 1986. Cyclic AMP-linked neurotransmitter and neuropeptide receptors of the chick pigment epithelium. En Retinal signal systems, degenerations and Transplants. Editado por E. Agardh y B. Ehinger. Elsevier Science Publishers B. V. Biomedical Division. Pags. 115-125.

32 - KONTRÓ, P. y S. S. OJA, 1987a. Cooperativity in sodium-independent Taurine binding to brain membranes in the mouse. Neuroscience 23:567-570.

33 - KONTRÓ, P. y S. S. OJA, 1987b. Taurine and GABA release from mouse cerebral cortex slices: potassium stimulation releases more taurine than GABA from developing brain. Dev Brain Res 37:277-291.

34 - KONTRÓ, P. y S. S. OJA, 1988. Release of taurine, GABA and dopamine from rat striatal slices: mutual interactions and developmental aspects. Neuroscience. 24:49-58.

35 - KONTRÓ P. y S. S. OJA, 1989. Release of taurine and GABA from developing and adult mice. Neuroscience. 29(2):413-423.

36 - LOMBARDINI, J. B., 1977. High affinity uptake systems for taurine in tissue slices and synaptosomal fractions prepared from various regions of the rat central nervous system. Correction of transport data by different experimental procedures. J Neurochem 29:305-312.

37 - LAKE, N., J. MARSHALL y M. J. VOADEN, 1977. The entry of taurine into the neural retina and pigment epithelium of the frog. Brain Res 128:497-503.

38 - LOPEZ-COLOME, A. M. y H. PASANTES-MORALES, 1980. Taurine interactions with chick retinal membranes. J Neurochem 34(5):1047-1052.

39 - LOPEZ-COLOME, A. M., 1981. High-affinity binding of L-glutamate to chick retinal membranes. Neurochem Res 6(9):1019-1033.

40 - LOPEZ-COLOME, A. M. 1981. Taurine binding to membranes from rat brain regions. J Neurosci Res 6:475-485.

41 - LOPEZ-COLOME, A. M. 1982. Taurine receptors in CNS membranes. En Taurine in Nutrition and Neurology. Editado por

Hustable, R.J. y H. Pasantes-Morales. Plenum Publishing Corporation. Pags. 293-309.

42 - LOPEZ-COLOME, A. M. y F. SOMOHANO, 1982. Characterization of L-H aspartate binding to chick retinal subcellular fractions. Vision Res 22:1495-1501.

43 - LOPEZ-COLOME, A. M., 1986. Amino acids as excitatory transmitters in the retina. En: Excitatory amino acids. Editado por Peter J. Roberts. The Macmillan Press LTD, Londres. Pags. 143-157.

44 - LOWRY, O. H., N. R. ROSEBROUGH, A. L. FARR y R. L. RANDALL, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biochem 193:265-275.

45 - MARTELLY, I. y J. GAUTRON, 1988. Differential expression of acetylcholinesterase molecular forms in neural retinal and retinal pigmented epithelium during chick development. Brain Res 460:205-213.

46 - MATSUMOTO, B., D. M. DEFOE y J. C. BESHARSE, 1987. Membrane turnover in rod photoreceptors: ensheathment and phagocytosis of outer segment distal tips by pseudopodia of the retinal pigment epithelium. Proc R Soc Lond 230:339-354.

47 - MILLER, S. S. y R. H. STEINBERG, 1976. Transport of taurine, L-methionine and 3-o-methyl-D-glucose across frog retinal pigment epithelium. Exp Eye Res 23:177-189.

48 - MILLER, S. S. y R. H. STEINBERG, 1977a. Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium. Exp Eye Res 25:235-248.

49 - MILLER, S. S. y R. H. STEINBERG, 1977b. Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. J Membrane Biol 36:337-372.

50 - MILLER, S. S., R. H. STEINBERG y B. OAKLEY II, 1978. The electrogenic sodium pump of the frog retinal pigment epithelium. J Membrane Biol 44:259-279.

51 - MILLER, S. S. y R. H. STEINBERG, 1979. Potassium modulation of taurine transport across the frog retinal pigment epithelium. Gen Physiol 74:237-259.

52 - MILLER, S. S. y D. FARBER, 1984. Cyclic AMP modulation of ion transport across frog retinal pigment epithelium. J Gen Physiol 83:853-874.

53 - NGUYEN-LEGROS, J. 1978. Fine structure of the pigment epithelium in the vertebrate retina. En: International Review of Cytology. Suplemento 7. Pags. 287-328.

