

UNIVERSIDAD AUSTRAL

Facultad de Ciencias Biomédicas



**PAPEL DEL SISTEMA ENDOTELINÉRGICO EN LOS
PROCESOS NEURODEGENERATIVOS DE LA RETINA**

Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Autora: Lic. Ana Vanesa Torbidoni

Directora: Dra. Angela M. Suburo

Pilar, Buenos Aires, 2009

AGRADECIMIENTOS

A mis queridas amigas, por estar siempre ahí. Por tantos momentos para el buen recuerdo. Por hacer las cosas más llevaderas, hasta las más difíciles y por soportar mis ausencias.

A mi familia, por siempre tratar de estar y confiar en mí.

A Gero por aparecer y acompañarme en esta última parte. Por tanta ayuda en tan poco tiempo.

A Damián, por 5 años de compartir buenas y malas.

A mis compañeros de laboratorio, por las alegrías diarias y el compañerismo.

A Soledad Arregui y Guillermo Gastón por su fundamental ayuda en el trabajo de laboratorio y bioterio.

A Carla Ragghianti, Liliana Diaz, David Merlo y a todos los que integran Licengen por su ayuda con la bibliografía.

Al Dr. Villar por sus buenas palabras de siempre.

A la Dra. Angela Suburo por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A la Universidad Austral.

**ESTA TESIS FUE FINANCIADA CON EL APORTE DE LAS
SIGUIENTES INSTITUCIONES:**

UNIVERSIDAD AUSTRAL

**CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TÉCNICAS (CONICET)**

**AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y
TECNOLÓGICA (AGENCIA)**

**FUNDACIÓN MÉDICA DE SALUD VISUAL Y REHABILITACIÓN
(FUSAVI)**

LABORATORIOS ROEMMERS

ESTA TESIS ESTA BASADA EN LAS SIGUIENTES PUBLICACIONES:

Endothelin receptors: do they have a role in retinal degeneration?

Torbidoni V, Iribarne M, Suburo AM.

Adv Exp Med Biol. 2008; 613:399-405.

Endothelin receptors in light-induced retinal degeneration.

Torbidoni V, Iribarne M, Suburo AM.

Exp Biol Med (Maywood). 2006 Jun; 231(6):1095-100.

Endothelin-1 and endothelin receptors in light-induced retinal degeneration.

Torbidoni V, Iribarne M, Ogawa L, Prasanna G, Suburo AM.

Exp Eye Res. 2005 Sep; 81(3):265-75.

ÍNDICE

RESUMEN	14
----------------	-----------

ABSTRACT	16
-----------------	-----------

<u>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	18
--	-----------

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA RETINA	18
---	-----------

ESTRUCTURA	18
------------	----

FOTOTRANSDUCCIÓN	20
------------------	----

VÍAS NEURALES INTRARRETINALES	20
-------------------------------	----

CÉLULAS GLIALES DE LA RETINA	23
------------------------------	----

IRRIGACIÓN DE LA RETINA	23
-------------------------	----

DEGENERACIONES DE LA RETINA Y SU IMPORTANCIA MÉDICA	25
--	-----------

FOTOTOXICIDAD COMO MODELO ANIMAL DE LA DEGENERACIÓN DE LOS	
--	--

FOTORRECEPTORES	26
-----------------	----

LAS ENDOTELINAS	29
------------------------	-----------

SÍNTESIS Y PROCESAMIENTO	29
--------------------------	----

RECEPTORES ENDOTELINÉRGICOS	30
-----------------------------	----

ENDOTELINAS EN EL ENDOTELIO VASCULAR	31
--------------------------------------	----

ENDOTELINAS EN EL SISTEMA NERVIOSO	32
------------------------------------	----

OBJETIVOS GENERALES	36
----------------------------	-----------

<u>CAPÍTULO 2: MATERIAL Y MÉTODOS</u>	38
--	-----------

EL MODELO DE INJURIA RETINAL POR ILUMINACIÓN EXCESIVA	38
--	-----------

PROCEDIMIENTO	39
---------------	----

MÉTODOS PARA CARACTERIZAR EL EJE ENDOTELINÉRGICO	39
---	-----------

INMUNOHISTOQUÍMICA	39
--------------------	----

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE IMÁGENES	45
-----------------------------------	----

RT-PCR	45
--------	----

ESTUDIO DE LESIONES DE LA RETINA	48
---	-----------

MUERTE CELULAR	48
ACTIVACIÓN GLIAL Y GLIOSIS	50
RATONES TRANSGÉNICOS	51

CAPÍTULO 3: EL EJE ENDOTELINÉRGICO EN LA RETINA MURINA **52**

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES	52
RESULTADOS	52
LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE ET-1 Y SUS PRECURSORES EN LA RETINA NORMAL	52
INMUNORREACTIVIDAD ET-3 EN LA RETINA NORMAL	54
RECEPTORES ENDOTELINÉRGICOS EN LA RETINA NORMAL	54
MOLÉCULAS ENDOTELINÉRGICAS EN EL NERVIÓ ÓPTICO	55
ARNMS ENDOTELINÉRGICOS EN LA RETINA NORMAL	56
DISCUSIÓN	57
MOLÉCULAS ENDOTELINÉRGICAS EN EL EP	58
MOLÉCULAS ENDOTELINÉRGICAS EN LA CPE	58
CÉLULAS GANGLIONARES, ASTROCITOS Y VASOS SANGUÍNEOS	59
ENDOTELINA EN EL NERVIÓ ÓPTICO	60

CAPÍTULO 4: MOLÉCULAS ENDOTELINÉRGICAS EN LA DEGENERACIÓN INDUCIDA POR LUZ **62**

INTRODUCCION Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
RESULTADOS	64
CARACTERÍSTICAS DEL PROCESO DEGENERATIVO	64
MODIFICACIONES DEL SISTEMA ENDOTELINÉRGICO ASOCIADAS A LA INJURIA LUMINOSA	66
DISCUSIÓN	70

CAPÍTULO 5: BLOQUEO DE LOS RECEPTORES ENDOTELINÉRGICOS EN LA INJURIA LUMINOSA **74**

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	74
DISEÑO EXPERIMENTAL	76
RESULTADOS	77

CASPASA-3 CLIVADA	77
GLIOSIS	78
DISCUSIÓN	80

CAPÍTULO 6: VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR AFECTADAS POR EL EJE ENDOTELINÉRGICO **82**

INTRODUCCIÓN	82
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA MUERTE	82
EL PAPEL DE LAS ENDOTELINAS	83
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	84
DISEÑO EXPERIMENTAL	84
RESULTADOS	85
INMUNODETECCIÓN DE P-JNK	85
INMUNODETECCIÓN DE P-C-JUN	85
INMUNODETECCIÓN DE P-ERK 1/2	87
INMUNODETECCIÓN DE C-FOS	88
DISCUSIÓN	89

CAPÍTULO 7: SOBREEXPRESIÓN ENDOTELIAL DE ET-1: EFECTOS SOBRE LA RETINA **94**

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	94
DISEÑO EXPERIMENTAL	95
RESULTADOS	97
RATONES DE 2 MESES	97
DISTRIBUCIÓN DE ET-1 Y GFAP EN RETINAS ENTERAS	97
DISTRIBUCIÓN DE ET-1 Y GFAP EN CORTES DE RETINA	97
CÉLULAS CONTRÁCTILES DE LA RETINA	98
DISCUSIÓN	100

CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES GENERALES **104**

REFERENCIAS	108
--------------------	------------

RESUMEN

Las tres endotelinas, ET-1, ET-2 y ET-3, son péptidos de 21 aminoácidos que intervienen en el control de la supervivencia y muerte de distintos tipos celulares. Cuando comenzamos este trabajo de tesis, algunos indicios sugerían que estas moléculas podían estar relacionadas a las enfermedades de la retina. Nada se sabía de su participación en la degeneración de los fotorreceptores inducida por luz, un modelo experimental que simula la degeneración macular asociada con la edad (DMAE), una importante causa de ceguera.

Los objetivos planteados fueron: Evaluar la distribución de ET-1, sus precursores, Big-ET-1, Prepro-ET-1 y los receptores ETR-A y ETR-B en la retina normal, para luego estudiar las modificaciones de estas moléculas en retinas expuestas a niveles tóxicos de iluminación. Para verificar la asociación entre las moléculas endotelinérgicas y las lesiones de la retina, se resolvió estudiar el curso de la degeneración en presencia de un bloqueante de los receptores endotelinérgicos (Tezosentan) y analizar la acción de este fármaco sobre las señales de estrés activadas por la injuria luminosa. Finalmente, utilizamos un ratón transgénico para comprobar algunas hipótesis emergentes de nuestros estudios.

Descubrimos que la ET-1 y sus receptores ETR-A y ETR-B aparecían en una misma célula, o bien en células vecinas. Es decir, identificamos en la retina circuitos endotelinérgicos autocrinos y paracrinos. Los más importantes fueron los asociados al epitelio pigmentario (EP), las sinapsis de la capa plexiforme externa (CPE) y el complejo vasculo-glio-neuronal de la retina interna. Todos estos circuitos reaccionaron ante la exposición a niveles excesivos de luz, en la retina externa se asociaron a la muerte de los fotorreceptores, mientras que en la retina interna participaban en la gliosis que acompaña a este proceso. El tratamiento anti-endotelinérgico de los animales expuestos disminuyó los niveles de caspasa 3 clivada, un marcador de apoptosis en los fotorreceptores, y la gliosis reactiva.

Por otra parte, la exposición a la luz modificó la activación de las MAP quinasas (JNK y ERK 1/2) y algunos de sus blancos, c-Jun y c-fos. La mayor activación se observó en las células de Müller. El tratamiento con tezosentan modificó esta

activación, en forma selectiva para cada fenotipo retinal afectado. En la mayor parte de las células, el efecto fue positivo, sugiriendo una acción promotora de la sobrevida.

Los ratones transgénicos, que hiperexpresaban ET-1 en el endotelio vascular, permitieron analizar con más detalle el complejo vasculo-glio-neuronal de la retina interna. Descubrimos que la remodelación hipertrófica de la túnica media de los vasos retinianos era mucho más lenta que la de los vasos periféricos. Nuestras observaciones sugieren que esta diferente evolución puede atribuirse a la capacidad de los astrocitos de regular los niveles de endotelina en el espacio extracelular de la retina.

Nuestros hallazgos sugieren que es de interés biomédico producir fármacos capaces de regular selectivamente los niveles de endotelina en la retina. Esto permitiría contar con nuevas herramientas para la prevención y tratamiento de las enfermedades degenerativas de la retina de distinta etiología, entre ellas la DMAE y las retinopatías de origen vascular.

ABSTRACT

The three endothelins, ET-1, ET-2 and ET-3, are 21 aminoacid peptides involved in the control of survival and death of different cellular phenotypes. When this thesis project was begun, available evidence suggested that these molecules could be related to retinal diseases. Nothing was known about light-induced photoreceptor degeneration, an experimental model that reproduces age-related macular degeneration (ARMD), a major cause of blindness. We completed the following aims. An evaluation of retinal localization of ET-1, its precursors Big-ET-1, Prepro-ET-1 and its receptors ETR-A and ETR-B in normal mice. A study of the modifications of these molecules in retinas exposed to toxic light levels, and the analysis of the course of degeneration in the presence of an antagonist of endothelinergic receptors (tezosentan). In addition, we tested the effects of tezosentan on the activation of stress signaling molecules induced by toxic levels of light. Finally, we used a transgenic mouse to verify some new hypotheses emerging from our studies.

We discovered that ET-1 and its receptors ETR-A and ETR-B appeared either in the same or neighbouring retinal cells. In other words, we identified retinal autocrine and paracrine endothelinergic loops. Most important loops were those related to the pigment epithelium (PE), synapses of the outer plexiform layer (OPL) and to the vascular-glial-neuronal complex of the inner retina. All these loops responded to light injury. In the outer retina they were associated to death of photoreceptor cells, whereas in the inner retina they were involved in gliosis. Anti-endothelinergic treatment in light-exposed animals reduced the levels of cleaved-caspase 3, a marker of photoreceptor apoptosis, and the reactive gliosis. On the other hand, light exposure modified the activation of MAP kinases (JNK y ERK 1/2) and their targets, c-Jun and c-fos. Largest activation occurred in Müller glial cells. Tezosentan treatment selectively modified the activation pattern of each retinal phenotype. Most cells showed a positive effect, suggesting a survival promotion action.

Transgenic mice hyperexpressing ET-1 in the vascular endothelium allowed a deeper analysis of the vascular-glial-neuronal complex of the inner retina. We discovered that hypertrophic remodeling of the middle tunic in retinal vessels occurred at a much slower rate than in peripheral vessels. Our observations suggest that the different time course could be attributed to astrocytes and their role as buffers regulating endothelin levels in the extracellular space of the retina.

Our findings suggest that selective regulation of endothelin levels in the retina could be beneficial in the prevention and treatment of retinal degenerative diseases, such as DMAE and vascular retinopathies.

Capítulo 1

Introducción general

Características generales de la retina

Estructura

La retina es una extensión del Sistema Nervioso Central (SNC) que recibe información luminosa del medio exterior y proyecta información visual hacia el cerebro. Posee gran complejidad estructural, bioquímica y fisiológica, y está formada por dos láminas estrechamente adheridas: la retina neural (RN) y el epitelio pigmentario (EP).

Los fotorreceptores, neuronas especializadas capaces de transducir los estímulos de luz-oscuridad en una señal eléctrica, constituyen la primera estación de la vía visual. Se encuentran en la capa más externa de la RN y se conectan con otras neuronas retinales que forman sucesivas estaciones de la vía visual: células bipolares, amarrinas y ganglionares. Los cuerpos celulares y núcleos de estas neuronas se ubican de manera ordenada en capas bien definidas (Fig. 1.1). La más externa (Capa Nuclear Externa o CNE) corresponde a los núcleos de las células fotorreceptoras. Le sigue la Capa Nuclear Interna (CNI), que contiene los núcleos de células bipolares, horizontales, amarrinas y células de Müller. Las células ganglionares integran la capa más interna de la retina (CCG). Sus axones, que comunican a la retina con los centros visuales subcorticales, forman la capa de fibras del nervio óptico (FNO), casi en contacto con el humor vítreo.

Las conexiones entre fotorreceptores y células bipolares se establecen en la Capa Plexiforme Externa (CPE), ubicada entre las capas nucleares CNE y CNI. En la Capa Plexiforme Interna (CPI) se encuentran las conexiones entre células bipolares, amarrinas y ganglionares (Dacey, 1999).

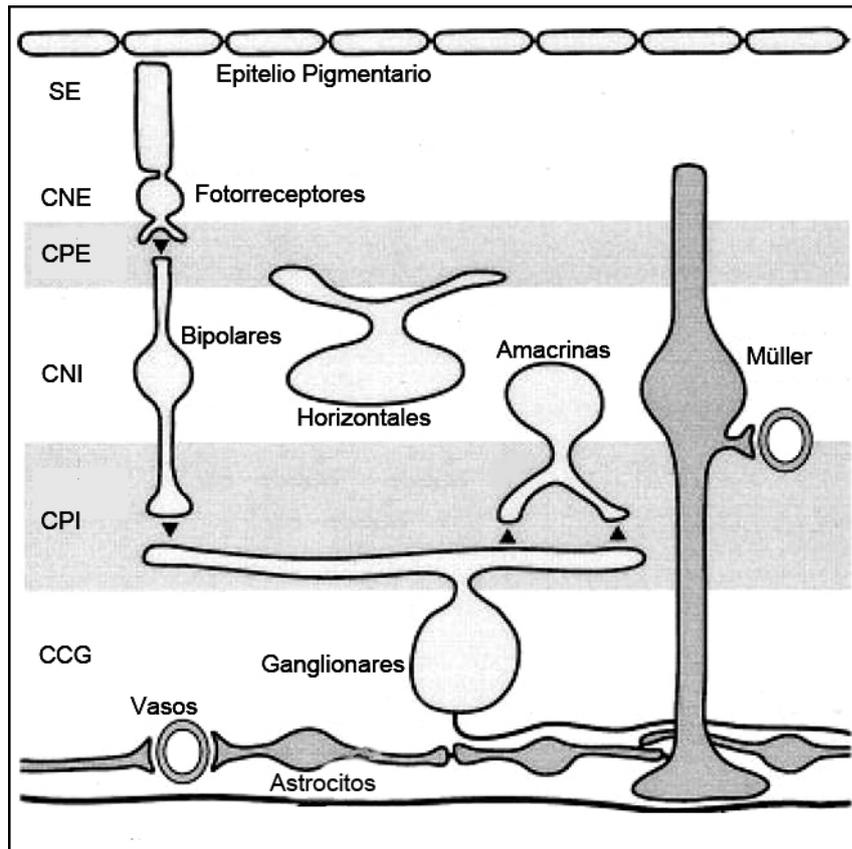


Fig. 1.1. Esquema que muestra los distintos tipos neuronales y gliales de la retina, y su ubicación en las capas nuclear externa (CNE), plexiforme externa (CPE), nuclear interna (CNI), plexiforme interna (CPI) y en la capa de células ganglionares (CCG).

Los fotorreceptores, también conocidos como células visuales, son de dos tipos. Los bastones, especialmente sensibles a muy bajas intensidades de luz, y los conos, con fotopigmentos sensibles a distintas longitudes de onda, que constituyen la base de la visión de los colores. Los primeros son responsables de la visión fotópica, mientras que los segundos lo son de la visión escotópica (Wassle, 2004, Peichl, 2005). Ambos tipos de fotorreceptores poseen una estructura altamente polarizada, con un segmento externo que contiene los pigmentos visuales, un segmento interno que contiene mitocondrias y otras organelas celulares, un cuerpo donde se ubica el núcleo, y por último, una prolongación que hace sinapsis con las células bipolares y horizontales.

En el segmento externo encontramos discos membranosos apilados que contienen la opsina, el pigmento visual fotosensible, junto con otras proteínas necesarias para el proceso de fototransducción. El segmento externo está en íntima asociación con la matriz interfotorreceptora y las células del EP, cuyas microvellosidades se interdigitan alrededor de los segmentos externo (Iribarne y col., 2007).

Fototransducción

La vía de transmisión de una señal visual comienza en el segmento externo de los fotorreceptores, donde se encuentra el pigmento rodopsina, formado por la opsina más el 11-cis-retinal. Al ser excitado por la energía lumínica, el 11-cis-retinal es convertido a todo-trans-retinal, con consiguiente cambio conformacional de la opsina, que se comporta como un receptor acoplado a una proteína G. La proteína G heterotrimérica activada es la transducina, que a su vez activa a una fosfodiesterasa específica de nucleótidos. La acción enzimática de la fosfodiesterasa reduce los niveles de GMP cíclico, se cierran los canales sensibles a nucleótidos cíclicos (Fain y col., 2001). Estos canales son permeables a cationes, aunque el principal cation afectado es el Ca^{2+} . Cuando los canales se cierran se reduce el Ca^{2+} intracelular (Fain y col., 2001). En última instancia, la célula se hiperpolariza y queda bloqueada la liberación del neurotransmisor, el glutamato (Hisatomi y Tokunaga, 2002).

Vías neurales intrarretinales

Conos y bastones difieren también en cuanto a sus terminales sinápticos, que figuran entre las sinapsis más complejas del SNC. El pedículo de los conos posee invaginaciones o bolsillos donde se insertan uno o dos terminales de una neurona bipolar y dos terminales laterales de una neurona horizontal. Estas estructuras se denominan tríadas. Los pedículos también forman sinapsis no invaginantes con otras bipolares. En total, cada pedículo de cono se conecta con dos tipos de células horizontales y con 8 tipos de bipolares (Wassle, 2004). En los bastones, el

terminal sináptico o esférula, posee una invaginación donde ingresan dos terminales de las células horizontales y entre 1 y 3 terminales de las células bipolares. Cada pedículo se conecta con unas pocas bipolares de una sola clase.

Los conos responden a señales luminosas con diferentes grados de hiperpolarización que determinan la liberación de distintas cantidades del neurotransmisor glutamato. El neurotransmisor es liberado en gran cantidad en oscuridad y su liberación cesa en condiciones de iluminación. Las células bipolares que contactan con los conos se clasifican según la información que transmiten en bipolares ON y bipolares OFF. Los contactos invaginantales solo contienen bipolares ON, mientras que en la base contactan las bipolares OFF. Todas las bipolares poseen receptores glutamatérgicos, aunque de distinto tipo. Las bipolares ON presentan receptores metabotrópicos mGluR(6), y las OFF tienen receptores ionotrópicos, tanto AMPA como Kainato (Renteria y col., 2006). Ante el estímulo luminoso que reduce la liberación de glutamato, las bipolares ON se despolarizan, mientras que las bipolares OFF se hiperpolarizan (Werblin y Dowling, 1969, Werblin, 1991). Se inician así dos circuitos intrarretinales, la vía ON y la vía OFF, que confluyen en distintas células ganglionares (CG). Las bipolares de cono OFF transfieren su señal por medio de sinapsis excitatorias con las ganglionares OFF, mientras que las bipolares ON hacen lo mismo con las ganglionares ON. Es decir, que las ganglionares OFF son excitadas por estímulos más oscuros que el fondo, mientras que las ganglionares ON lo son por estímulos más brillantes que el fondo (Wassle, 2004, Renteria y col., 2006).

Cada tipo de bipolar termina selectivamente en estratos definidos de la CPI. Los más externos corresponden a los contactos entre bipolares OFF y ganglionares OFF. En la mitad más interna de la CPI, establecen contacto las bipolares ON con las ganglionares ON (Ivanova y Muller, 2006).

Los bastones también liberan glutamato en la oscuridad. En la luz se hiperpolarizan y ya no liberan su neurotransmisor. Existe una única bipolar de bastones, de tipo ON, que también posee el receptor metabotrópico mGluR6. Estas bipolares se despolarizan en condiciones de iluminación. Sus terminales

axónicos se encuentran en el estrato más interno de la CPI, en las cercanías del cuerpo de las CG. Sin embargo, no hacen una sinapsis directa con estas últimas sino que contactan con las células amacrinas de tipo II (Strettoi y col., 1994), que suman señales provenientes de muchas bipolares de bastones. Las amacrinas de tipo II forman sinapsis eléctricas (uniones de hendidura) sobre los terminales axónicos de las bipolares de conos ON, y sinapsis químicas inhibitorias sobre los axones de las bipolares de conos OFF (Strettoi y col., 1994). A su vez, estas bipolares se conectan con las respectivas ganglionares ON y OFF (Tsukamoto y col., 2001, Wassle, 2004). La vía de los bastones es la más sensible y tiene la capacidad de detectar señales pequeñas de solo un fotón (Wassle, 2004).

Las células horizontales contactan con el pedículo de los conos con sus dendritas laterales, en tanto que su terminal axónico contacta con la esférula de los bastones. Las células horizontales reciben una mezcla de señales provenientes de los conos y de los bastones y desempeñan un papel esencial para la adaptación de los fotorreceptores a diferentes niveles de iluminación ambiental (Trumpler y col., 2008). Sin embargo, todavía no se conocen los mecanismos neuroquímicos que controlan la transmisión de las señales en las horizontales. Los terminales de las células horizontales liberan el neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA), sin embargo, no se han detectado receptores GABAérgicos en los fotorreceptores (Wassle, 2004). Las células horizontales también podrían influir sobre los fotorreceptores mediante la regulación de los niveles de calcio, ya fuese por vía de uniones de hendidura o mediante cambios de pH en el espacio sináptico (Wassle, 2004).

Todos los circuitos retinianos terminan en las neuronas eferentes, las CG, próximas a la superficie vítrea de la retina, cuyos axones se dirigen hacia la papila, donde se reúnen para formar el nervio óptico. Dichas fibras establecen la conexión entre la retina y el cerebro (Rodieck, 1979). Cabe señalar que la CCG incluye algunas células amacrinas desplazadas, que no pueden diferenciarse morfológicamente de las células ganglionares (Cellerino y col., 1999).

Células gliales de la retina

La retina de casi todos los mamíferos posee dos tipos principales de células gliales: los astrocitos y las células de Müller (Newman y Zahs, 1997, Ceelen y col., 2001). Los primeros están confinados a la capa de fibras nerviosas en la superficie vítrea de la retina. Actúan como intermediarios entre los vasos del plexo interno de la retina, por un lado, y las células ganglionares y sus axones, por el otro. Las células de Müller se extienden en todo el espesor apico-basal de la retina neural, desde la capa de fotorreceptores hasta la superficie vítrea. Esta localización les permite actuar como eslabón metabólico entre la retina externa y la interna (Newman y Reichenbach, 1996). Las prolongaciones externas de las células de Müller, adheridas entre sí y con el cuerpo de los fotorreceptores por medio de uniones estrechas, forman la membrana limitante externa (MLE). Las prolongaciones internas, adheridas solo por una cubierta tipo glucocáliz, forman la membrana limitante interna (MLI). Los núcleos de las células de Müller se ubican en la CNI. Al igual que los astrocitos, las células de Müller interactúan con los vasos de los plexos vasculares retinianos y contribuyen al establecimiento de la barrera hémato-retinal (García y col., 2004, Kim y col., 2006).

Irrigación de la retina

La retina externa, que incluye desde los fotorreceptores hasta la CPE inclusive, y la retina interna, que abarca desde la CNI hasta la superficie vítrea, no sólo se caracterizan por una diferente composición neuronal, sino también por una distinta organización vascular y metabólica.

La retina externa se nutre indirectamente a partir de la coroides. Los nutrientes que circulan en los capilares fenestrados de la coriocapilaris deben atravesar la membrana basal subyacente, la membrana de Bruch, y el epitelio pigmentario, antes de llegar a los fotorreceptores. Las células del EP unidas mediante uniones estrechas, constituyen la barrera hemoretinal externa, que limita el pasaje de sustancias hacia los fotorreceptores (Cunha-Vaz, 2004, Steuer y col., 2005).

Por el contrario, la retina interna es directamente irrigada por ramas de la arteria central de la retina. Esta ingresa por la papila del nervio óptico y sus ramas se distribuyen en un plexo interno, asociado a las células ganglionares y sus fibras, un plexo intermedio, asociado a la CNI, y un plexo externo, asociado a la CPE (Blanks y Johnson, 1986, Wang y col., 2000). La unión mediante uniones estrechas de las células endoteliales otorga a los capilares retinianos la capacidad de barrera hematoretinal interna (Cunha-Vaz, 2004, Steuer y col., 2005). Los astrocitos, las células de Müller, y los pericitos, que rodean a los vasos retinianos, contribuyen al correcto funcionamiento de la barrera hematoretinal interna (Cunha-Vaz, 2004).

Los pericitos se encuentran por fuera de la pared vascular, pero incluidos en su membrana basal (Kaur y col., 2008, Kaur y Ling, 2008). Poseen propiedades contráctiles, y en la retina son mucho más abundantes que en el cerebro. En la retina humana, la relación entre pericitos y células endoteliales es de 1:1 (Frank y col., 1990, Sims, 1991). Los pericitos regulan el tono vascular, mantienen la pared de los capilares, sintetizan y secretan factores vasoactivos, secretan material extracelular y tienen actividad fagocítica (Shepro y Morel, 1993).

Los astrocitos tanto en la retina como en el cerebro, rodean los pequeños vasos a través de prolongaciones citoplasmáticas (Kaur y col., 2008). Esta interacción entre las células endoteliales y los astrocitos sería primordial tanto para el desarrollo como para el mantenimiento de las barreras hematoneurales y sus eventuales alteraciones. In vitro, los astrocitos pueden inducir propiedades de barrera en células endoteliales provenientes de tejidos no neurales (Janzer y Raff, 1987) y neurales (Gardner y col., 1997, Choi y Kim, 2008).

Las células de Müller también contactan con prolongaciones citoplasmáticas los capilares de los plexos intraretinianos (Kaur y col., 2008, Kaur y Ling, 2008). Estas células secretan factores que afectan las propiedades de barrera de los plexos intraretinianos en situaciones de hipoxia e inflamación (Eichler y col., 2000), lo que permite asegurar que son importantes elementos en la fisiología y la patología de la barrera hematoretinal interna.

Degeneraciones de la retina y su importancia médica

Entender los procesos que desencadenan y mantienen las lesiones de las enfermedades neurodegenerativas es uno de los desafíos más grandes de las neurociencias. Una de las características del tejido nervioso que fomentan esta búsqueda es la irreversibilidad de los procesos neurodegenerativos y la incapacidad de reemplazar las neuronas perdidas. En la retina, diversas son las causas que determinan la degeneración de sus células resultando en la ceguera o severas limitaciones de la visión. En términos epidemiológicos, las principales causas de ceguera se encuentran en las degeneraciones neurovasculares causadas por la diabetes, el glaucoma y la degeneración macular asociada con la edad (DMAE) (Rosenberg y Sperazza, 2008), que son de origen multifactorial. Las degeneraciones de origen genético, aunque de menor prevalencia, constituyen un grupo importante, tanto por la cantidad de personas afectadas como por su contribución al conocimiento de los mecanismos de sobrevivencia y muerte de los fotorreceptores.

Cada una de estas enfermedades afecta a distintos componentes de la retina, y podemos agruparlas en aquellas que conducen a lesiones de la retina externa, es decir de las células visuales o fotorreceptores, y las que llevan a la pérdida de la retina interna, donde mueren las células ganglionares que deben llevar la información visual desde la retina. En esta Tesis nos ocuparemos específicamente de las degeneraciones que afectan a los fotorreceptores. Cabe señalar que, aunque ya contamos con buena evidencia que indica la no lejana posibilidad de utilizar células de reemplazo (MacLaren y Pearson, 2007) sigue siendo de mayor importancia encontrar tratamientos que permitan prevenir la muerte de las neuronas retinales sometidas a distinto tipo de injurias (MacLaren y col., 2006). La evidencia preclínica demuestra que estos tratamientos son posibles, aunque todavía no han alcanzado un nivel aceptable de uso clínico (Humayun y col., 2000). Por lo tanto, es acuciante conocer los mecanismos que permitan reducir el daño provocado por agentes ambientales o genéticos y o eventualmente contribuir a aumentar las posibilidades intrínsecas de reparación de la retina.

Fototoxicidad como modelo animal de la degeneración de los fotorreceptores

La retina ha evolucionado para captar de manera eficiente los fotones e iniciar la transducción de la señal visual. Sin embargo la retina es vulnerable al daño por luz. El daño fotoquímico actúa directamente sobre el fotorreceptor. Afecta a distintas etapas del proceso visual, como la vía de transducción de la señal luminosa, el reciclaje y renovación de la rodopsina, la generación de especies reactivas del oxígeno.

El proceso de muerte de los fotorreceptores inducida por luz ha sido extensamente estudiado (Organisciak y col., 1987, Abler y col., 1996, Marti y col., 1998, Reme y col., 2000, Wu y col., 2006a). El daño de los fotorreceptores está mediado por la rodopsina y depende de los niveles de iluminación y el tiempo de exposición (Organisciak y col., 1989). Bajo las mismas condiciones de exposición, las ratas que han sido criadas en la oscuridad muestran severas lesiones de los fotorreceptores y del EP adyacente, mientras que las criadas bajo iluminación leve, cíclica, solo muestran pérdida de los fotorreceptores, sin mayor lesión del EP (Organisciak y col., 1990). La lesión comienza en los segmentos externos, cuya estructura es altamente sensible a las variaciones de iluminación. En condiciones fisiológicas, los fotorreceptores responden a los cambios en la intensidad de iluminación con cambios en la longitud del segmento externo y en la cantidad de rodopsina. Estas modificaciones, conocidas como fotostasis, son completamente reversibles (Rapp y col., 1994). Cuando la iluminación alcanza niveles tóxicos, la lesión de los fotorreceptores comienza con alteración y acortamiento de los segmentos externo e interno (Guerin y col., 1993). Si la lesión es intensa, el fotorreceptor muere y es eliminado. Cuando el fotorreceptor sobrevive, el segmento externo es regenerado (Williams y col., 1998, Chrysostomou y col., 2008).

Son numerosos los factores tróficos que promueven la supervivencia de los fotorreceptores. Entre ellos se cuentan taurina, ácido retinoico, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor neurotrófico derivado del

cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (PEDGF), interleuquina-1b, factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) y el ácido docosahexaenoico (Altschuler y col., 1993, Fontaine y col., 1998, LaVail y col., 1998, Frasson y col., 1999, Morrow y col., 1999, Jablonski y col., 2000, Politi y col., 2001). La inyección intraocular de BDNF, neurotrofina-3 (NT-3), CNTF y bFGF rescatan a los fotorreceptores en modelos animales de degeneración tanto de origen genético como inducidos por luz (Faktorovich y col., 1990, Faktorovich y col., 1992, LaVail y col., 1992, Cayouette y col., 1998, LaVail y col., 1998, Chong y col., 1999).

Algunos estudios indican que el rescate de los fotorreceptores por efecto de los factores de crecimiento sería producido de manera indirecta, actuando sobre la células de Müller, que posteriormente liberarían factores que actuarían sobre los fotorreceptores (Sarthy y col., 1998, Wexler y col., 1998, Wahlin y col., 2000, Bringmann y Reichenbach, 2001). Se ha demostrado que las células de Müller, en respuesta a los factores NT-3 o factor de crecimiento nervioso (NGF), incrementan su producción de bFGF, lo que culmina en una protección o en un incremento de la apoptosis de los fotorreceptores (Harada y col., 2000, Zack, 2000). Por otro lado, Frasson y col. han demostrado que la administración de GDNF conduce al incremento de GFAP en las células de Müller. Este factor de crecimiento estaría regulando cambios fenotípicos de expresión en estas células y su efecto sobre la supervivencia de los fotorreceptores podría ocurrir indirectamente mediante las células de Müller (Frasson y col., 1999).

Las degeneraciones de la retina están acompañadas de la migración de células fagocíticas a la retina externa, sitio donde ocurre la degeneración de los fotorreceptores. Las células fagocíticas tendrían su origen en las células microgliales residentes y no serían procedentes de monocitos macrófagos periféricos (Thanos, 1992, Roque y col., 1996). Las células microgliales desempeñarían un rol crítico durante la degeneración. Sin embargo, aún es incierto si la microglia contribuye a la neuroprotección produciendo factores neurotróficos o ejerce un efecto citotóxico por la liberación de especies reactivas del oxígeno, óxido nítrico, o citoquinas inflamatorias (Kreutzberg, 1996, Graeber

y col., 1998, Ito y col., 1998, Nakajima y col., 1998, Ito y col., 2001, Nakajima y Kohsaka, 2001). También se ha propuesto que la microglia podría regular la interacción microglia-célula de Müller-fotorreceptor, una de las vías que controlarían la acción de factores de crecimiento durante la degeneración retinal (Harada y col., 2002).

Las endotelinas

Las endotelinas conforman una familia de péptidos, integrada por tres isoformas: endotelina-1, 2 y 3 (ET-1, ET-2 y ET-3). La primera fue aislada en 1988 a partir de células endoteliales de aorta porcina en cultivo (Yanagisawa y col., 1988a, Yanagisawa y col., 1988b). Ulteriormente se identificaron las otras dos isoformas (Yanagisawa y Masaki, 1989). Las 3 isoformas derivan de genes separados, pero comparten una estructura molecular semejante. Los productos génicos sufren procesamiento proteolítico postraducciona hasta llegar al péptido maduro de 21 amino ácidos.

Las tres isoformas poseen un dominio N-terminal, tres cadenas laterales polares (residuos 8 a 10) y un dominio hidrofóbico C-terminal (Fig. 1.2). Cada molécula tiene dos puentes disulfuro entre las cisteínas 1 y 15 y entre las 3 y 11. La secuencia aminoacídica es muy similar entre las isoformas, los residuos que otorgan las diferencias se ubican en las posiciones 2, 4-7 y 14. La cola N terminal hidrofóbica comprende desde el 16 al 21 y todas las isoformas conservan un triptofano terminal (Trp²¹), que parece ser muy importante para la actividad (Sokolovsky, 1992).

Síntesis y procesamiento

El primer precursor formado a partir de la traducción de un ARNm se denomina preproendotelina (prepro-ET) y posee 203 aminoácidos. Es clivado por peptidasas de tipo furina para formar un precursor de 37-41 aminoácidos denominado Big-ET-1, Big-ET-2 o Big-ET-3 (Emoto y Yanagisawa, 1995, Hynynen y Khalil, 2006). A su vez, éstas son clivadas por las Enzimas Convertidoras de Endotelina (ECEs) (Hynynen y Khalil, 2006), que actúan sobre la unión Trp²¹-Val²² de Big-ET-1 y Big-ET-2, mientras que la conversión de Big-ET-3 requiere el clivaje de la unión Trp²¹-Ile²². Se conocen hasta tres enzimas convertidoras de endotelina. Las ECEs pertenecen a la familia de las metaloproteasas, son parte de la superfamilia de neprilisina, tienen similaridad funcional y estructural con las endopeptidasas neutras y son parcialmente inhibidas por fosforamidón.

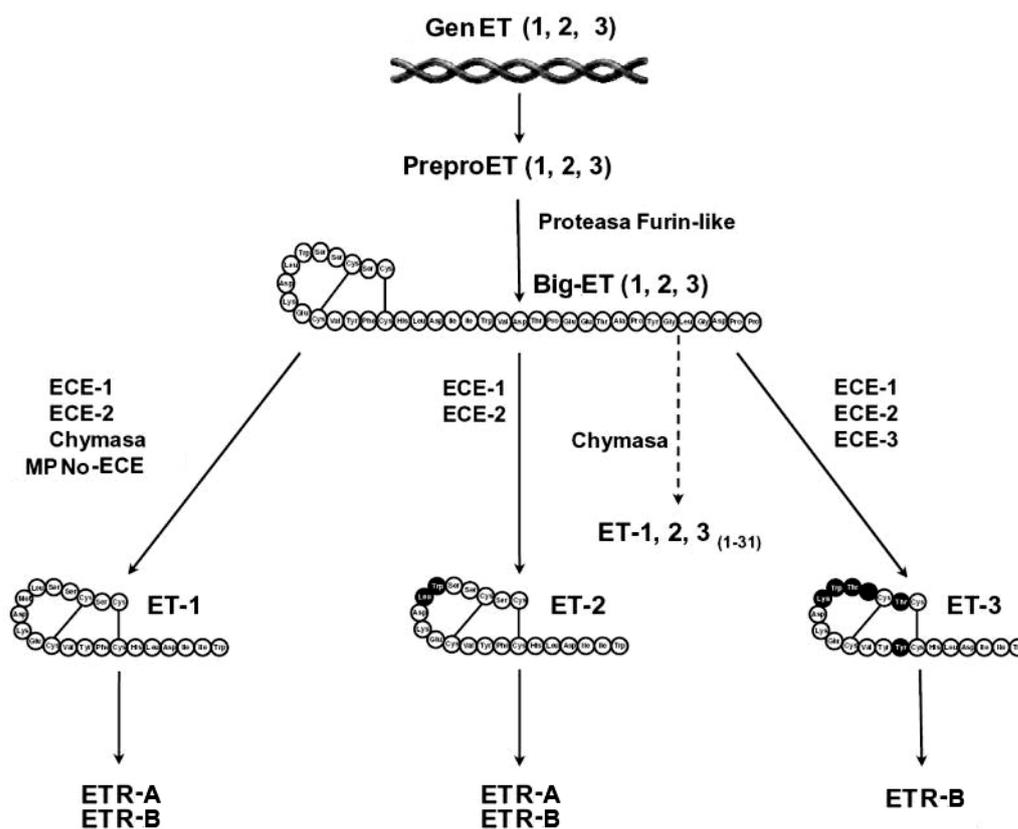


Fig. 1.2. Esquema que muestra la biosíntesis de las tres endotelinas a partir de un precursor de 200 o más aminoácidos, preproendotelina, que a su vez es clivado para formar un péptido de 31 aminoácidos (Big-ET). El clivaje final puede ser producido por varias enzimas de distinta localización tisular.

Receptores endotelinérgicos

Las señales endotelinérgicas se transmiten por vía de receptores pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Se conocen dos receptores, ETR-A y ETR-B, que se unen con distinta afinidad a las isoformas ET (Arai y col., 1990, Davenport y Maguire, 2006). Para ETR-A, el rango de afinidades es $ET-1 = ET-2 < ET-3$. Por su parte, ETR-B acepta todas las isoformas con igual afinidad (Kis y col., 2006).