54 - OAKLEY, B. II, S. S. MILLER y R. H. STEINBERG, 1978. Effect

of intracellular potassium upon the electrogenic pump of frog retinal pigment epithelium. J Membrane Biol 44: 281-307.

55 - OGINO, N., M. MATSUMURA, H. SHIRAKAWA y I. TSUKAHARA, 1983. Phagocytic activity of cultured retinal pigment epithelial cells from chick embryo: inhibition by melatonin and cyclic AMP, and its reversal by taurine and cyclic GPM. Ophthalmic Res 15:72-89.

56 - OKA, M. S., R. A. LANDERS y C. D. B. BRIDGES, 1984. A serum-free defined medium for retinal pigment epithelial cells. Exp Cell Res 154:537-547.

57 - PASANTES-MORALES, H., 1986. Current concepts on the role of taurine in the retina. En Progress in retinal research. Editado por N. Osborne and J. Chader. Pergamon Press, Oxford and New York. Pags. 207-229.

58 - PASANTES-MORALES, H. y C. CRUZ, 1984. Protective effect of taurine and zinc on peroxidation-induced damage in photoreceptor outer segments. J Neurosci Res 11:303-311.

59 - RAPP, L. M. y T. P. WILLIAMS, 1980. The role of ocular pigmentation in protecting against retinal light damage. Vision Res 20:1127-1131.

60 - ROBERTS, P. J., 1981. Binding studies for the investigation of receptors for L- glutamate and other excitatory amino acids. En Glutamate: transmitter in the central nervous system. Editado por P. J. Roberts, J. Storm-Mathisen y G. A. R. Johnston. Pags. 35-54.

61 - SALCEDA, R., A. M. LOPEZ-COLOME y H. PASANTES-MORALES, 1977. Light-stimulated release of [³⁵S]taurine from frog retinal rod outer segments. Brain Res 135:186-191.

62 - SALCEDA, R., A. CARABEZ, P. PACHECO y H. PASANTES-MORALES, 1979. Taurine levels, uptake and synthesizing enzyme activities in degenerated rat retina. Exp Eye Res 28:137-146.

63 - SCHARSCHMIDT, B. F., E. R. GRIFF y R. H. STEINBERG, 1988. Effect of taurine on the isolated retinal pigment epithelium of the frog: electrophysiologic evidence for stimulation of an apical, electrogenic Na⁺-K⁺ pump. J Membrane Biol 106:71-81.

64 - SNYDER, S. H. y J. P. BENNETT, JR., (1976). Neurotransmitter receptors in the brain: biochemical identification. Pags. 153-175.

65 - SOMOHANO, F., P. J. ROBERTS y A. M. LOPEZ-COLOME, 1988. Maturational changes in retinal excitatory amino acid receptors. Dev Brain Res 42:59-67.

66 - STURMAN, J. A., G. y WEN, H. M. WISNIEWSKI y M. D. NEURINGER, 1984. Retinal degeneration in primates raised on a synthetic human infant formula. Int J Devl Neuroscience 2(2):121-

67 - TAMAI, M. y G. J. CHADER, 1979. The early appearance of disc shedding in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 18(9):913-917.

68 - TSUNEMATSU, Y., M. FUNAHSHI y A. NAKAJIMA, 1981. Electron microscopic analysis of phagocytic activity of chick embryonic retinal pigment cells in vitro. Develop Growth Differ 23:313-319.

69 - VOADEN, M. J., N. LAKE, J. MARSHALL y B. MORJARIA, 1977. Studies on the distribution of taurine and other neuroactive amino acids in the retina. Exp Eye Res 25:249-257.

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

71 - VOLLMER, G. y P. G. LAYER, 1986. An in vitro model of proliferation and differentiation of the chick retina: coaggregates of retinal and pigment epithelial cells. J Neurosci 6:1885-1896.

72 - WATKINS, J. C. y R. H. EVANS, 1981. Excitatory amino acid transmitters. Ann Rev Pharmacol Toxicol 21: 165-204.

73 - WELEBER, R. G. y A. EISNER, 1988. Retinal function and physiological studies. En Retinal dystrophies and Degenerations. Editado por David A. Wewsome. Raven Press. New York.

74 - WERMAN, R., 1966. Criteria for identification of a central nervous system transmitter. Comp Biochem Physiol 18:745-766.

75 - YOUNG, R. W., 1976. Visual cells and the concept of renewal. Invest Ophthalmol 15(9):700-725.

76 - ZINN, K. M. y M. F. MARMOR, 1979. The retinal pigment epithelium. Harvard University Press: U. K. 521 pp.