Estos dos receptores comparten una homología en su secuencia de aminoácidos del 59%, están acoplados a diferentes clases de proteínas G, y difieren en el tráfico intracelular después de la unión del ligando. El estudio de las cascadas de señales estimuladas por estos receptores en células de hamster chino transfectadas,

demostró que ambos interactúan con proteínas G insensibles a toxina pertusis, lo que en estado activo conduce a la activación de la fosfolipasa C y al ciclo de los fosfatos de inositoles con incrementos de Ca^{2+} intracelulares. Sin embargo estos receptores difieren en su efecto sobre la enzima adenilato ciclasa, donde ETR-A por su interacción con proteínas G estimuladoras, incrementa la formación de AMP cíclico (cAMP), en tanto que el ETR-B inhibe la formación de cAMP por su interacción con una proteína G inhibitoria (Aramori y Nakanishi, 1992, Cramer y col., 2001).

Después de la unión del ligando ambos receptores son rápidamente desensibilizados por la acción de una quinasa de receptores acoplados a proteínas G tipo 2 (Cramer y col., 1998). Posteriormente son internalizados por medio de vesículas recubiertas, en el caso de ETR-A por clatrina o caveolas, y sufre reciclaje hacia la membrana plasmática, ETR-B, en tanto, es exclusivamente internalizado por medio de vesículas revestidas por clatrina y transportado endosomas y lisosomas (Bremnes y col., 2000, Paasche y col., 2001).

Endotelinas en el endotelio vascular

Desde su descubrimiento en las células endoteliales, el papel del sistema endotelinérgico en la fisiología vascular ha sido detalladamente investigado ya que ET-1 es uno de los vasoconstrictores más poderosos hasta ahora identificados (Yanagisawa y col., 1988c, Davenport y Maguire, 1994, Haynes y col., 1994, Haynes y col., 1995).

La principal isoforma producida por las células endoteliales es ET-1, que también expresan ETR-B. Las células musculares vasculares expresan ambos receptores endotelinérgicos (Schiffrin y Touyz, 1998). La activación endotelinérgica resulta en la contracción, crecimiento y proliferación de las células musculares vasculares (Hynynen y Khalil, 2006).

La acción vasomotora de ET-1 depende de una compleja relación con óxido nítrico (NO). Se acepta habitualmente que, en el endotelio normal, la activación de los ETR-B estimula eNOS y aumenta así la producción de NO (Liu y col.,

2003). En una situación de homeostasis, el efecto vasoconstrictor de ET-1 es balanceado por el efecto vasodilatador de NO. Este equilibrio se pierde bajo condiciones de disfunción endotelial o inflamación (Steiner y col., 2004)

Los niveles circulantes de endotelinas son relativamente bajos, ya que las células endoteliales secretan más del 80% de su producción hacia la cara basal, hacia la túnica media. La secreción endotelial puede ser constitutiva (Yanagisawa y col., 1988a), controlada a nivel transcripcional, o regulada, por almacenamiento en los cuerpos de Weibel-Palade de algunos endotelios lo que apoyó la existencia también de una vía de secreción regulada. Además en algunas situaciones ha sido demostrada la liberación de ET-1 después de la recepción de un estímulo (Fyhrquist y col., 1990).

Endotelinas en el sistema nervioso

Mediante técnicas inmunohistoquímicas, autoradiografías e hibridación *in situ* se demostró la existencia de todos los componentes del eje endotelinérgico en el cerebro y la retina (MacCumber y col., 1989, MacCumber y D'Anna, 1994). Los estudios iniciales sugerían una relación con el flujo sanguíneo local en el cerebro o la retina (Gulati y col., 1997), pero rápidamente se demostró la acción directa de las endotelinas sobre las neuronas y la glia (Koizumi y col., 1994, Shihara y col., 1998). La distribución de los receptores en el cerebro humano y de rata es pareja con la localización de la inmunorreactividad ET (Schinelli, 2006).

Los astrocitos no solo son capaces de responder a las señales endotelinérgicas, sino que también poseen la maquinaria para la síntesis de endotelina. En estas células, ET-1 es un potente mitógeno autocrino, cuya producción aumenta en los astrocitos reactivos y neoplásicos (Ostrow y Sachs, 2005). *In vitro*, los astrocitos parecen expresar ambos receptores (Schinelli, 2006). ET-1 afecta numerosas funciones de los astrocitos en cultivo tales como la actividad de canales iónicos, flujos de glutamato, la utilización de la glucosa, la permeabilidad de las uniones de hendidura, y la señalización mediada por calcio.

La activación de los astrocitos es característica de las situaciones de daño o estrés neuronal. A su vez, las ETs aumentan en todas las situaciones de activación glial (MacCumber y col., 1990, Prasanna y col., 2002b). Se explica así la presencia de alteraciones del sistema endotelinérgico en prácticamente todas las lesiones neurodegenerativas (Nakagomi y col., 2000, Petrov y col., 2002), como infartos cerebrales (Loo y col., 2002) o la enfermedad de Alzheimer (Kohzuki y col., 1995).

La actividad astrocitaria se relaciona directamente con el control de la barrera hemato-retinal (Gardner y col., 1997). En gran medida, esto se debe a la producción de ET-1, que tiene complejos efectos sobre la barrera hemato-encefálica. La administración de ET-1 aumenta la permeabilidad de la misma (Miller y col., 1996), tanto por reducción del transporte mediado por P-glucoproteína (Hartz y col., 2004, Bauer y col., 2007), como por acción directa sobre las uniones ocluyentes (Rosano y col., 2006, Zhang y col., 2008). Además, ET-1 actúa como mediador paracrino entre endotelio y pericitos (Dehouck y col., 1997). También evoca producción de ceramidas y del factor activador de las plaquetas (PAF) en la microvasculatura cerebral (Collado y col., 2003). Por otra parte, el transporte del péptido amiloide-beta a través del endotelio cerebral estimula la producción de ET-1 y en consecuencia reduce el flujo sanguíneo cerebral (Deane y col., 2003).

La expresión de ET-1 y el receptor ETR-B están elevadas en los tumores cerebrales, especialmente en el glioblastoma. Se considera que estas moléculas facilitarían el crecimiento y la migración de este y otros tumores (Paolillo y col., 2006).

Por otra parte, la activación de los receptores endotelinérgicos ha sido vinculada con la apoptosis neuronal. A pesar de existir solo dos receptores, cada uno de ellos desempeñaría un rol específico con respecto a la apoptosis en las diferentes regiones y situaciones en donde ha sido analizado. En neuronas en cultivo, la toxicidad del péptido amiloide-beta es reducida por agonistas del receptor ETR-B, por lo que se le atribuye un rol anti-apoptótico (Yagami y col., 2002).

No menos importante es el papel de ET-1 como vasoconstrictor en las enfermedades cerebrovasculares. Se considera que es uno de los principales agentes patogénicos en el vasoespasmo que sigue a las hemorragias subaracnoideas y actualmente se ensayan bloqueantes selectivos de una de las ECEs (ECE-1) para prevenir esta complicación (Lin y col., 2006).

Los mecanismos endotelinérgicos han sido extensamente estudiados en el glaucoma, donde se considera que estarían asociados a la regulación del flujo sanguíneo y del humor acuoso (Yorio y col., 2002). Además, las endotelinas tienen efectos directos sobre la retina, ya que impiden el transporte axonal e inducen hipertrofia de la glia del nervio óptico. En otros estudios, se ha demostrado que ET-1 favorece la toxicidad del glutamato sobre células ganglionares en cultivo (Ehrenreich y col., 2000, Siren y col., 2002).

Desarrollo embrionario y sistema endotelinérgico

Durante el desarrollo embrionario las endotelinas serían importantes para la migración de las células de la cresta neural. El desarrollo de las células de la cresta neural de la región cefálica y cardíaca requieren ET-1 y su receptor ETR-A, en tanto que la cresta neural del resto del tronco depende de ET-3 y su receptor ETR-B (Pla y Larue, 2003).

El receptor ETR-B se encuentra presente durante la neurogénesis, y se localiza en las zonas ventricular y subventricular. También aparece en los ganglios de la raíz dorsal. En el período postnatal aparece en células ependimarias y subependimarias, y en las células gliales de Bergmann, que también expresan ETR-A.

Las endotelinas estimulan la diferenciación de los cardiomiocitos en fibras de Purkinje durante el desarrollo del corazón. Este fenómeno no ocurre en los cardiomiocitos adultos que responden a la señalización endotelinérgica con hipertrofia (Kanzawa y col., 2002).

Objetivos generales

Esta Tesis tiene como finalidad caracterizar el sistema endotelinérgico en la retina del ratón y evaluar su vinculación con dos procesos claves en la patología de la retina: la muerte de los fotorreceptores y la activación glial. Sus objetivos, que serán analizados en los siguientes capítulos, son:

Caracterizar el eje endotelinérgico en la retina normal del ratón:

Analizar la localización de los péptidos Prepro-ET-1, Big-ET-1, ET-1 y ET-3, y los receptores endotelinérgicos ETR-A y ETR-B y sus correspondientes ARNms.

Utilizar el modelo de degeneración de la retina inducida por luz en el ratón para evaluar la asociación entre la muerte de los fotorreceptores y el sistema endotelinérgico.

Ensayar el uso de bloqueantes de los receptores endotelinérgicos para modificar el curso de la degeneración de la retina inducida por luz.

Evaluar la activación de las vías de señalización intracelular relacionadas con el estrés durante la degeneración de la retina y su modulación por los mecanismos endotelinérgicos.

Estudiar un ratón transgénico que sobreexpresa endotelina en el endotelio para reconocer el impacto del exceso de este péptido sobre los vasos, células gliales y neuronales de la retina.

Capítulo 2

Material y métodos

El modelo de injuria retinal por iluminación excesiva

El exceso de iluminación está involucrado en los procesos degenerativos de la retina, ya sea directamente (Winkler y col., 1999, Grimm y col., 2000) o bien, acelerando lesiones de otro origen (LaVail y col., 1999, Thomas y col., 2007). Estudios epidemiológicos indican una correlación entre exposición a la luz con la incidencia de DMAE (Organisciak y col., 1998). También se han detectado fenómenos degenerativos en las disfunciones visuales sufridas por neonatos mantenidos bajo altos niveles de luz (Glass y col., 1985) y en adultos tratados con luz por desórdenes afectivos estacionales (Reme y Terman, 1992). Por el contrario, el riesgo de desarrollar DMAE está disminuido en las personas con opacidad del cristalino (Sperduto y col., 1981).

En 1966, Noell y col. (Noell y col., 1966) descubrieron que las ratas albinas expuestas a iluminación continuada sufrían degeneración de la retina, con muerte de los fotorreceptores y activación de las células gliales. Desde entonces el modelo de daño de la retina por luz es ampliamente utilizado para el estudio de la degeneración retinal (Kuwabara y Gorn, 1968, Organisciak y col., 1998, Organisciak y col., 1999, Masuda y Watanabe, 2000, Cao y col., 2001). Es un modelo que resulta muy útil para estudiar los mecanismos de estrés que inducen la muerte de los fotorreceptores, apuntando a comprender los mecanismos que controlan la muerte neuronal en enfermedades como la retinitis pigmentosa y la DMAE.

Procedimiento

Para inducir injuria luminosa utilizamos ratones albinos de la cepa Balb/c, machos de 5-6 semanas. Los animales fueron mantenidos en nuestras instalaciones con los estándares del "ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research", con un ciclo de luz/oscuridad estándar de 12 horas por etapa, con niveles máximos de 60 lux (Williams y col., 1985, Wenzel y col., 2001).

Todos los experimentos comenzaron a las 12:00 hrs AM, después de un período de 24 hrs de oscuridad, a fin de homogeneizar los parámetros fisiológicos de la retina. Los animales aleatorizados para formar el grupo control retornaron al ciclo normal de luz/oscuridad. Los animales a ser lesionados fueron transferidos a cajas transparentes de vidrio ubicadas en un módulo de iluminación continua, donde un tubo fluorescente de luz (OSRAM L58W/daylight) proporciona 1500 lux a nivel del piso de las cajas. El módulo permite colocar varias cajas a la misma distancia de la fuente luminosa. Para medir la iluminación se utilizó un fotómetro Minolta Auto Meter IV F, realizándose controles periódicos para asegurar la eficiencia del tubo. Los animales recibieron agua y comida *ad libitum* tanto en el grupo control como en el tratado. Todos los animales fueron sacrificados entre las 10 y 14 hrs.

Métodos para caracterizar el eje endotelinérgico

Inmunohistoquímica

Procedimientos de fijación

Los animales fueron anestesiados profundamente con hidrato de cloral 7% (500 mg/kg de ratón, intraperitoneal), y perfundidos por vía transcardíaca con paraformaldehído al 4% en buffer fosfato al 0,1 M, pH 7,3. Los ojos fueron enucleados, la cornea, la cámara anterior y el vítreo fueron desechados, y la parte posterior del globo ocular fue conservada toda la noche a 4°C en solución de sacarosa al 5% en buffer fosfato al 0,1 M.

Las piezas destinadas a cortes por criostato fueron preservadas por pasajes en soluciones de sacarosa de concentración creciente hasta alcanzar una concentración final de sacarosa al 20% (Barthel y Raymond, 1990). Para obtener cortes finos, el material se incluyó en Cryoplast (Biopack, Buenos Aires) y fue congelado en acetona enfriada con nitrógeno líquido. Durante la inclusión se respetaron los parámetros topográficos del globo ocular, a fin de obtener cortes en forma reproducible para cada experimento. Los cortes se realizaron en forma perpendicular al meridiano del ojo y al plano de la retina, con un criostato Microm (HM 500 OM), a 14-16 μm , montados en portaobjetos gelatinizados y secados a temperatura ambiente (TA).

También se hicieron preparaciones de retina montadas enteras. Estas retinas fueron separadas de las tunicas oculares (esclerótica y coroides). Los remanentes del vítreo adheridos a la retina fueron eliminados por microdissección con pinzas, las muestras se mantuvieron en sacarosa al 5% hasta el momento de su procesamiento.

Procedimientos de detección

Para detectar la unión de anticuerpos se utilizaron procedimientos inmunoenzimáticos o inmunofluorescentes. Se detallan a continuación los principales pasos.

- a. Las criosecciones son secadas a TA por 2 hrs. Se deshidratan y deslipidizan por pasajes de alcoholes de concentraciones crecientes (70%-100%), seguidos por aclaramiento en xilol y posterior rehidratación en PBS.
- b. En el material destinado a detección inmunoenzimática se bloqueó la peroxidasa endógena mediante una incubación en 0.5% v/v de peróxido de hidrogeno en etanol al 96%.
- c. En el procedimiento inmunoenzimático, los anticuerpos primarios (ver listas más abajo) fueron detectados con anticuerpos secundarios acoplados a biotina. A su vez, estos fueron reconocidos por el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ELITE VECTOR, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). La actividad de peroxidasa fue revelada con diaminobencidina en presencia de níquel, que amplifica la producción de color (Suburo y col., 1992).

d. Utilizamos inmunofluorescencia para analizar la co-localización de las moléculas endotelinérgicas con marcadores de diferentes fenotipos de la retina por medio de dobles o triples marcajes. Para esto se incubaron los cortes o las retinas enteras con dos o tres anticuerpos primarios de distinto origen. Los anticuerpos uidos al tejido fueron detectados con anticuerpos secundarios acoplados a cromóforos fluorescentes (Fluorescena, fluorescein-5-isothiocyanateconjugated goat antirabbit IgG, FITC; L-Rodamina, lisamin-rodamina, L-Rod y CY-5, todos de Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, o Alexa Fluor 633, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Para determinados anticuerpos también se disponía de anticuerpos primarios acoplados directamente a cromóforos fluorescentes (GFAP-CY3, SMA-CY3', Sigma-Aldrich, EEUU).

Las secciones y retinas enteras fueron montadas, en Bálsamo de Canadá, en los casos en que el revelado fue con diaminobencidina; o con DABCO al 3 % en glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para inmunofluorescencia. Estos preparados fueron observados y fotografiados con un microscopio con luz clara y fluorescencia (Nikon E800) acoplado a una cámara digital (Nikon DN100) o con un microscopio confocal, Laser Scanning System Radiance 2000 (BioRad, Hemel Hempstead, UK), utilizando los láseres de Argón de 488nm, seguido por helium-neon de 543nm, y los filtros de emisión HQ515/30 y HQ590/70, respectivamente. Las secciones ópticas obtenidas con este microscopio son tomadas en el eje Z cada 1µm y procesadas con el programa Confocal Assistant (BioRad, Hemel Hempstead, UK).

e. En todos los experimentos se incluyeron controles negativos, donde el anticuerpo primario fue reemplazando por diluyente.

Coloración con Rojo Neutro

También se realizaron tinciones con rojo neutro, que es un colorante que marca exclusivamente los núcleos celulares, para reconocer la estructura histológica de las preparaciones. Las secciones se obtienen como se describió más arriba. Luego las secciones se procesan de la siguiente manera:

a. Una vez secos, los cortes son lavados en solución salina balanceada con fosfato (PBS). Se deshidratan y deslipidizan con pasajes por alcoholes de concentraciones crecientes (70%-100%), seguidos por aclaramiento en xilol y posterior rehidratación en PBS.

b. Se cubren completamente los portaobjetos con Rojo Neutro (Sigma Chemical Co, EEUU) al 0,2 % en agua destilada por 5 minutos.

c. Luego se lavan con agua corriente y se deshidratan en alcoholes, se aclaran en xilol y se montan con Bálsamo de Canadá.

Anticuerpos primarios

Marcadores endotelinérgicos

ANTICUERPO	HUESPED	ORIGEN	MOLÉCULA DETECTADA
Prepro-ET-1	Conejo (policlonal)	Bachem California, Torrance, CA	Precursor prepro-ET-1
Big-ET-1	Conejo (policlonal)	Bachem California, Torrance, CA	Precursor Big-ET-1
ET-1	Conejo (policlonal)	Bachem California, Torrance, CA	Péptido ET-1
ET-3	Conejo (policlonal)	Bachem California, Torrance, CA	Péptido ET-3
ET-1-2-3	Conejo (policlonal)	Chemicon, Temecula, CA	Péptidos ET-1, ET-2 y ET-3
ETR-A	Conejo (policlonal)	Alomone Labs, Israel	Receptor de endotelina A
ETR-B	Conejo (policlonal)	Alomone Labs, Israel	Receptor de endotelina B
ETR-A	Conejo (policlonal)	Assay designs, Ann Arbor MI, USA	Receptor de endotelina A
ETR-A	Conejo (policlonal)	Assay designs, Ann Arbor MI, USA	Receptor de endotelina A

Marcadores de tipos celulares específicos

ANTICUERPO	HUESPED	ORIGEN	MOLÉCULA DETECTADA	LOCALIZACION
GFAP	Ratón (monoclonal)	BioGenex, San Ramon, CA	Proteína glial fibrilar ácida	Astroцитos normales y activados y Células de Müller activadas
GFAP-CY3	Conejo (policlonal)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	Proteína glial fibrilar ácida	Astroцитos normales y activados y Células de Müller activadas
SMA	Ratón (monoclonal)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	Actina de músculo liso	Músculo liso de las paredes de arterias y arteriolas
SMA-CY3	Ratón (monoclonal)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	Actina de músculo liso	Músculo liso de las paredes de arterias y arteriolas
GS	Conejo (policlonal)	A.D. Marmorstein, Cole Eye Research Institute, Cleveland, OH.	Enzima Glutamino Sintasa	Células de Müller

Marcadores de estructuras en la capa plexiforme externa (CPE)

ANTICUERPO	HUESPED	ORIGEN	MOLÉCULA DETECTADA	LOCALIZACION
SV2	Ratón (Monoclonal)	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa	Proteína de vesículas sinápticas, SV2	Vesículas sinápticas
PSD-95	Ratón (Monoclonal)	Chemicon, Temecula, CA	Proteína de la densidad postsináptica PSD-95	Membranas pre- o postsinápticas según tipo neuronal
RT-97	Ratón (Monoclonal)	clone RT97, Chemicon, Temecula, CA	Epítoto fosforilado de neurofilamentos 200 kDa	Células horizontales

Anticuerpos de señalización celular

ANTICUERPO	HUESPED	ORIGEN	MOLÉCULA DETECTADA
fosfo-JNK/SAPK	mAb Conejo	Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA	fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)
fosfo-p38	mAb Conejo	Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA	fosfo-p38 (Thr180/Tyr182)
fosfo-p44/42 ERK1/2	mAb Conejo	Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA	fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)
fosfo-c-jun	Conejo	Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA	Factor de transcripción, fosfo-c-Jun (Ser 73)
c-fos	Conejo	Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA	Factor de transcripción, (9F6)

Otros anticuerpos

ANTICUERPO	HUESPED	ORIGEN	MOLÉCULA DETECTADA
C3C	Conejo (policlonal)	Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA	Caspasa 3 clivada
C3C	Conejo (policlonal)	Chemicon, Temecula, CA	Caspasa 3 clivada
Rodopsina	Ratón (Monoclonal)	Generosamente donado por J. Nathans, Johns Hopkins University, Baltimore, MD.	Rodopsina

Análisis cuantitativo de imágenes

El área ocupada por inmunorreactividad ET-1 o ETR-B en la capa de astrocitos fue medida en retinas montadas enteras. Se tomaron microfotografías de 3-4 campos por retina (3-5 retinas por grupo), y se estimaron las áreas inmunofluorescentes sobre un área total de 210 mm² usando el programa KS400 (Kontron System, Zeiss Vision, Oberkochen, Germany) o Image J (NIH). Los resultados fueron expresados como porcentaje de área inmunorreactiva sobre el área muestreada. Los datos se compararon usando el test de Kruskal–Wallis con un post test de Dunn de comparaciones múltiples.

RT-PCR

Es posible estimar diferencias en los niveles de expresión de las endotelinas o de GFAP, en forma semicuantitativa, mediante la técnica de Retrotranscripción reversa con posterior amplificación del cDNA, mediante la reacción de la polimerasa en cadena (Prasanna y col., 2002a). Los animales son sacrificados y se enuclean los ojos. La disección se realiza en solución salina estéril, se descarta el segmento anterior, y del segmento posterior se separan la esclera y coroides, conservando únicamente las retinas. Se juntaron 6 retinas por tratamiento (30 mg peso húmedo), que se congelaron en nitrógeno líquido y luego se almacenaron a –70° C.

Posteriormente fueron homogeneizadas (Homogenizador Sigma, Chemical Co) y procesadas mediante un kit para aislamiento de ARN total a partir de tejidos ricos en lípidos (RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen, Inc, Valencia, CA). La concentración de ARN total obtenida se midió con un espectrofotómetro (Amersham Biosciences, Gene quant pro). También evaluamos la contaminación de proteínas y ADN mediante la relación de absorbancias entre el ARN y dichas moléculas (260/230 y 260/280, respectivamente). La integridad del ARN aislado fue verificada mediante corrida en un gel de agarosa al 1%, donde se observan dos bandas correspondientes a los ARN ribosomales en una proporción de 2:1 si la integridad y pureza del ARN es adecuada.

Para obtener el cDNA, utilizamos la enzima retrotranscriptasa Superscript (Invitrogen, Carlsbad, CA) y primers oligo-dT. Se realizaron controles negativos omitiendo el agregado del ARN. Luego, se realizó el tratamiento con una enzima Rnasa H para degradar el ARN templado (Invitrogen, Carlsbad, CA). Todos estos procedimientos se realizaron bajo condiciones libres de ARNasas.

Para la amplificación por PCR usamos la enzima platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) y primers específicos (ver Tabla). El diseño de los primers se basó en los descriptos por Uchide y col. 1999 (Uchide y col., 1999), y se realizó con software para diseño de primers (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool, NIH; Ensembl, Nucleotide Sequence Database, GenBank (USA) y el DNA Database of Japan (DDBJ); Cybergene.se/primerdesign). La amplificación del ARNm de la enzima gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como Standard interno (Rhinn y col., 2008).

Primers utilizados en las reacciones de PCR

ARN detectado	Primers (sense/antisense, 5'-3')	PM en pb esperado	Temp. de apareamiento (TAnn)
PreproET-2	CTGCTGCTGTGTAAAGACTGGCAAG AGGTTCTGTGCTCCCAAAAGTGTCC	652	60°C
PreproET-1	AGCTGGTGGAAGGAAGGAACTACG GACAGTGCAGAAAGGTGAGGTAGACT	728	60°C
PreproET-3	CTTGTATGGGGGCGGATGACAAG TGCCTCGCTAACTTGCTCAGGC	679	60°C
ETR-A	CCCTTGATTACCGCCATTGAAA TGACAACCAAGCAGAAGACAGT	346	58°C
ETR-B	GGCTAGTGTGTTTTTCAGAGGCTTG CAGAACCACAGAGACCACCCAAAT	822	58°C
GAPDH	TTCATTGACCTCAACTACATG GTGGCAGTGATGGCATGGAC	443	58°C

Reacciones de PCR

Se utilizó el siguiente protocolo, con diferentes temperaturas de apareamiento específica para cada par de primers (T° Anneling) según lo determinado experimentalmente.

- a. 1 ciclo de: 94°C por 5 min.
- b. 35 ciclos de: 94°C por 1 min, TA°C por 1 min, 72°C por 1 min.
- c. 1 ciclo de: 72°C por 5 min, 4°C por 99h 99 min.

Densitometría de los geles

Los geles fueron de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y se corrieron a 100 V durante 30 minutos por último fueron fotografiados con luz UV en transiluminador (Amersham, Bio Doc-it imaging system). Las imágenes digitalizadas se semi-cuantificaron utilizando el software ImageJ, NIH, para estimar la densidad óptica. Los valores de densidad óptica se convirtieron en una relación entre la densidad producida por el producto de PCR del cDNA del mensajero de interés y la densidad producida por el producto de PCR del cDNA del gen usado como standard, en este caso GAPDH. La relación para cada situación se comparó estadísticamente, mediante test no paramétrico de Kruskal-Wallis, con un post test de Dunn de comparaciones múltiples con el programa estadístico GraphPad Prism.

Estudio de lesiones de la retina

Muerte celular

La activación de las enzimas de la familia ICE- proteasas/caspasas inicia la apoptosis en células de mamíferos. La apoptosis está involucrada en la muerte de los fotorreceptores inducida por luz (Wenzel y col., 2005). Utilizamos la caspasa-3, una enzima ejecutora de la apoptosis, como marcador de este proceso. Recientemente, se ha demostrado la participación de esta caspasa en la muerte de los fotorreceptores (Wang y col., 2007).

Inmunohistoquímica para Caspasa 3 clivada (C3C)

Las muestras se obtuvieron como hemos descrito anteriormente. Las retinas enteras fueron incubadas con suero de conejo anti-caspasa-3 clivada (C3C, Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA), con el fin de identificar células apoptóticas. Estos anticuerpos fueron detectados con anticuerpos de cabra dirigidos contra conejo acoplados con FITC. Las retinas enteras fueron montadas en DABCO al 3% en glicerol y observadas y fotografiadas con un microscopio con fluorescencia Nikon E800 y con una cámara digital Nikon DN100 acoplada a este. Los controles negativos fueron realizados reemplazando el anticuerpo primario por diluyente. Los núcleos se contaron en áreas de 1280 x 960 píxeles. El estudio estadístico se realizó con el programa Graphpad Prism.

Western blot para C3C en homogenatos de retinas

Los animales son sacrificados y se lleva a cabo la enucleación de los ojos. La disección se realiza en solución salina estéril, se descartan el segmento anterior, y del segmento posterior se separan la esclera y coroides, manteniendo únicamente la retina. Para obtener los homogenatos, 3 retinas fueron homogenizadas en 100µl de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 y un cocktail inhibidor de proteasas, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Se estimó la concentración de proteínas totales utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976).

100 ug de proteína fueron sembrados en cada calle, separados mediante SDS-PAGE y transferidos a una membrana de nitrocelulosa (100 v, 90min). La detección fue realizada utilizando suero de conejo anti-caspasa-3 clivada (Chemicon, Temecula, CA). Esta membrana fue luego incubada con anticuerpos IgG biotinilados anti-conejo, luego con Extravidin-Peroxidasa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y revelados con kit quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y exposición en placas sensibles a quimioluminiscencia (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ). Las membranas fueron escaneadas y la densidad óptica de las bandas fue estimada utilizando el programa ImageJ, NIH. Para la comparación estadística se utilizó un test no paramétrico, prueba de Mann Whitney, utilizando el programa Graphpad Prism.

Ensayo colorimétrico de la actividad de C3C

La actividad de caspasa 3 se estimó en base a su capacidad de reconocer la secuencia blanco DEVD. El ensayo (Chemicon, Temecula, CA) se basa en la detección espectrofotométrica del cromóforo p-nitroanilina (pNA) después del clivaje del sustrato marcado DEVD-pNA. El pNA libre puede ser cuantificado en espectrofotómetro o lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm. Se utiliza una curva Standard de pNA para inferir los valores de sustrato clivado de acuerdo a la absorbancia de cada muestra.

Brevemente:

1. Disecar las retinas en solución fisiológica. Homogeneizar (Homogenizador Sigma, Chemical Co) en 80 μ l de Buffer de lisis frío 1x por cada 3 retinas. Incubar en hielo por 10 minutos. Centrifugar 5 minutos a (10.000 x g).
2. Transferir el sobrenadante (extracto citosólico) a un tubo y poner en hielo. Medir la concentración de proteínas.
3. Incubar a 37°C durante 1 hrs en lector de Elisa, en un volumen total de 100 μ l, la siguiente mezcla de reacción: 5x Buffer assay, H₂O destilada, Sustrato de Caspasa-3 clivada DEVD-pNA, 100 μ g de proteína por reacción.

4. Realizar curva standard. El rango será: 1.25 μ M; 2.5 μ M; 5 μ M; 10 μ M; 20 μ M; 40 μ M.

4. Leer las muestras a 405 nm en lector de placa y expresar de acuerdo a los valores del standard.

Activación glial y gliosis

Análisis cuantitativo del área inmunorreactiva para GFAP

Para evaluar la activación glial se midió el área inmunorreactiva para GFAP bajo distintas condiciones experimentales. Se utilizaron retinas enteras, procesadas tal como se describió anteriormente. En este caso se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-GFAP (BioGenex, San Ramon, CA), detectado mediante anticuerpos de cabra dirigidos contra ratón acoplados con L-Rod (lisamin-rodamina, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Las retinas enteras fueron montadas en DABCO al 3% en glicerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), observadas y fotografiadas con un microscopio de fluorescencia Nikon E800 y su cámara digital Nikon DN100. El área inmunorreactiva se evaluó con el programa Image J, NIH a partir de microfotografías. Las imágenes fueron binarizadas para medir el área ocupada por inmunoreactividad y se expresó el área como porcentaje de área inmunorreactiva sobre área muestreada. El área muestreada fue similar para todas las microfotografías medidas, con un tamaño de 1280 x 960 píxeles. El estudio estadístico se realizó con el programa Graphpad Prism.

Western blot para GFAP en homogenatos de retinas

La técnica de Western blot fue similar a la aplicada para las caspasas, con algunas modificaciones. Se sembraron 30 μ g de proteína en cada calle, y la detección se realizó con suero de ratón anti-GFAP (BioGenex, San Ramon, CA). Esta membrana fue luego incubada con anticuerpos IgG biotinilados anti-ratón, posteriormente con Extravidin-Fosfatasa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y revelados con sustrato NBT-BCIP (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Las membranas fueron posteriormente escaneadas y la densidad óptica de las bandas fue estimada utilizando el programa Image J, NIH. Para la comparación

estadística se utilizó la prueba de Mann Whitney, utilizando el programa Graphpad Prism.

Ratones transgénicos

Los ratones C57BL6/J transgénicos (TG) contenían la secuencia codificante para prepro-ET-1 regulada por el promotor Tie-2, específico del endotelio. Fueron diseñados y criados por el Dr. Farhad Amiri (Amiri y col., 2004), integrante del grupo de investigación del Dr. Ernesto L. Schiffrin, del Clinical Research Institute of Montreal, Québec, Canadá. Los ojos fueron fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1M, 1 hrs, y almacenados en sacarosa al 5% en buffer fosfato 0,1M. Las retinas fueron estudiadas mediante inmunohistoquímica, en montajes de retinas enteras o en cortes de criostato. Se utilizaron los procedimientos descritos para endotelinas.

Para análisis cuantitativo del área inmunofluorescente para ET-1 y GFAP se emplearon retinas enteras. La inmunorreactividad se evaluó en 8 retinas TG y (retinas WT. El procedimiento fue similar al empleado para evaluar gliosis.

Capítulo 3

El eje endotelinérgico en la retina murina

Introducción y objetivos generales

Como primer objetivo investigamos la localización de las moléculas endotelinérgicas en la retina normal del ratón. Ya explicamos en la introducción que los receptores endotelinérgicos ETR-A y ETR-B pueden ser expresados por neuronas, células gliales y endoteliales. Por lo tanto, cualquiera de los tipos celulares de la retina podría ser un efector endotelinérgico. Para definir células fuente de las endotelinas y células efectoras efectuamos un estudio inmunohistoquímico de la retina. Por una parte, determinamos la distribución de la inmunorreactividad contra ET-1 y sus precursores prepro-ET-1 y Big-ET-1. También se evaluó la inmunorreactividad contra ET-3. No hicimos lo mismo para ET-2 ya que, hasta el momento no se conocen anticuerpos específicos contra dicha isoforma. Por otra parte, analizamos la distribución inmunohistoquímica de sus receptores con anticuerpos contra ETR-A y ETR-B.

Resultados

Localización inmunohistoquímica de ET-1 y sus precursores en la retina normal

En secciones de retinas de animales controles (Fig. 3.1A), observamos inmunorreactividad para prepro-ET-1 en el epitelio pigmentario (EP) y en los cuerpos celulares de la capa de células ganglionares (CCG).

La distribución de inmunorreactividad para Big-ET-1 mostró características propias (Fig. 3.1B). Al igual que para el precursor de mayor tamaño, se observó inmunorreactividad en EP y CCG. Pero además, detectamos inmunorreactividad para Big-ET-1 en los segmentos externos de algunos fotorreceptores y en la capa

plexiforme externa (CPE). Llamativamente, los astrocitos fueron las células con la mayor inmunorreactividad para Big-ET-1 (Fig. 3.1B). Los astrocitos, que en la retina forman una monocapa a nivel de la superficie vítrea, aparecían en los cortes como una hilera discontinua a lo largo de la membrana limitante interna (MLI).

Finalmente, detectamos inmunorreactividad para el péptido ET-1 maduro en la CPE, las CGs y los astrocitos, que se marcaron con gran intensidad (Fig. 3.1C).

Utilizamos retinas montadas enteras para estudiar las moléculas endotelinérgicas en la capa de astrocitos. En estos preparados (Fig. 3.2A), los astrocitos aparecen con su característica forma estrellada, y muestran la presencia de inmunorreactividad ET-1 tanto en el soma como en sus prolongaciones. Las prolongaciones astrocíticas rodeaban las ramas de los vasos retinianos que transcurren por la superficie vítrea de la retina. También se observaba su asociación con los axones del nervio óptico, tanto en la capa de fibras de la retina como a nivel del nervio óptico.

Realizamos dobles marcajes para identificar los astrocitos y para diferenciarlos de las células de Müller, cuyas prolongaciones vítreas se encuentran en el mismo plano que los astrocitos. La identificación de los astrocitos fue confirmada por doble marcaje con antisuero ET-1 y anticuerpos monoclonales contra la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que en las retinas normales sólo se expresa en los astrocitos (Eisenfeld y col., 1984). Estas preparaciones se compararon con dobles marcajes de ET-1 combinada con anticuerpos específicos contra la enzima glutamino sintasa (GS), característica de las células de Müller.

El doble marcaje ET-1/GFAP mostró completa co-localización de ambos marcadores. Es decir, que únicamente encontramos inmunorreactividad para ET-1 en las células simultáneamente marcadas por GFAP, es decir, en los astrocitos. Estos experimentos se realizaron en retinas montadas enteras, que además permitieron observar la concentración perivascular de prolongaciones astrocitarias, marcadas tanto para ET-1 como para GFAP. Arteriolas y vénulas pudieron ser identificadas por la densidad de prolongaciones astrocitarias perivasculares, mucho mayor alrededor de las vénulas que de las arteriolas (Fig. 3.2A y B).

El doble marcaje de ET-1 con GS se efectuó en cortes de retina, para poder visualizar todo el cuerpo de las células de Müller. Observamos una completa separación de estos marcadores, por lo que concluimos que ET-1 sólo se encontraría en los astrocitos (ver capítulo 4).

Inmunorreactividad ET-3 en la retina normal

No se detectó inmunorreactividad para este anticuerpo en la retina normal. Para demostrar la especificidad del antisuero, se utilizaron cortes de riñón normal como control positivo. Dado que se observó inmunorreactividad ET-3 en las células tubulares renales, que contienen gran cantidad de ET-3, concluimos que esta isoforma sería poco expresada en la retina. Como veremos más adelante, la ausencia de inmunorreactividad ET-3 en la retina se correlacionó con una baja expresión del ARNm correspondiente.

Receptores endotelinérgicos en la retina normal

Encontramos inmunorreactividad ETR-A en distintas capas de las retinas controles (Fig. 3.3A-C). El procedimiento inmunoenzimático mostró moderada inmunorreactividad en el EP y gran intensidad en la CPE, en pequeñas varicosidades ubicadas en su borde más externo (próximo a los fotorreceptores). Algunas células de la CNI también presentaron inmunorreactividad moderada. Las células de la CCG se tiñeron muy intensamente, como también la pared vascular. No se detectó inmunorreactividad ETR-A ni en los astrocitos ni en las células de Müller.

La inmunorreactividad ETR-B mostró una localización diferente (Fig. 3.4A-C). En la CPE apareció en prolongaciones gruesas y ramificadas, ubicadas en el límite entre la CPE y la CNI. La forma y ubicación de estas estructuras son típicas de las células horizontales. Además, se detectó ETR-B en los astrocitos y en la pared de los vasos retinianos. ETR-B también apareció en los núcleos celulares de todas las capas de la retina.

La capa plexiforme externa

A fin de identificar el origen de las varicosidades con inmunomarcación ETR-A en la CPE, realizamos dobles marcajes con marcadores específicos para los distintos tipos de prolongaciones que ocupan esa capa (estos marcadores fueron previamente enumerados en el capítulo 2).

La CPE está compuesta por prolongaciones de las células bipolares, los fotorreceptores y las células horizontales. Por tanto, se realizaron dobles marcajes de ETR-A y PKC, una enzima característica de las células bipolares de bastones, sin encontrar coincidencia alguna en la localización de estos marcadores (Fig. 3.5). Al contrario, se detectó co-localización parcial con SV2 (Fig. 3.6) y con PSD-95 (Fig. 3.7), dos marcadores de los terminales de fotorreceptores. El marcador de células horizontales, RT-97, no mostró co-localización alguna con las varicosidades ETR-A (no mostrado).

Por el contrario, el doble marcaje de ETR-B y RT-97 mostró una perfecta co-localización (Fig. 3.8). Se demostró así que el receptor B estaría ubicado en las células horizontales. Asimismo, en retinas montadas enteras, se confirmó la co-localización de la inmunorreactividad ETR-B con la de GFAP (mostrado mas adelante). Es decir que, al igual que ET-1, ETR-B se encontraría en los astrocitos.

Moléculas endotelinérgicas en el nervio óptico

En el nervio óptico se detectaron gran cantidad de células inmunorreactivas para ET-1. Estas eran muy numerosas en la superficie de la papila, donde formaban una gruesa capa alrededor de los vasos sanguíneos. La porción intrarretinal del nervio óptico mostró poca inmunorreactividad, mientras que en las porciones más distales se observó un denso plexo de células gliales. Estas células fueron identificadas como astrocitos por su co-localización con GFAP (no mostrado). Las prolongaciones gliales de la porción intrarretinal mostraron una orientación longitudinal, mientras que en las regiones mas distales seguían un patrón transversal (Fig. 3.9A).

También observamos inmunorreactividad para ETR-A, aunque únicamente en células gliales ubicadas en la papila del nervio óptico (Fig. 3.9B). Estas células aparecían alrededor de los vasos centrales de la retina.

Por el contrario, encontramos intensa inmunorreactividad para ETR-B en toda la extensión del nervio óptico. Las células ETR-B poseían todas las características de astrocitos y se distribuían a lo largo del nervio con el mismo patrón de las células ET-1+ (Fig. 3.9C).

ARNms endotelinérgicos en la retina normal

Estudiamos la presencia de los ARNms correspondientes a los precursores de las tres formas de endotelina (prepro-ET-1, prepro-ET-2 y prepro-ET-3), así como los correspondientes a ambos receptores (ETR-A y ETR-B). La detección de estas moléculas fue realizada mediante la técnica de retrotranscripción reversa con posterior reacción de la polimerasa en cadena clásica (RT-PCR).

A partir de cDNA correspondiente al ARNm de retina de ratones controles, detectamos presencia de los tres precursores y los dos receptores. Se confirmó así la síntesis de estas moléculas en la retina. Sin embargo, los niveles relativos de cada precursor fueron diferentes y seguían el siguiente patrón: ET-2 > ET-1 > ET-3. Con respecto a los receptores, también detectamos mayor expresión de ETR-B que de ETR-A (Fig. 3.10).

Discusión

La detección de los distintos componentes del eje endotelinérgico en el EP y varios fenotipos celulares de la retina neural demuestran que el sistema se encuentra en la retina y en el nervio óptico.

Las diferencias en la localización de las inmunorreactividades para el precursor, prepro-ET-1, y sus productos de clivaje Big-ET-1 y ET-1 sugieren que cada fenotipo de la retina podría manejar de distinta manera las velocidades de síntesis, liberación, acumulación y/o degradación. La presencia del prepropéptido es un indicio de la síntesis, mientras que la detección de Big-ET-1 y ET-1 reflejan tanto la síntesis como la acumulación intracelular de los péptidos maduros. Vale decir que, la presencia de prepro-ET-1, Big-ET-1 y ET-1 en las mismas estructuras celulares indicaría que en dichas células ocurre tanto la síntesis como el almacenamiento de ET-1. Inferimos entonces que en EP y CCG ocurrirían tanto la síntesis como el almacenamiento de ET-1.

En la CPE, la presencia de ET-1 en mayor cantidad que Big-ET-1, sin prepro-ET-1 detectable, implicaría el predominio de péptido maduro en las prolongaciones sinápticas de esa capa plexiforme. Sin embargo, no podemos excluir la síntesis en los cuerpos celulares que originan las distintas prolongaciones, ya que la vida media de los precursores puede ser muy breve (Kim y col., 2003). La presencia de Big-ET-1 en los segmentos externos sugiere que los fotorreceptores podrían ser una de las fuentes de ligandos endotelinérgicos. Este hallazgo apoyaría estudios de hibridización in situ (Rattner y Nathans, 2005) que sugirieron la presencia de ARNm endotelinérgicos en la retina externa.

Por el contrario, la intensa inmunorreactividad de Big-ET-1 y ET-1 en los astrocitos, donde prepro-ET-1 fue prácticamente indetectable, sugiere predominio de la acumulación. Aunque tampoco aquí podemos excluir la síntesis, recordemos que los astrocitos se encuentran en contacto con dos ricas fuentes de endotelinas, la pared vascular y las células de la CCG, que presentan abundante prepro-ET-1. Puede especularse que los astrocitos cumplirían una función buffer regulando la cantidad de endotelinas en el espacio extracelular.

La distribución de ET-1 y sus receptores ETR-A y ETR-B en la retina sugiere que existirían al menos tres sitios de señalización endotelinérgica: (1) entre el EP y la coroides, (2) a nivel de la CPE, (3) entre CGs, astrocitos y los plexos vasculares internos.

Moléculas endotelinérgicas en el EP

En el EP encontramos inmunorreactividad moderada para ET-1 y sus dos precursores. Ya que la secreción constitutiva de ET-1 en el EP es predominantemente hacia el lado basolateral (Narayan y col., 2004), la ET-1 liberada podría actuar sobre receptores endotelinérgicos localizados en los endotelios de los vasos coroideos (Polak y col., 2001, Fuchsjager-Mayrl y col., 2003). Es decir, que la liberación de ET-1 podría modular el flujo sanguíneo en la coriocapilaris. Aunque fueron inicialmente considerados como un lecho vascular pasivo, los vasos coroideos pueden responder a la señalización endotelinérgica, principalmente a través de ETR-A (Polak y col., 2001, Fuchsjager-Mayrl y col., 2003). ET-1 y sus receptores también están involucrados en la vasoconstricción que ocurre durante la hiperoxia aguda (Dallinger y col., 2000) y el ejercicio isométrico (Fuchsjager-Mayrl y col., 2003).

La presencia de ETR-A en el EP indicaría la existencia de un circuito autócrino en estas células. Se ha demostrado que ET-1 actúa sobre líneas celulares derivadas de EP, produciendo cambios en la concentración de Ca^{+2} intracelular (Wu y col., 2003c). ET-1 podría afectar la barrera hemato-retinal externa, perturbando las uniones intercelulares o por otros medios (Narayan y col., 2003).

Moléculas endotelinérgicas en la CPE

En la CPE se localiza la primera sinapsis de la vía visual. Esta sinapsis, como describimos previamente, es una tríada que incluye terminales de las células bipolares y de las células horizontales. Los receptores endotelinérgicos parecen encontrarse en sitios específicos de estas sinapsis. La co-localización de ETR-A con los marcadores de proteínas del terminal sináptico, SV-2 y PSD-95, indica su presencia en el axón de los fotorreceptores. Por el contrario, ETR-B co-localiza

con una forma fosforilada del neurofilamento de 200 Kd, característico de las células horizontales. La presencia de inmunorreactividad Big-ET-1 en algunos fotorreceptores, sumada a la detección de ARNm de ET-2 en la retina externa (Rattner y Nathans, 2005) sugieren que los ligandos endotelinérgicos podrían tener un efecto autocrino sobre los mismos fotorreceptores, mediado por ETR-A.

Los receptores ETR-B ubicados en las células horizontales podrían transmitir señales visuales hacia esas células, y simultáneamente regular los niveles de ligandos en el espacio intersináptico. Además, las células horizontales son capaces de promediar la respuesta a niveles diferentes de luz y distribuir esa información a distintos fotorreceptores (Trumpler y col., 2008), otra función que podría estar relacionada con ETR-B expresado por las mismas.

Las uniones de hendidura existentes en la CNE, tanto entre las células horizontales, entre fotorreceptores y células horizontales, y entre bastones y conos (Dang y col., 2004, Ciolofan y col., 2007), constituyen otro blanco posible de las endotelinas.

Células ganglionares, astrocitos y vasos sanguíneos

Las células ganglionares mostraron inmunorreactividad prepro-ET-1 y ET-1 relativamente débiles, acompañada por inmunorreactividades Big-ET-1 y ETR-A muchos más intensas. La señalización endotelinérgica sobre las CGs, podría regular la transmisión en el nervio óptico. La inyección intravítrea de ET-1 induce un aumento inicial seguido de una fase más prolongada de reducción del transporte axonal anterógrado en las fibras del nervio óptico (Stokely y col., 2002). Este efecto también pudo ser mimetizado por ET-3, un potente agonista ETR-B (Stokely y col., 2002). ET-1 puede también bloquear en forma reversible el transporte axonal retrógrado en células ganglionares (Wang y col., 2008). Cabe notar que aunque la inmunohistoquímica mostró intensa inmunorreactividad ETR-A, muchos de los efectos descritos por otros autores pueden ser bloqueados o reproducidos por ligandos del receptor ETR-B. Por lo tanto, cabe preguntarse si la presencia de ETR-B en los núcleos celulares podría regular el transporte axónico.

Una hipótesis más sencilla es suponer que ETR-B se acumula en la envoltura nuclear y que su tráfico hacia la membrana plasmática está altamente regulado. Tal vez de manera análoga a lo que ocurre con el receptor PAEL (Omura y col., 2006).

El efecto de ET-1 sobre las células ganglionares también puede ser interpretado si tenemos en cuenta la cantidad de ET-1 y ETR-B contenida en los astrocitos de la retina. Nuestros hallazgos inmunohistoquímicos demuestran que los astrocitos de la retina almacenan mayores cantidades de endotelina que los astrocitos del cerebro (Castañeda, 2009). Como ET-1 puede ser internalizada mediante unión a ETR-B (D'Orleans-Juste y col., 2002), los astrocitos de la retina podrían funcionar como reservorios de ET-1. Dada su ubicación entre los vasos de la retina y las células ganglionares, podrían regular la disponibilidad de ETs en el espacio extracelular. La pérdida de CGs y sus axones después de la administración crónica de ET-1 (Oku y col., 1999, Chauhan y col., 2004), usualmente atribuida a la vasoconstricción endotelinergica podría quizás depender de la saturación de la capacidad de los astrocitos de captar ET-1. Los astrocitos también podrían controlar la disponibilidad de endotelina para la pared vascular. De este modo podrían regular el flujo circulatorio en la retina y la permeabilidad de la barrera hemato-retinal.

Endotelina en el nervio óptico

Nuestros hallazgos confirmaron la presencia de ET-1 y ETR-B en los astrocitos del nervio óptico, como fue demostrado en el nervio óptico de la rata (Prasanna y col., 2005). Las células inmunorreactivas para ET-1/ETR-B se distribuían de la misma manera que los astrocitos, siguiendo la disposición de las fibras mielinizadas (May y Lutjen-Drecoll, 2002). Confirmamos su naturaleza astrocitaria mediante el doble marcaje con GFAP. Cabe destacar que la infusión de ET-1 o el *crushing* del nervio óptico aumentan la expresión de ET-1 y ETR-B en estas células gliales (Rogers y col., 1997, Rogers y col., 2003). Estas moléculas también aumentan cuando se eleva la presión intraocular (Prasanna y col., 2005).

Curiosamente, solo encontramos expresión de ETR-A en la glia de la cabeza del nervio óptico, en estrecha asociación con los vasos sanguíneos que llegan a la retina. Su localización semeja la de las células peripapilares de la retina del pollo (Quesada y col., 2004). Esta disposición sugiere una función específica de ETR-A en el control del flujo sanguíneo. Por su ubicación particular en la cabeza del nervio óptico, podrían representar el sitio primario de lesión por aumento de la presión ocular (Wang y col., 2002).

Se ha demostrado que ET-1 actúa como un factor mitogénico sobre astrocitos de nervio óptico en cultivo, efecto que puede ser bloqueado por antagonistas de ambos receptores, ETR-A y ETR-B (Prasanna y col., 2002a). Además los astrocitos del nervio óptico liberan ET-1 bajo condiciones de hipoxia o en presencia de TNF- α (Desai y col., 2004).

La presencia de ETR-B en los núcleos de las células es intrigante. La presencia de receptores ETR-B nucleares no solo ha sido observada con inmunohistoquímica, sino que también ha sido demostrada por unión de radioligandos (Boivin y col., 2003). Recientemente se ha demostrado que ET-1 evoca liberación de Ca^{2+} en la envoltura nuclear (Wu y col., 2006b), pero todavía se desconoce si este fenómeno se asocia a los ETR-B nucleares.

En resumen, hemos demostrado la amplia distribución de ET-1 y sus receptores en diferentes capas de la retina neural y pigmentaria. La señalización endotelinérgica probablemente desempeñaría diferentes roles, incluyendo la regulación de la circulación retiniana y coroidea, modulación de la transmisión sináptica y control de la información transmitida desde la retina por los axones de las células ganglionares. Los astrocitos podrían estar involucrados en este fenómeno, manejando los niveles de ET-1 disponible para las CG y sus axones. En tanto que las células horizontales cumplirían un rol semejante en la retina externa.

Capítulo 4

Moléculas endotelinérgicas en la degeneración inducida por luz

Introducción y objetivos específicos

Las degeneraciones de la retina son la principal causa de ceguera incurable. Muchas de ellas obedecen a la pérdida de los fotorreceptores, como en el caso de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), que es una de las causas de ceguera más frecuentes en los países desarrollados. Aunque los mecanismos de muerte del fotorreceptor son heterogéneos, muchas veces resulta de un trastorno en la regeneración y mantenimiento del segmento externo (Lee y Flannery, 2007). Esta lesión del segmento externo precede a la muerte del fotorreceptor, que generalmente ocurre por apoptosis (Portera-Cailliau y col., 1994).

La apoptosis, o muerte celular programada, es un mecanismo de muerte celular altamente regulado. Las células que sufren apoptosis se encogen y condensan. El citoesqueleto se colapsa y la envoltura nuclear se desarma. La superficie celular se modifica, exponiéndose en la superficie ciertos marcadores que aseguran una rápida fagocitosis antes que los contenidos de la célula pasen al espacio extracelular. El ADN se fragmenta en unidades nucleosómicas (Portera-Cailliau y col., 1994, Elmore, 2007, Bouchier-Hayes y col., 2008).

Las caspasas (cysteine aspartate-specific proteases), desencadenan la muerte celular por clivaje de proteínas esenciales del citoplasma y del núcleo. Son sintetizadas como zimógenos inactivos que se activan por clivaje proteolítico cuando se gatilla la muerte celular (Earnshaw y col., 1999). Las señales de muerte pueden tener un origen extra- o intracelular y siguen la vía de las caspasas, que comienza con la activación de las caspasas iniciadoras (caspasas 8 y 9) y concluye con la de las caspasas ejecutoras (caspasas 3 y 6). Se ha demostrado que el bloqueo de la caspasa-3 preserva la retina en roedores con degeneración de los

fotorreceptores de origen genético (Liu y col., 1999, Yoshizawa y col., 2002, Bode y Wolfrum, 2003).

Como se describió en el Capítulo 1, la degeneración de la retina inducida por luz ha sido extensamente estudiada, ya que comprime en el tiempo el proceso patogénico de la DMAE (Marc y col., 2008). La capacidad de la estimulación luminosa prolongada para iniciar la muerte de los fotorreceptores en los roedores albinos involucra múltiples componentes, entre los que se incluyen el ciclo de la rodopsina, el procesamiento de los retinoides y la generación de especies del oxidantes (Organisciak y col., 1999). La severidad de esta degeneración depende de la duración del estímulo luminoso, su intensidad, y su relación con el ritmo circadiano. Suele ser más pronunciada en la retina dorsal o superior (Vaughan y col., 2003).

El daño de los fotorreceptores está mediado por la rodopsina y depende de los niveles de iluminación y el tiempo de exposición (Organisciak y col., 1989). En la degeneración inducida por luz se ponen en juego distintos mecanismos apoptóticos, en proporción variable según la especie y cepa del modelo experimental y según la intensidad de la luz utilizada (Wenzel y col., 2005, Perche y col., 2007).

En este capítulo analizaremos los cambios sufridos por la retina en nuestro modelo de injuria inducida por luz. Recordemos que se trata de un modelo crónico, donde la muerte de los fotorreceptores no ocurre de inmediato. Por lo tanto, nos interesará describir los cambios que sufren las distintas capas a lo largo del período experimental (1 a 18 días de iluminación constante a 1.500 lux) y las modificaciones sufridas por las moléculas endotelinérgicas durante ese mismo período.

Resultados

Características del proceso degenerativo

Alteraciones estructurales

Utilizamos cortes de retina teñidas con rojo neutro para observar el impacto de la exposición a niveles tóxicos de luz, sobre las diferentes capas de la retina (Fig. 4.1). Durante el primer día de exposición no se detectaron cambios en la morfología de la retina. Durante el segundo día, sin embargo, se puso de manifiesto la alteración de los segmentos externos de los fotorreceptores. Estos aparecían desorganizados y con pérdida de su continuidad.

Las mismas modificaciones se observaron a los 4 días de exposición. Sin embargo, en esta etapa de la degeneración, se distinguía claramente una zona más dañada en el cuadrante temporal dorsal de la retina, donde los segmentos externos estaban casi totalmente destruidos. En el resto de la retina solo aparecía daño moderado de los segmentos externos. A los 4 días de exposición, en el cuadrante dorsotemporal, la CNE mostraba pérdida de aproximadamente la mitad de sus núcleos, mientras que en el resto de la retina presentaba mínimas reducciones. En la zona de degeneración más severa, también se observaba disminución del espesor de la CPE.

La pérdida de segmentos externos y núcleos de fotorreceptores continuó progresivamente en toda la extensión de la retina. Después de 18 días de exposición a 1.500 lux, no se observaban segmentos externos en ningún lugar de la retina y la CNE solo tenía 1-3 hileras de núcleos. Esta reducción no se restringía al cuadrante dorsotemporal sino que abarcaba toda la extensión de la retina. En estos animales, la CPE había desaparecido casi por completo.

Reducción de los niveles de opsina

Estudiamos los niveles de opsina mediante Western blot en homogenatos de retinas de animales con régimen de iluminación normal o expuestos a 1.500 lux. La densidad de la banda de opsina de 40 Kd se redujo levemente a los 2 días de exposición, mientras que a los 4 días estaba en el límite de detección de nuestro método y a los 6 días era indetectable (no mostrado).

Activación de la caspasa-3

La caspasa-3 es una de las moléculas ejecutoras de la apoptosis. Esta proteína carece de actividad proteolítica en las células normales, ya que dicha actividad depende del clivaje del prodominio. La presencia de caspasa-3-clivada (C3C) en una célula es un indicio cierto de apoptosis y su participación en el modelo de injuria retinal por luz ha sido demostrada (Wang y col., 2007). Investigamos esta molécula por tres métodos diferentes: inmunocitoquímica, Western blot y actividad enzimática. Ninguno de ellos detectó C3C en la retina de animales con régimen de iluminación normal. En cortes de retinas, algunos pocos núcleos C3C+ aparecieron en la CNE después de 2 días de exposición, cuando la retina todavía no mostraba daño estructural evidente. Sin embargo, el número de núcleos C3C+ aumentó considerablemente después de 4 días de exposición a 1.500 lux (Fig. 4.2.).

Particularidades de este modelo de degeneración

Nuestras observaciones indican que la degeneración de los fotorreceptores se produjo gradualmente, en forma proporcional al tiempo de exposición. Primero desaparecieron los segmentos externos, luego aparecieron los signos de apoptosis. La muerte del fotorreceptor se desencadenaría después de la lesión primaria del segmento externo inducida por la luz, tal como ocurre en diversas enfermedades genéticas (Portera-Cailliau y col., 1994, Pacione y col., 2003, Palamalai y col., 2006).

Modificaciones del sistema endotelinérgico asociadas a la injuria luminosa

En primer término realizamos un estudio de la retina expuesta a la luz por 2 o 4 días, con el propósito de determinar la existencia de cambios en el sistema endotelinérgico durante el período inicial de la degeneración. Luego evaluamos en forma cuantitativa los cambios ocurridos a nivel de la capa de astrocitos, que mostraba las diferencias más importantes en la inmunorreactividad de moléculas endotelinérgicas. En una tercera etapa, analizamos las modificaciones en los niveles de ARNms de moléculas endotelinérgicas asociados a la degeneración de la retina.

Estudio inmunohistoquímico de ET-1 y ETR-B

En los animales sometidos a iluminación continua durante 1-2 días no se detectaron cambios en la localización o intensidad de la inmunorreactividad de ET-1. Entre los 4 y 6 días se observaron cambios manifiestos en el EP, la CPE y los astrocitos. La inmunorreactividad ET-1 se intensificó en el EP, aumentando a medida que se prolongaba la exposición. Por el contrario, la inmunorreactividad de la CPE desapareció a medida que disminuían el número de núcleos en la CNE y el espesor de la CPE.

Los cambios en la capa de astrocitos comenzaron entre los 2 y 4 días. Después de 6 días de exposición (Fig. 4.3A) se observó un marcado aumento de la inmunorreactividad ET-1 con un simultáneo aumento del número y extensión de sus prolongaciones. Estas cubrían completamente la superficie vítrea y formaban una gruesa capa perivascular. Modificaciones similares, aunque de mayor intensidad, se observaron después de 18 días de exposición (Fig. 4.3B). La inmunorreactividad ET-1 en el EP y en los astrocitos, era todavía más intensa que a los 6 días. El aumento en los astrocitos se reflejó por la presencia de gran número de prolongaciones endotelinérgicas en la zona vítrea. Asimismo, a los 18 días de iluminación, aparición inmunorreactividad ET-1 en algunas delgadas prolongaciones radiales. Recordemos además que, después de este largo período de iluminación intensa, las alteraciones degenerativas se extendieron a toda la

superficie de la retina, mientras que en los períodos más tempranos solo afectaban a la zona dorsotemporal.

Para comprender la relación entre las células endotelinérgicas y la activación glial, se evaluó la presencia de GFAP en cortes semejantes a los utilizados para ET-1. El marcador glial evidenció una intensa activación en la zona de los astrocitos y en la zona de las células de Müller (Fig. 4.4). En la zona de los astrocitos, tanto a lo largo de la superficie vítrea como alrededor de los vasos del plexo vascular interno, la inmunoreactividad de GFAP mostraba las mismas estructuras detectadas por el anticuerpo contra ET-1. Además, GFAP marcó numerosas prolongaciones radiales con la típica estructura de las células de Müller. Otras prolongaciones, menos abundantes, seguían cursos no radiales. Estas parecían ser semejantes a las detectadas por el anticuerpo contra ET-1. Estas prolongaciones GFAP+ que no seguían un trayecto radial podrían corresponder a prolongaciones aberrantes de los astrocitos y/o de las células de Müller. También podrían reflejar la hipertrofia de las prolongaciones gliales perivasculares alrededor de los vasos que comunican a los plexos vasculares interno y externo de la retina.

El aumento de ET-1 en los astrocitos asociado a la exposición luminosa fue confirmado por inmunofluorescencia confocal en preparaciones enteras de retina (Fig. 4.5). De la misma manera se confirmó el notable aumento en el tamaño y complejidad de sus prolongaciones. Por otra parte, a fin de evaluar la presencia de ET-1 en las células de Müller, se hicieron dobles marcajes fluorescentes con glutamino sintasa (GS). Se estudiaron retinas controles y retinas expuestas a la luz durante 6 días (Fig. 4.6). Estas preparaciones confirmaron el aumento de la inmunofluorescencia ET-1, la mayor complejidad de las prolongaciones endotelinérgicas y su asociación vascular. En ninguno de estos experimentos se encontró co-localización entre ET-1 y GS, confirmando que ET-1 se encontraría en los astrocitos. Las imágenes también indicaron la ausencia de ET-1 en las células de Müller. Sin embargo, no es posible excluir completamente la presencia de este péptido en las células de Müller, pues podría encontrarse en concentraciones relativamente bajas, no detectables mediante inmunofluorescencia.

También utilizamos doble marcaje inmunofluorescente para identificar las células que presentan ETR-B (Fig. 4.7). Tanto en los animales controles como en los expuestos a la luz durante 6 días se encontró completa co-localización de ambos marcadores. Estos experimentos confirmaron la presencia de ETR-B en los astrocitos.

Inmunorreactividad ET-1 y ETR-B en la capa de astrocitos

Utilizamos preparaciones inmunofluorescentes de retinas montadas enteras para medir, mediante análisis cuantitativo de imágenes, los cambios en la expresión de ET-1 y ETR-B en la capa de astrocitos, a nivel de la superficie vítrea (Fig. 4.8 A y B). Para esto se compararon retinas no expuestas, o expuestas durante 6 o 18 días ($n = 3-5$ retinas para cada período). En cada retina se analizaron 3 campos (para más detalles ver Cap. 2). Los resultados se expresaron como porcentajes del área marcada sobre el área total muestreada. La comparación estadística se realizó mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para evaluar los cambios de ET-1 se utilizaron retinas procesadas con el método inmunofluorescente. No se detectaron cambios significativos de la inmunorreactividad entre las retinas controles y las expuestas durante 6 días. Por el contrario, se observaron grandes cambios entre estas retinas y las expuestas a 18 días de iluminación continua ($P < 0,001$).

Los cambios de ETR-B fueron evaluados en retinas procesadas con el método inmunofluorescente. Se observó un aumento significativo a los 6 días ($P < 0,05$). A los 18 días el aumento fue todavía mayor ($P < 0,001$).

Cambios en la expresión de moléculas endotelinérgicas

Para evaluar la expresión de los ARNms correspondientes a cada ET utilizamos la técnica de RT-PCR clásica en forma semicuantitativa. Para lograr esta valoración se hicieron pruebas piloto que permitieron encontrar los tiempos y concentraciones de reactivos necesarios para obtener producto de transcripción (unidades densitométricas) en forma proporcional a la cantidad de ARN total utilizado. Para uniformar los datos, los resultados se expresaron como la razón

entre la densidad óptica de la banda correspondiente a cada molécula de interés y la densidad óptica de la banda del gen standard GAPDH (para más detalles ver Cap. 2). Los datos presentados corresponden a 4 muestras para cada período de exposición (Fig. 4.9).

Medimos los niveles de ARNms en dos momentos del proceso degenerativo: a los 2 días cuando aparecían los primeros signos histológicos de la degeneración, y a los 4 días, cuando en la zona dorsotemporal desaparecieron todos los segmentos externos y buena parte de los núcleos de los fotorreceptores (Fig 4.9)

Los ARNms de ET-1 y ET-2 aumentaron luego de sólo 2 días de iluminación continua. El mayor incremento se observó en los niveles del precursor de ET-2 (test de Kruskal-Wallis, con un post-test de Dunn, $p < 0,01$). Durante ese período no hubo aumentos de ET-3; por el contrario, se observó una ligera reducción.

El aumento de ET-1 fue aún mayor después de 4 días de exposición a la luz. Por el contrario, los niveles de ET-2 se mantuvieron prácticamente en los alcanzados a los 2 días. A los 4 días, la isoforma ET-3 disminuyó por debajo de lo observado a los 2 días injuria luminosa. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas según test de Kruskal-Wallis, con un post-test de Dunn (para ET-1 $p < 0,01$, para ET-2 $p < 0,05$, ET-3 $p < 0,05$).

Los niveles de ARNm de ETR-A mostraron una tendencia a disminuir durante la exposición, mientras que los de ETR-B parecían aumentar. Sin embargo, esas diferencias no fueron significativas.

Discusión

En este capítulo hemos descripto variaciones en las moléculas endotelinérgicas asociadas al proceso de degeneración retinal inducida por luz. La principal característica de este modelo es la degeneración de los segmentos externos y la muerte progresiva de los fotorreceptores, evidenciada por la reducción de la opsina y la aparición gradual de núcleos C3C⁺ desde los 2 días de exposición a luz y la reducción de la CNE y CPE y con ello de los niveles de opsina. Con respecto a las moléculas endotelinérgicas, los cambios más acentuados ocurrieron en la CPE con la desaparición de las estructuras ET-1+ y ETR-A+ y en la capa de astrocitos, donde aumentaron ET-1 y su receptor ETR-B. Además el EP sufrió incrementos en la marcación para ET-1 y ETR-A. El análisis de los ARNm indicó que la isoforma ET-2 es la que sufre mayor alteración en sus niveles de expresión en este modelo de injuria retinal.

La desaparición de las estructuras endotelinérgicas de la CPE apoyaría la existencia de ET-1 y ETR-A en los terminales de los fotorreceptores. La ubicación del receptor en este terminal sugiere un circuito autocrino que permitiría a la endotelina modular la liberación del neurotransmisor glutamato. ETR-A en su estado activo puede modular los niveles de Ca intracelulares y, en los terminales sinápticos de los bastones esos cambios modifican la liberación del neurotransmisor, afectando de esta manera la respuesta del fotorreceptor a la luz (Szikra y col., 2008).

Recordemos que, como se describió en el capítulo 3, el EP presenta otro circuito autocrino ET-1 y ETR-A. Estos componentes del sistema endotelinérgico han sido asociados con la supervivencia de células sometidas a condiciones apoptóticas (Del Bufalo y col., 2002). Tanto a nivel del EP como de los fotorreceptores, ET-1 y ETR-A podrían quizás promover la sobrevida de las células del EP y bloquear estímulos apoptóticos en retinas sometidas a estrés lumínico.

El aumento de los ARNm de ET-1 y en mayor medida de ET-2 indica que la señalización endotelinérgica podría ser un componente importante en el inicio de la degeneración retinal inducida por luz. El aumento del ARNm de ET-2 fue

también observado en un modelo agudo de degeneración de retina inducida por luz (Rattner y Nathans, 2005). Sin embargo, todavía no se ha clarificado cuál es el papel de las endotelinas en este proceso. Por una parte, podrían regular la transmisión visual, protegiendo de esta manera al resto de la retina. Alternativamente, podrían regular el balance entre los mecanismos de supervivencia y muerte de los fotorreceptores (Chaum, 2003).

Por otro lado, se observó un incremento en los niveles de GFAP, tanto en astrocitos como en células de Müller, con aumentos de ET-1 y ETR-B en los astrocitos. La activación de los astrocitos es una característica común a los procesos que ocasionan daños en el SNC (Sofroniew, 2005), y la activación de los astrocitos y las células de Müller ocurre también en asociación a alteraciones en la retina y el nervio óptico (Rogers y col., 1997, Wu y col., 2003b). ET-1 ha sido vinculada con muchas patologías del SNC que involucran gliosis reactiva (Jiang y col., 1993, Zhang y col., 1994, Nie y Olsson, 1996, Baba, 1998, Hasselblatt y col., 2001, Sofroniew, 2005). Las expresiones de ET-1 y ETR-B se encuentran aumentadas en astrocitos después de lesiones del cerebro y el nervio óptico (Jiang y col., 1993, Zhang y col., 1994, Rogers y col., 2003, Desai y col., 2004). Se sabe que los astrocitos son blancos de ET-1, que produce un aumento en la proliferación y/o hipertrofia de los mismos (Prasanna y col., 2002b, Hasselblatt y col., 2003, Wilhelmsson y col., 2004). ET-1 ha sido vinculada con la transformación de los astrocitos mediante incremento en los niveles de Ca (MacCumber y col., 1990). Además de inducir eflujos de glutamato (Sasaki y col., 1997), ET-1 activa la síntesis de ADN (Hama y col., 1997) y promueve la reorganización del citoesqueleto (Cazaubon y col., 1997).

La glia radial de Müller, también activada por la injuria luminosa, podría hacer de nexo entre los fotorreceptores en la retina externa y los astrocitos en la retina interna. La respuesta endotelinérgica de los astrocitos podría participar en mecanismos de neuroprotección capaces de reducir el daño sufrido por la retina. Por ejemplo, la activación endotelinérgica de los astrocitos podría estimular la producción de factores neurotróficos, tal como se ha demostrado en el cerebro (Koyama y col., 2003b). Estos factores neurotróficos actuarían directamente sobre

las neuronas de la retina interna e indirectamente, vía las células de Müller, sobre los fotorreceptores. Como se explicó en la introducción, muchos factores que tienen un efecto protector sobre los fotorreceptores no actúan directamente sobre estas células sino sobre las células de Müller (Wahlin y col., 2000, Bringmann y Reichenbach, 2001). Desde este punto de vista, la hipertrofia inicial de los astrocitos contribuiría a aumentar la disponibilidad de factores neurotróficos.

El incremento de inmunorreactividad ET-1 en las prolongaciones astrocíticas perivasculares asociado a la injuria luminosa, podría reflejar aumento real en el número de prolongaciones gliales y/o un aumento en la concentración intracelular de ET-1. La mayor disponibilidad perivascular de ET-1 podría determinar la reducción del flujo sanguíneo (Dallinger y col., 2000, Polak y col., 2001), tal como se observa en pacientes con retinitis pigmentosa (Grunwald y col., 1996).

Capítulo 5

Bloqueo de los receptores endotelinérgicos en la injuria luminosa

Introducción y objetivos específicos

Las endotelinas pueden participar de distintas maneras en los fenómenos apoptóticos. ET-1 es antiapoptótica en células endoteliales (Shichiri y col., 1997), pero es pro-apoptótica en células musculares lisas (Cattaruzza y col., 2000). En cardiomiocitos, mediante activación de receptores ETR-A, ET-1 previene la muerte inducida por estrés oxidativo, (Kakita y col., 2001), por agonistas beta-adrenérgicos (Araki y col., 2000), y por privación de suero (Ogata y col., 2003).

Por otra parte, vía los receptores ETR-B, ET-1 manifiesta efectos antiapoptóticos sobre el cerebelo postnatal de la rata (Vidovic y col., 2008). La misma vía sería pro-apoptótica sobre una línea de células ganglionares de la retina (Krishnamoorthy y col., 2008). Este último fenómeno, sin embargo, no debe confundirse con la muerte de células ganglionares inducida por inyecciones intravítreas de ET-1, debida fundamentalmente a la vasoconstricción (Lau y col., 2006). ET-1 también reduce la apoptosis en células de trofoblasto sometidas a hipoxia, un proceso que es acompañado por aumento de la expresión de ETR-B (Cervar-Zivkovic y col., 2007). La deficiencia de ETR-B aumenta la injuria neuronal en el hipocampo después de hipoxia-isquemia (Siren y col., 2002). Los agonistas ETR-B también bloquean la muerte neuronal inducida por la proteína beta amiloide, que se acumula en las lesiones de la enfermedad de Alzheimer (Yagami y col., 2002).

ET-1 tiene un importante efecto anti-apoptótico sobre células de melanoma y tumores malignos de próstata y ovario, que constituye la base del empleo de bloqueantes de los receptores endotelinérgicos como coadyuvantes en el tratamiento de dichos tumores (Grimshaw, 2007). Tanto la vía ETR-A (Rosano y col., 2007) como la ETR-B (Lahav y col., 2004) parecen estar involucradas en

este fenómeno anti-apoptótico. Además, ET-1 vía ETR-A también puede estimular la proliferación de ciertos tumores (Grant y col., 2007).

Recientemente, se compararon las 3 ETs como modificadores de la supervivencia de la línea híbrida HN33 (neurona de hipocampo de ratón × neuroblastoma) en ausencia de suero. Únicamente ET-1 tuvo un efecto anti-apoptótico, aunque solo en concentración 1 μ M (Park y Lee, 2008).

Aunque no existe información sobre los efectos anti- o pro-apoptóticos de ET-2, su expresión a nivel transcripcional aumenta en varios modelos de degeneración retinal y se lo considera un marcador de estrés retinal (Rattner y Nathans, 2005, Swiderski y col., 2007). Se presume que favorecería la apoptosis de los fotorreceptores, pero esto aún no ha podido ser demostrado fehacientemente (Bramall y col., 2007), ya que los correspondientes ratones knock-outs mueren precozmente por serias deficiencias de las vías termorregulatorias y del tabicamiento pulmonar (Abler y col., 1996). La ruptura del folículo ovulatorio depende de la expresión de ET-2 (Palanisamy y col., 2006), apoyando una función proapoptótica de esta isoforma.

ET-3, que actúa exclusivamente por vía ETR-B, previene la muerte neuronal inducida por fosfolipasa (Yagami y col., 2005).

La muerte neuronal en la retina así como también en el cerebro, es acompañada por la activación e hipertrofia de las células gliales (Wu y col., 2003a, Pekny y Pekna, 2004). La hipertrofia de las células gliales generalmente involucra aumentos de expresión de la proteína glial fibrilar ácida (Wilhelmsson y col., 2004). En la injuria retinal por luz hay activación de astrocitos y células de Müller (Torbidoni y col., 2005). Ha sido comprobado que la activación glial en algunas situaciones, es dependiente de ET-1 (Rogers y col., 2003). La hipertrofia de las células gliales puede ser un factor favorable o desfavorable para la supervivencia de las neuronas (Zack, 2000, Lewis y Fisher, 2003, Pekny y col., 2007)

Dado que tanto ETR-A como ETR-B se encuentran en la retina, y que además ambos aparecen en la CPE, los antecedentes previamente mencionados sugirieron

que el bloqueo de los receptores endotelinérgicos podría modificar el curso de la degeneración inducida por luz. Utilizamos tezosentan (Ro 61-0612, 5-isopropyl-pyridine-2-sulfonic acid 6-(2-hydroxy-ethoxy)-5-(2-methoxy-phenoxy)-2-(2-1H-tetrazol-5-yl-pyridin-4-yl)-pyrimidin-4-ylamide) un antagonista mixto específicamente diseñado para uso parenteral (Clozel y col., 1999), para evaluar las consecuencias del bloqueo endotelinérgico sobre la apoptosis de los fotorreceptores y la hipertrofia glial.

Diseño experimental

Los animales controles y los mantenidos a 1.500 lux fueron separados en dos subgrupos que recibieron ClNa 0.9% (Salina, S) o tezosentan (T), respectivamente. Tezosentan (Actelion Pharmaceuticals, Switzerland) fue administrado en dosis subcutáneas de 10 mg/kg/día. Se tomaron muestras a los 2 días de exposición, cuando se detectan los primeros signos de lesión de los fotorreceptores, y a los 4 días, cuando ya existe reducción manifiesta de la densidad de núcleos en la CNE (ver Cap. 4).

Para evaluar el efecto de tezosentan sobre la degeneración de la retina comparamos los valores de C3C como marcador de apoptosis, y los valores de GFAP como marcador de gliosis. Medimos la densidad de núcleos con inmunorreactividad para C3C en preparaciones de retina entera. Además se cuantificaron los niveles de proteína clivada por Western blot y se valoró su actividad enzimática mediante un método colorimétrico (Ver detalles en Cap. 2). La proteína GFAP fue medida por análisis de imágenes en cortes de retina y por Western blots en homogenatos de retina (ver Cap. 2).

Resultados

Caspasa-3 clivada

Actividad enzimática

La actividad de C3C fue evaluada en homogenatos de retinas, donde se analizó la absorbancia generada a partir de la incubación de 100 μg de proteínas totales con el análogo del sustrato de C3C, N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-pNA (Ac-DEVD-pNA), que genera un producto coloreado al ser clivado. La absorbancia se mide a 405 nm y se transforma mediante una curva standard a μM de sustrato clivados por cada muestra.

Se compararon muestras (3 retinas cada muestra) de animales sometidos a 1.500 lux durante 2 días, inyectados con salina y con tezosentan ($n = 7$ para cada grupo experimental).

Observamos que el tratamiento con tezosentan reduce la cantidad de sustrato clivado en muestras mantenidas por 2 días en iluminación continua en relación con las muestras inyectadas con salina (Fig. 5.1). Las diferencias entre los tratamientos fueron estadísticamente significativas (test de Wilcoxon, $p < 0,01$).

Recuento de núcleos C3C+

Para evaluar el efecto del bloqueo de los receptores endotelinérgicos elegimos contar los núcleos C3C+ en preparaciones de retina entera, ya que éstas permiten evaluar fácilmente toda superficie de la retina.

Nunca detectamos C3C en los animales mantenidos en condiciones basales de iluminación, con o sin bloqueo de los receptores endotelinérgicos. Al igual que en los cortes (ver Cap. 4), las preparaciones enteras solo mostraron núcleos inmunorreactivos para C3C (C3C+) después de 1 día (o más) a 1.500 lux. Los núcleos C3C+ fueron contados en el área dorsotemporal (Fig. 5.2A y B), que como ya se dijo, es la zona afectada en primer término por la injuria luminosa. Este recuento solo se hizo en retinas expuestas durante 4 días (Fig. 5.2C), ya que

su escaso número con exposiciones menores no permitía inferencias estadísticas. En los animales que recibieron salina se encontraron $30,4 \pm 14,9$ núcleos/unidad de área, mientras que en los tratados con tezosentan se observó una densidad mucho menor ($18,7 \pm 11,2$ núcleos/unidad de área). Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$, Mann Whitney).

Western blot para Caspasa 3 clivada

Los Western blots no detectaron bandas C3C+ en los homogenatos pertenecientes a animales mantenidos en condiciones basales de iluminación. Por el contrario, las bandas C3C+ aparecieron en los homogenatos provenientes de animales expuestos durante 2 días (2L). La evaluación cuantitativa ($n = 3$ para cada punto experimental) mostró reducción de las bandas C3C+ en los animales tratados con tezosentan en relación a aquellos que solamente recibieron salina (2L-T vs 2L-S), pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Las diferencias entre tratados y controles fue mucho mayor a los 4 días de exposición a 1.500 lux (4L-T vs 4L-S, $n = 8$). En los animales que solo recibieron salina, la densidad óptica de las bandas C3C+ fue 1,5-2 veces mayor que en los ratones tratados con tezosentan (Fig. 5.3). Las diferencias fueron estadísticamente significativas (Wilcoxon signed rank test, $p < 0,05$).

Gliosis

Detección inmunohistoquímica de GFAP

Como se describió en el Cap. 3, los animales mantenidos en condiciones basales de iluminación sólo presentan inmunofluorescencia GFAP en los astrocitos. La administración de tezosentan durante 4 días a animales mantenidos bajo condiciones basales de iluminación indujo una pequeña reacción glial perivascular (Fig. 5.4A y B)

En los animales expuestos a 1.500 lux durante idéntico período, se observó gran incremento de la inmunofluorescencia GFAP, que no solamente aparecía en las prolongaciones de los astrocitos sino que también marcaba la glia radial de

Müller. Tezosentan redujo notablemente la hiperexpresión de GFAP inducida por la injuria. En los animales expuestos a la luz y simultáneamente tratados con el bloqueante endotelinérgico, la expresión de GFAP prácticamente desapareció en la glía radial de Müller, y se redujo significativamente en los astrocitos (Fig. 5.4D y E).

Para evaluar los cambios en la capa astrocitaria, se efectuó análisis cuantitativo de imágenes en retinas montadas enteras (Fig. 5.5). La inmunofluorescencia GFAP en la capa de astrocitos de los animales bajo condiciones basales de iluminación no mostró modificaciones asociadas al tratamiento con tezosentan. Por lo tanto, se concluyó que el aumento de GFAP provocado por este bloqueante endotelinérgico en animales no expuestos a injuria luminosa afectaría principalmente a la glía perivascular.

En los animales expuestos a 1.500 lux durante 4 días, el área de inmunofluorescencia GFAP en la capa de astrocitos se duplicó con respecto a los controles (B-S = 13,19% \pm 3,56; 4L-S = 23,64% \pm 8,57). En animales expuestos de la misma manera pero inyectados con tezosentan, el área GFAP astrocitaria fue mucho menor (4L-T = 15,88% \pm 8,37). Los valores de los animales expuestos, analizados mediante prueba de Kruskal-Wallis con post test de Dunn para comparaciones múltiples, fueron significativamente diferentes de los controles y de los tratados con tezosentan ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente).

Evaluación de GFAP mediante Western blot

Observamos idéntico patrón de respuesta cuando GFAP fue detectado mediante Western blot (Fig. 5.6). Los niveles más bajos de GFAP correspondieron a los animales mantenidos en condiciones basales de iluminación e inyectados con el vehículo (B-S), mientras que los niveles más elevados se detectaron en los animales expuestos a 1.500 lux durante 4 días sin bloqueo endotelinérgico (4L-S). La diferencia entre ambos grupos experimentales era de unas 6 veces (6,52 veces \pm 2,54). El incremento observado por Western blot fue mucho mayor que el aumento detectado mediante análisis de imagen en la capa de astrocitos, ya que

los homogenatos de retina total incluyen no solo astrocitos sino también células de Müller.

El tratamiento con tezosentan redujo los niveles de GFAP en los animales expuestos (4L-T) hasta valores semejantes a los medidos en los animales bajo iluminación basal, con o sin tratamiento con tezosentan.

Discusión

En este capítulo hemos mostrado como el bloqueo endotelinérgico disminuye la apoptosis de los fotorreceptores y la gliosis inducidas por la injuria luminosa.

Tezosentan redujo la actividad de C3C en homogenatos de retinas expuestas a la luz. También disminuyó los niveles de esta proteína detectados mediante Western blot y el número de núcleos C3C+ en la CNE. Estos resultados sugieren que el bloqueo endotelinérgico reduce la respuesta apoptótica a la exposición a niveles tóxicos de luz. Un efecto semejante ha sido observado en cultivos de neuronas y glia, donde el bloqueo específico de ETR-A reduce la muerte neuronal y astrocitaria inducida por hipoxia (Danielyan y col., 2005). Lo contrario se observó en el giro dentado de ratas donde la carencia de ETR-B vuelve a las neuronas más susceptibles a la apoptosis (Rogers y col., 1997).

Tanto el análisis de imágenes como el Western blot indicaron que tezosentan también reducía los niveles de GFAP, aumentados como consecuencia de la injuria luminosa en astrocitos y células de Müller. Esta menor respuesta glial podría reflejar dos mecanismos diferentes que no se excluyen entre sí. Por una parte, al disminuir la muerte de los fotorreceptores disminuyen también los estímulos de la gliosis. Por la otra, el bloqueante actuaría directamente sobre los receptores endotelinérgicos de los astrocitos que estimulan su proliferación e hipertrofia (Pedram y col., 1998, Prasanna y col., 2002b, Hasselblatt y col., 2003, Wilhelmsson y col., 2004),

El pequeño incremento en la inmunoreactividad perivascular de GFAP inducido por tezosentan en condiciones basales de iluminación podría reflejar el incremento en los niveles de ET-1 circulante (Clozel y col., 1999), consecutivo al bloqueo de

los ETR-B endoteliales encargados de internalizar ET-1 (Gregan y col., 2004). Este incremento podría estar asociado a una función neuroprotectora, ya que también se observa como consecuencia del preconditionamiento isquémico (Casson y col., 2003).

Las endotelinas podrían participar en la transmisión sináptica de los fotorreceptores y esto requeriría un estrecho control de la concentración extracelular de ETs. La modulación de la transmisión sináptica también podría afectar la sobrevivencia de los fotorreceptores quizás mediante la regulación de los niveles de glutamato (Delyfer y col., 2005). La activación de ETR-A en los fotorreceptores, por un mecanismo autocrino o paracrino, podría controlar la concentración de Ca^{2+} intracelular (Shihara y col., 1998). Al regular la liberación de glutamato, ETR-A podría modificar la resistencia de los fotorreceptores a la injuria luminosa (Szikra y col., 2008).

El EP, que presenta ET-1 y ETR-A, también podría participar en la regulación de la sobrevivencia de los fotorreceptores (Narayan y col., 2003, Narayan y col., 2004, Torbidoni y col., 2005). La señalización endotelinérgica sobre el EP podría favorecer el reciclaje del retinol a velocidades adecuadas (Maeda y col., 2008, Radu y col., 2008) o contener factores antioxidantes (Winkler, 2008) y/o secretar factores de supervivencia (Siffroi-Fernandez y col., 2008).

Los hallazgos descritos en este capítulo demuestran que el bloqueo de los receptores endotelinérgicos modifica el curso de degeneración de los fotorreceptores inducida por exposición a la luz. Este efecto neuroprotector parece ser la resultante de una acción directa sobre el terminal presináptico del fotorreceptor, que modularía su sensibilidad a la injuria. A este efecto primario debe sumarse la regulación de la actividad endotelinérgica glial, que no solo reduciría la gliosis, sino que podría facilitar la disponibilidad de factores tróficos.

Capítulo 6

Vías de señalización intracelular afectadas por el eje endotelinérgico

Introducción

Vías de señalización involucradas en la muerte

Un intermediario crítico en la muerte de los fotorreceptores inducida por luz parece ser el factor de transcripción AP-1 (Proteína Activadora-1). AP-1 es un complejo dimérico formado por heterodímeros de proteínas de las familias Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) y Jun (c-Jun, JunD, JunB) u homodímeros formados por la unión de proteínas de la familia Jun solamente (Curran y Franza, 1988). Se ha propuesto que la luz induce la apoptosis de los fotorreceptores en ratones normales a través de la activación de la cascada AP-1 (Hao y col., 2002). Los ratones que carecen de c-fos, donde AP-1 no puede ser activado, son resistentes a la injuria provocada por la exposición a la luz (Hafezi y col., 1997, Kueng-Hitz y col., 2000). La inhibición del factor AP-1 por administración de dexametasona parenteral o cortisol endógeno también previene la degeneración de los fotorreceptores (Wenzel y col., 2001, Wenzel y col., 2005).

Los genes blancos del complejo AP-1 dependen de su composición específica. En la apoptosis de los fotorreceptores inducida por luz, AP-1 está principalmente integrado por las proteínas c-Fos, JunD y c-Jun (Hafezi y col., 1999b, Wenzel y col., 2000). La proteína JunD es prescindible (Bossy-Wetzel y col., 1997), pero c-Fos es esencial para la inducción y/o ejecución del programa de muerte celular en los fotorreceptores (Hafezi y col., 1997, Hafezi y col., 1999a).

La función de AP-1 puede ser modificada por la fosforilación de las proteínas que lo integran, producida por quinasas de proteína-activadas-por mitógenos (Mitogen-activated protein kinases, MAPKs) (Gu y col., 2007). Estas quinasas, aunque originalmente descubiertas como mediadores en el control del ciclo

celular, también pueden ser estimuladas por agentes inductores de estrés (Xue y Lucocq, 1997, Gu y col., 2007). En conjunto, forman tres cascadas de señalización conocidas como ERK (extracellular signal-regulated kinase, quinasa regulada por señales extracelulares), JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinase, kinasa de N-terminal c-Jun/quinasa activada por estrés) y por último la cascada de p38. Cada una de ellas incluye al menos tres proteínas quinasas que se activan de forma secuencial por medio de fosforilaciones, generalmente en grupos serina/treonina, culminando en una quinasa que es la encargada de fosforilar las proteínas blanco (c-Jun y c-fos, entre otras) y que otorga el nombre a cada familia. Los factores de transcripción que constituyen el blanco de las MAPKs tienen distintos niveles de expresión constitutiva. Esta es muy baja para las proteínas de la familia fos (Morgan y col., 1987), mientras que los ARNs de la familia jun se expresan en altos niveles en distintas regiones del cerebro (Mellstrom y col., 1991, Caputto y Guido, 2000). La transcripción de c-fos está altamente regulada y su promotor puede ser modulado por múltiples señales extracelulares que actúan directamente sobre sus elementos inducibles cis (Shaulian y Karin, 2001). La fosforilación de c-fos, tanto por p-p38 como por p-ERK 1/2, no parece ser imprescindible para su actividad transcripcional (Monje y col., 2003), pero la aumenta significativamente (Roduit y Schorderet, 2008).

Por el contrario, la actividad de c-Jun es principalmente regulada por fosforilación del residuo N-terminal en las serinas 63 y 73. JNK/SAPK es la principal responsable de la fosforilación de c-Jun, aunque las otras MAPKs también pueden bajo ciertas circunstancias fosforilar a c-Jun (Hunter y Karin, 1992).

El papel de las endotelinas

En algunos estudios se ha demostrado la capacidad de las ETs de regular funciones neuronales y/o gliales a través de la modulación de la vía de las MAPKs (Cramer y col., 2001). Sobre células ganglionares se ha demostrado que la administración de ET-1 produce cambios apoptóticos, con liberación de citocromo c al citosol e incremento de la fosforilación de JNK/SAPK (Krishnamoorthy y col., 2008).

La gliosis reactiva caracterizada por el aumento de la proteína GFAP y la proliferación de los astrocitos que ocurre en lesiones del tejido nervioso involucra el aumento de ET-1 y de su receptor ETR-B (Torbidoni y col., 2005, Gadea y col., 2008). En astrocitos en cultivo, ET-1 induce la activación de ETR-B, lo que estimula la activación de las MAPK, además de inducir la expresión de c-Jun. Este sería el mecanismo responsable de la activación y proliferación de los astrocitos (Schinelli y col., 2001b, Gadea y col., 2008).

Objetivos específicos

Debido al papel crítico del factor AP-1 en la muerte de los fotorreceptores, nos propusimos analizar el efecto de la iluminación crónica sobre la expresión de MAPKs y las dos proteínas integrantes del factor AP-1 (c-Jun y c-fos).

En segundo término, nuestra demostración previa de la reducción de la apoptosis en los fotorreceptores por acción de los bloqueantes endotelinérgicos, nos llevó a determinar el efecto de los receptores endotelinérgicos sobre la activación de las vías de señalización de estrés.

Diseño experimental

Se estudiaron animales expuestos a 1.500 lux durante 2 y 4 días, que recibieron CINA 0.9% (salina, S) o tezosentan (T) durante todo el período experimental. Los controles fueron animales mantenidos bajo condiciones basales de iluminación, inyectados con salina o tezosentan, respectivamente. Para evaluar la activación de la vías de estrés se efectuaron estudios inmunoenzimáticos en cortes de retina. Los anticuerpos, ya descritos en el capítulo 2, fueron: anti-fosfo-SAPK/JNK (p-JNK, forma activada), anti-fosfo-c-Jun (p-c-Jun, forma activada), c-fos y anti-fosfo-erk1/2 (p-ERK 1/2, forma activada).

Resultados

Inmunodetección de p-JNK

Bajo condiciones basales de iluminación, las retinas de animales inyectados con salina mostraron escasa inmunorreactividad p-JNK, localizada en la CPI. Esta última presentaba un patrón de inmunomarcación estratificado, que sugería la presencia selectiva de p-JNK en determinadas láminas sinápticas (Fig. 6.1A). Bajo las mismas condiciones de iluminación, pero después de administrar tezosentan, se observó mayor inmunorreactividad p-JNK. El aumento afectó principalmente a los estratos más internos de la CPI y a las células de Müller, que en los animales inyectados con salina no mostraban esta inmunorreactividad (Fig. 6.1B).

Después de 2 días de exposición a 1.500 lux, encontramos mayor inmunorreactividad p-JNK en todos los estratos de la CPI. También se marcaron algunas células de Müller (Fig. 6.1C). En animales tratados con tezosentan durante el período de exposición encontramos el mismo patrón de marcación pero con el agregado de inmunorreactividad p-JNK en la CPE.

En los animales inyectados con salina y 4 días de exposición, las retinas presentaban aumento de la marca en las células de Müller y aparición de p-JNK en la CPE. Después del tratamiento con tezosentan se observó mayor intensidad de la marca en la CPI.

En los homogenatos de retinas, los Western blots demostraron una banda de 46KD, consistente con el PM esperado para p-JNK. La intensidad de la banda aumentó con la exposición a la luz. Las diferencias densitométricas entre los animales tratados con tezosentan y los no-tratados no fueron significativas.

Inmunodetección de p-c-Jun

En los animales no expuestos e inyectados con salina, encontramos inmunomarcación p-c-Jun de moderada intensidad en núcleos celulares de la CCG

y de la CNI. Llamativamente, las fibras del nervio óptico mostraron intensa inmunorreactividad para esta molécula. Bajo condiciones basales de iluminación, tezosentan no modificó ni la intensidad ni la distribución de la inmunorreactividad para p-c-Jun (Figs. 6.2A y B).

Cuando expusimos los animales durante 1-2 días a iluminación continua, aumentó la proporción de núcleos inmunorreactivos en la CCG y la CNI. Los núcleos marcados predominaban en los estratos más externos de la CNI. Además, apareció inmunorreactividad en la CPI. Su distribución era difusa y no presentaba la estratificación observada para p-JNK. La inyección de tezosentan fue acompañada por incremento general de la inmunorreactividad p-c-Jun, tanto en la retina interna como en la externa. En la retina interna aumentó tanto la inmunorreactividad de la CPI como el número de núcleos marcados en la CNI. En la cara más externa de la CPI se observaron prolongaciones, paralelas a la CPE, intensamente teñidas, que podrían corresponder a células horizontales. En la retina externa, se encontró p-c-Jun en núcleos de la CNE y en algunos segmentos externos aún remanentes (Fig. 6.2C y D).

En las retinas expuestas durante 4 días sin bloqueo endotelinérgico, todas las capas de la retina interna estaban intensamente inmunoteñidas y en la CNI; todos los núcleos eran inmunorreactivos. También apareció inmunorreactividad nuclear en el EP. En las retinas tratadas con tezosentan, la inmunorreactividad de la CPI y los núcleos de la CNI era aún mayor que en las no tratadas. Como en los animales tratados y expuestos por dos días, se observaron estructuras semejantes a células horizontales, y los núcleos de la CNE estaban inmunoteñidos (Fig. 6.2E y F).

Los Western blots demostraron la banda de 47 KD esperada para p-c-Jun, cuya densidad y tamaño aumentaron en los animales expuestos a la luz por 2 y 4 días. El tratamiento con tezosentán no modificó significativamente el tamaño o densidad de las bandas.

Inmunodetección de p-ERK 1/2

Bajo condiciones basales y sin tratamiento antiendotelinérgico, las retinas presentaron inmunorreactividad p-ERK 1/2 en la CPI y en algunas células de la CNI. En la CPI se marcaron por lo menos 4 estratos, incluyendo el más interno. Estas estructuras aparecieron igualmente marcadas en las retinas tratadas con tezosentan, que además presentaron inmunotinción de la CPE (Fig. 6.3A y B).

Después de 2 días de iluminación, los animales que solo recibieron solución salina mostraron una reducción de la inmunomarcación p-ERK 1/2 en la CPI, que ahora sólo se observaba en sus estratos más externos. En estas retinas observamos una intensa inmunoreacción del cuerpo y las prolongaciones de las células de Müller, que no aparecía en los animales no expuestos. La marcación era particularmente intensa en las prolongaciones externas y la membrana limitante externa (MLE). En las retinas con bloqueo endotelinérgico, la CPI presentó mayor inmunorreactividad p-ERK 1/2, pero menos intensa que en los animales no expuestos y tratados con tezosentan. También se observó inmunoreacción en la CPE. Las células de Müller presentaron inmunorreactividad semejante a la observada en los animales sin bloqueo endotelinérgico.

La exposición durante 4 días, en los controles salinos, redujo la inmunoreacción p-ERK 1/2 a los estratos más externos de la CPI. El número de células de Müller inmunorreactivas también estaba muy reducido. Sin embargo, aparecieron algunos astrocitos con marcación nuclear y citoplasmática. En las retinas de animales tratados con tezosentan también se redujo la inmunorreactividad de la CPI. El número de células de Müller marcadas era menor que a los 2 días de exposición con bloqueo endotelinérgico. Sin embargo, a diferencia de las células de Müller de las expuestas por 4 días sin bloqueo, éstas presentaban nutridas arborizaciones de sus prolongaciones externas. En estas retinas también se observaron astrocitos con inmunorreactividad p-ERK 1/2.

Inmunodetección de c-fos

Las retinas de ratones mantenidos en condiciones basales de iluminación presentaron inmunorreactividad c-fos en unos pocos núcleos celulares de la CNI y la CCG. La mayor inmunorreactividad se observó en la capa de fotorreceptores, por fuera de la MLE. Este patrón de inmunorreactividad se observó tanto en los tratados con tezosentan como en sus respectivos controles (Fig. 6.4A y B).

Después de 2 días de exposición, el inmunomarcaje c-fos se redujo dramáticamente en los segmentos externos, pero aparecieron algunos pocos núcleos marcados en la CNE. Además, se observó un marcado incremento del número de núcleos inmunorreactivos en la CNI y la CCG. La primera solo mostraba núcleos c-fos+ en su borde interno. Los animales que recibieron tezosentan mostraron un patrón semejante, a excepción del mayor número de núcleos c-fos+ en la CNI, que aparecían en todo el espesor de la misma (Fig. 6.4C y D).

A los 4 días de injuria luminosa había desaparecido completamente la inmunorreactividad c-fos en la retina externa, salvo en unos pocos núcleos presentes en los restos de la CNE. En la CNI se observaron numerosos núcleos inmunorreactivos, con igual o mayor intensidad que a los dos días. Por el contrario, los núcleos marcados de la CCG se habían reducido, y aparecían con la misma densidad presente bajo iluminación basal. Las retinas tratadas con tezosentan presentaron numerosos núcleos positivos en la CNI, algunos en la ubicación y con la forma alargada características de los núcleos de las células de Müller, pero los núcleos c-fos+ de la CCG también se habían reducido (Fig. 6.4E y F).

Discusión

El balance entre la muerte y la supervivencia de las células de la retina es responsable de numerosas enfermedades de la retina, entre las cuales se cuentan la DMAE y la proliferación vitreoretinal (PVR). Las vías de señalización que controlan la supervivencia y la muerte pasan por la cadena de MAPKs. Estas quinasas son reguladas por fosforilación, y también controlan la fosforilación de los factores de transcripción que constituyen sus blancos. Diversos estudios experimentales, particularmente en roedores albinos, han caracterizado las vías moleculares que conectan la exposición a la luz con la degeneración de los fotorreceptores. Casi todos estos estudios implican la activación del factor de transcripción AP-1 como un paso esencial de este mecanismo patogénico (Reme, 2005). Sin embargo, los principales eslabones en la vía que determinan la susceptibilidad a la luz solo han sido descritos recientemente, en un síndrome genético canino (T4R RHO). Las moléculas intermedias estarían fundamentalmente localizadas en la CNI, presumiblemente en las células de Müller (Gu y col., 2007).

Describimos en este capítulo resultados originales que, no sólo confirman la importancia del factor AP-1 para la muerte de los fotorreceptores inducida por exposición a la luz, sino que además demuestran que su activación puede ser modificada por la señalización endotelinérgica.

Recordemos que el factor AP-1 es un regulador clave de numerosos procesos biológicos, y que puede ser inducido rápidamente en respuesta a diversas señales, entre las cuales se cuentan las tres cadenas de MAPKs, ERK, JNK/SAPK, y p38 (Karin y col., 1997). Por lo tanto, enfocamos nuestro estudio sobre cuatro marcadores relacionados con las dos primeras de estas cadenas: p-JNK/SAPK, p-c-Jun, p-ERK 1/2, y c-fos. La cadena p38 no fue incluida ya que no pudimos detectar inmunorreactividad de fosfo-p38 en las retinas normales o expuestas a la luz.

El primer dato de interés para nuestro análisis fue la distribución de los marcadores elegidos en la retina sometida a condiciones basales de iluminación,

que hemos definido como la exposición a 60 lux o menos, a las 12 hs del día. En estas retinas, p-JNK, p-c-Jun y p-ERK 1/2 fueron detectados en la retina interna. p-JNK y p-ERK 1/2 aparecían fundamentalmente en distintos estratos de la CPI. La localización de p-c-Jun era principalmente nuclear y aparecía en células de la CCG y de la CNI. Curiosamente, se encontró intensa inmunorreactividad p-c-Jun en las fibras del nervio óptico. p-ERK 1/2 se localizaba en varios estratos de la CPI y en algunos núcleos de la CNI.

Por otra parte, la inmunorreactividad c-fos se encontró en núcleos celulares con la misma distribución que p-c-Jun, pero además apareció en los segmentos externos de los fotorreceptores. Recordemos que c-Fos no es solamente un factor de transcripción, sino que también participa en la síntesis de fosfolípidos (Portal y col., 2007) y que su actividad en los fotorreceptores se correlaciona con este proceso y sus variaciones circadianas (Bussolino y col., 1998).

La injuria luminosa determinó cambios semejantes aunque no idénticos en la expresión de p-JNK y p-ERK 1/2. La inmunorreactividad de p-JNK aumentó en la CPI y simultáneamente apareció en células de Müller. A los 4 días de exposición a 1.500 lux, p-JNK también se detectaba en la CPE. Por el contrario, la inmunorreactividad p-ERK 1/2 en la CPI disminuyó hasta desaparecer por completo a los 4 días de exposición a la luz. En la CNI, donde las retinas controles solo mostraban inmunorreactividad p-ERK 1/2 en algunos núcleos, la exposición a la luz durante 2 indujo la aparición de inmunorreactividad en los núcleos y prolongaciones de las células de Müller. Esta inmunorreactividad decayó notablemente después de 4 días de exposición, simultáneamente con la desaparición de gran parte de la CNE. Sin embargo, se conservó la inmunorreactividad de la CPE, que no había sido detectada bajo condiciones basales de iluminación.

En las retinas expuestas a la luz, los componentes de AP-1 mantuvieron su ubicación nuclear. p-c-Jun apareció en un mayor número de núcleos, tanto de la CNI como de la CCG. El aumento fue mayor después de 4 días de exposición, cuando prácticamente todos los núcleos de la CNI y de la CCG mostraban esta inmunorreactividad. Las fibras del NO se mantuvieron intensamente teñidas. Los

núcleos c-fos+ aumentaron después de 2 días de exposición a 1.500 lux, tanto en la CNI como en la CCG. Este aumento, sin embargo, desapareció a los 4 días en las zonas con pérdida de la CNE. Cabe notar que la inmunorreactividad c-fos en los segmentos externos desapareció por completo a los 2 días, probablemente en relación con la alteración de los mismos.

La presencia de p-JNK y p-ERK 1/2 en las capas plexiformes indica su localización en prolongaciones neurales. Sin embargo, no contamos todavía con la evidencia necesaria para determinar cuál o cuáles de los fenotipos neuronales de la retina expresa estas quinasas. Tampoco tenemos información que nos permita explicar porque el aumento de p-JNK en la CPI es acompañado por un descenso de la inmunorreactividad p-ERK 1/2. Sin embargo, como las imágenes muestran que p-JNK y p-ERK 1/2 no ocupan los mismos estratos de la CPI, podemos especular que estarían selectivamente asociadas a las vías intraretinales ON y OFF.

Curiosamente, no encontramos inmunorreactividad de las quinasas ni de los componentes de AP-1 en la CNE. Las primeras, sin embargo, aparecieron en el citoplasma de las células de Müller. Es bastante conocido que los factores neurotróficos que protegen a los fotorreceptores lo hacen indirectamente a través de las células de Müller (Wahlin y col., 2000). Este efecto indirecto también ha sido observado en la injuria dependiente de N-methyl-D-aspartato, donde la neuroprotección requiere la activación de la cascada ERK 1/2 en las células de Müller (Nakazawa y col., 2008). Será necesario identificar el fenotipo de las células de la CNI que expresan p-c-jun y c-fos nuclear después de la exposición a niveles tóxicos de iluminación para comprender cuál es el efecto de la activación de estos factores en los animales que sólo recibieron salina durante la exposición a la luz.

Por otra parte, cabe señalar que la ausencia de inmunorreactividad p-ERK 1/2 en la CNE no excluye necesariamente su acción sobre los fotorreceptores. En cultivos de fotorreceptores injuriados por la incubación con paraquat, el ácido docosahexaenoico posee una acción neuroprotectora que ha sido correlacionada

con la fosforilación de ERK y que desaparece en presencia de inhibidores de MEK (German y col., 2006).

Con respecto al sistema endotelinérgico, resulta de gran interés señalar la activación de p-ERK 1/2 en los astrocitos de las retinas expuestas a la luz durante 4 días. Se ha demostrado que las endotelinas activan la vía de las MAPKs, una de las que sería afectada de forma directa por la activación de los ETR-B sería la cascada de ERK 1/2 (Cramer y col., 2001). ET-3, un ligando selectivo de los ETR-B, modula la proliferación de los astrocitos vía la regulación transcripcional del gen de respuesta temprana *egr-1*, que a su vez transactiva el gen del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) (Biesiada y col., 1996). La activación de *egr-1* dependería de ERK 1/2 (Sato y col., 1999). En cultivos de astrocitos cerebrales ET-1 activa las vías dependientes de p38 y ERK (Schinelli y col., 2001a), así como la vía JNK (Gadea y col., 2008). La aparición de inmunorreactividad p-ERK 1/2 en los astrocitos de retinas con lesión fototóxica confirmaría la activación de estas vías in vivo y permite especular sobre su posible papel en la gliosis que acompaña a la muerte de los fotorreceptores. Cabe mencionar también que en los astrocitos en cultivo, la liberación de factores neurotróficos también requiere la activación de ERK (Koyama y col., 2003a, Koyama y col., 2005).

En los animales expuestos a condiciones basales de iluminación, la administración de un bloqueante endotelinérgico modificó la expresión de p-JNK, p-ERK 1/2 y c-fos. Tezosentan redujo la inmunorreactividad de p-JNK en la CPI, aumentó la inmunorreactividad p-ERK 1/2 en la CPE y CNI, y redujo el número de núcleos c-fos+ en la CNI. Como la actividad de los componentes de AP-1 está directamente relacionada con la muerte de los fotorreceptores, la disminución inducida por tezosentan de los núcleos c-fos+ en la CNI estaría también relacionada con la reducción de la apoptosis en los fotorreceptores que hemos descrito en el capítulo anterior. El mecanismo de esta disminución es incierto, ya que no parecía tener correlación con las modificaciones de las quinasas p-JNK y p-ERK 1/2.

Resulta complejo analizar los cambios inducidos por tezosentan en los animales expuestos a la luz. La distribución de la inmunorreactividad p-JNK después de la

exposición a la luz durante 2 o 4 días, fue esencialmente similar en los animales inyectados con salina o tezosentan. Sin embargo, la distribución de p-c-Jun fue bastante diferente. Después del tratamiento con tezosentan, este componente de AP-1 apareció en la retina externa y en el EP. Este es un hallazgo novedoso, ya que hasta ahora, los tratamientos protectores de los fotorreceptores solo habían demostrado el aumento de c-Jun en la CNI, presumiblemente en las células de Müller (Gu y col., 2007). Se ha observado expresión de c-Jun en el EP después de desprendimiento de retina (Geller y col., 2001). Por otra parte, la fagocitosis de restos de fotorreceptores es acompañada por aumento en la expresión de genes de respuesta temprana en el EP (Ershov y col., 1996).

Las imágenes obtenidas sugieren que tezosentan aumentó la expresión de p-c-Jun, p-ERK 1/2 y c-fos en las células de Müller de los animales expuestos a la luz. Si aceptamos que éstas son las intermediarias en los efectos protectores de los fotorreceptores (Wahlin y col., 2000, Nakazawa y col., 2008), estos aumentos formarían parte de los mecanismos endotelinérgicos que regulan la sobrevida/muerte de los fotorreceptores.

Capítulo 7

Sobreexpresión endotelial de ET-1: efectos sobre la retina

Introducción y objetivos específicos

La pared de los vasos retinales está formada por un endotelio, con sus células adheridas mediante uniones ocluyentes. Por fuera, y separadas del endotelio por una membrana basal, se encuentran las células contráctiles, que según el calibre de cada vaso pueden ser pericitos y células musculares lisas. Finalmente, los vasos están recubiertos por prolongaciones de los astrocitos y de las células de Müller.

ET-1 es un potente vasoconstrictor de los vasos sanguíneos de la retina (Polak y col., 2003), y además regula las propiedades de las barreras hematoencefalicas (McCarron y col., 2006, Hembury y Mabondzo, 2008). Puede también estimular la proliferación de las células musculares lisas y pericitos de las paredes de los vasos retinales y parece ser un factor crucial en la patogenia de la retinopatía diabética (Iwasaki y col., 1998, Lam y col., 2003). En animales con diabetes crónica, los niveles de ET-1, ET-3 y sus receptores están aumentados (Chakrabarti y col., 1998). En estos animales, además, ET-1 produce alteraciones del flujo sanguíneo retinal (Deng y col., 1999). Por otro lado, como hemos demostrado en capítulos anteriores y como han demostrado otros autores, ET-1 promueve la gliosis de los astrocitos de la retina y del nervio óptico (Prasanna y col., 2002a, Torbidoni y col., 2006). Las consecuencias del desbalance en los niveles de ET-1 a nivel de la pared vascular, de causa endotelial o glial, necesariamente repercutiría en las patologías vasculares oftálmicas, tales como las relacionadas con la hipertensión, diabetes o isquemia.

Aunque la importancia de ET para el mantenimiento de la hipertensión arterial y el desarrollo de patología de órganos blanco ha sido ampliamente demostrada

(Schiffrin, 2001), su papel en la retinopatía hipertensiva es prácticamente desconocido. Se ha encontrado que en ratas espontáneamente hipertensas (ratas SHRs) existe muerte celular de fotorreceptores y células ganglionares, con hipertrofia de los astrocitos y aumento de la expresión de GFAP. Estos cambios fueron parcialmente revertidos por el control farmacológico de la tensión arterial (Sabbatini y col., 2001). En ratas hipertensas, el bloqueo de los receptores endotelinérgicos con bosentan reduce los procesos inflamatorios dependientes de ROS y el daño de los órganos blanco (Callera y col., 2003). Otros autores han demostrado que la hipertensión es un factor agravante de la retinopatía diabética (Silva y col., 2007).

Dado que los niveles de ETs serían un factor crucial para las alteraciones vasculares y neuronales retinales en patologías como la diabetes y la hipertensión, nos preguntamos cuál sería el impacto de la mayor disponibilidad de ET-1 de origen endotelial sobre la integridad general de la retina, haciendo puntual hincapié en los plexos vasculares, células gliales y los fotorreceptores.

Para este fin dispusimos de ratones transgénicos que sobreexpresan prepro-ET-1 a nivel endotelial pero no desarrollan aumento de la presión arterial (Amiri y col., 2004).

Diseño experimental

Usamos ojos de ratones C57BL6/J transgénicos (TG) y controles normales de la misma cepa (WT), proporcionados por el Dr. Ernesto L. Schiffrin, del Lady Davis Institute for Medical Research, Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, McGill University, situado en Montreal, Canadá. Los ratones TG contenían el cDNA correspondiente a la secuencia codificante para Prepro-ET-1 humana bajo la regulación del promotor/estimulador Tie-2, selectivamente expresado en endotelios. Se estudiaron ratones de 2 meses (TG = 4 y WT = 5) y 12 meses (TG n = 8 y WT n = 9) de edad, fijados mediante inmersión con paraformaldehído al 4%.

Para estudiar posibles cambios en la expresión del péptido ET-1 en las diferentes capas de la retina, se realizó inmunohistoquímica de retinas enteras y cortes transversales, con anticuerpos contra ET-1. Además para evaluar la activación glial como signo de estrés provocado por la sobreexpresión endotelinérgica, se evaluó la distribución de GFAP en retinas enteras y en cortes. En el caso de las retinas enteras realizamos cuantificación del área inmunorreactiva, por medio de análisis de imágenes, como previamente explicamos.

Para evaluar las alteraciones de la pared vascular estudiamos mediante inmunohistoquímica marcadores de células musculares lisas (actina de músculo liso, AML) y de pericitos (NG2) en secciones de retina. También evaluamos la presencia de caspasa 3 activada (C3C) como indicio de muerte celular.

Resultados

Ratones de 2 meses

En la retina de ratones TG de 2 meses, la distribución e intensidad de las inmunorreactividades de ET-1, GFAP, NG2 y AML eran similares a las observadas en las retinas de ratones WT (no mostrado).

Distribución de ET-1 y GFAP en retinas enteras

En las retinas de los animales normales (WT) de 1 año de edad, se detectó el patrón normal de expresión de ET-1 en los astrocitos. Estas células presentaron inmunorreactividad en el soma y en sus delgadas prolongaciones. En las retinas TGs se observó mayor inmunorreactividad para ET-1 en los astrocitos, que aparecían hipertróficos, con prolongaciones de mayor grosor que en las retinas normales (Fig. 7.1A y B)

GFAP aparecía en los astrocitos, tanto en la cepa salvaje como en la transgénica. Pero en los transgénicos (TG) se observó un marcado aumento de la densidad de astrocitos y de sus prolongaciones con inmunorreactividad GFAP (Fig. 7.1C y D).

Estas apreciaciones fueron confirmadas mediante análisis cuantitativo de imágenes, que demostró diferencias significativas en el área relativa (área inmunofluorescente/área muestreada). El área ocupada por ET-1 y GFAP en retinas normales (WT) fue menor que aquella ocupada en los TG (Fig. 7.2).

Distribución de ET-1 y GFAP en cortes de retina

En secciones de retina normal, se detectó inmunoreacción para ET-1 en astrocitos del borde vítreo, especialmente en aquellos asociados a vasos sanguíneos. No se observó inmunorreactividad para ET-1 en ninguna otra región de la retina. Cabe señalar que la inmunorreactividad perivascular observada en estos ratones era mayor que la descrita en los capítulos 4 y 5. Las diferencias pueden atribuirse al

diferente contexto genético (C57BL/6J vs Balb-c) y a la edad (12 meses vs 5-7 semanas).

Los cortes de retinas TG mostraron mayor inmunorreactividad ET-1 que las correspondientes a ratones WT. Al igual que en las retinas montadas enteras, las prolongaciones astrocitarias ocupaban una mayor proporción de la superficie vítrea en las retinas TG que en las retinas WT (Fig 7.3 A y B).

En la retina de ratones WT de 12 meses de edad, la inmunorreactividad GFAP se acumulaba en los astrocitos del borde vítreo y alrededor de los vasos del plexo vascular interno. También se observaron estructuras GFAP+ en la CPE, que presumiblemente corresponden a cubiertas gliales alrededor de los vasos del plexo retiniano externo.

En las retinas con sobreexpresión endotelinérgica, la inmunorreactividad GFAP se encontraba en los astrocitos del borde vítreo y en los perivasculares. Pero además aparecía en prolongaciones radiales que probablemente corresponderían a células de Müller. En los ratones TG, la inmunorreacción astrocitaria fue más intensa que la observada en las retinas normales (WT). Todos estos ratones mostraron mayor número de prolongaciones GFAP+ en el espesor de la retina (Fig. 7.3 C y D).

En las regiones laterales de la retina, se encuentran algunas prolongaciones radiales con intensa inmunorreactividad GFAP (Fig. 7.3E). El número de estas estructuras aumentó considerablemente en los animales TG (Fig. 7.3F), en los cuales también aumentó la inmunorreactividad GFAP en las prolongaciones celulares que forman la membrana limitante interna (MLI).

Células contráctiles de la retina

En secciones de retinas normales, la actina de músculo liso (AML) sólo fue detectada en las ramas de la arteria oftálmica y arteriolas del plexo vascular interno, próximas al soma de las CG y a los astrocitos. La inmunorreactividad AML aumentó en los TG de 12 meses. En estas retinas, la capa media parecía más gruesa que en los WT. El cambio más llamativo fue la aparición de células

musculares lisas alrededor de los vasos radiales que comunican el plexo más interno con los más extrnos. (Fig. 7.4A y B).

Los pericitos fueron identificados mediante el anticuerpo NG2, que reconoce un polisacárido complejo presente en estas células. En los animales WT, solo se identificaron pericitos en el plexo vascular más interno. En los TG, los pericitos eran mucho más numerosos, ya que no solo se encontraban en los vasos radiales comunicantes sino que también aparecían en el plexo vascular más externo, correspondiente a la CPE (Fig. 7.4 C y D).

Discusión

A los dos meses de edad, la retina de los ratones C57BL6/J transgénicos con sobreexpresión endotelial de ET-1 no era diferente de la retina de la variedad WT. Por el contrario, al año de edad se encontraron cambios hipertróficos de las células gliales y la pared de los vasos intrarretinianos.

Con respecto a la glía, observamos un aumento en la inmunorreactividad de ET-1 en los astrocitos y de GFAP en astrocitos y células de Müller. En el componente vascular, observamos el desarrollo de una capa media, con pericitos y células musculares lisas en vasos medianos y pequeños que normalmente no tienen esa cubierta.

Estas modificaciones de los vasos y su cobertura glial pueden ser atribuidas a una mayor disponibilidad de ET-1 en el espacio perivascular, ya que el endotelio aórtico de estos ratones contiene niveles de ARNm de prepro-ET1, 3 veces mayores que los ratones WT (Amiri y col., 2004). Además, ET-1 es preferentemente liberada hacia la cara abluminal del endotelio (Wagner y col., 1992).

La activación endotelinérgica ha sido asociada con la remodelación hipertrófica de la túnica media de las arterias de resistencia (Li y col., 1994). La remodelación vascular, que requiere la participación del sistema endotelinérgico, desempeña un papel en la fisiopatología de la hipertensión y la enfermedad cardiovascular (Schiffirin, 2001). La hiperplasia e hipertrofia de las células musculares vasculares responde a la estimulación endotelinérgica (vía ETR-A) a través de diversas vías de señalización que incluyen MAPKs, fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3-K) y proteína quinasa B (PKB) (Bouallegue y col., 2007). Sin embargo, la cascada seguida por la señal ET-1 es distinta de la que sigue a angiotensina II (Yogi y col., 2007).

Aunque el mecanismo endotelinérgico probablemente es semejante, la respuesta de los distintos lechos vasculares puede ser muy distinta. En este mismo modelo experimental, se detectó remodelación estructural y disfunción endotelial en las

arterias de resistencia del lecho mesentérico en ratones de 2 meses, sin detectarse incrementos en la presión arterial (Amiri y col., 2004). Por el contrario, en la retina solo se observaron modificaciones de la túnica media en ratones de 12 meses. Esta menor sensibilidad de la túnica media de los vasos retinianos seguramente puede ser correlacionada con las peculiaridades de este lecho vascular, que incluyen la ausencia de inervación autónoma y la presencia de una fuerte barrera hemato-retinal. Es decir, que la microcirculación de la retina está bajo el exclusivo control de moléculas liberadas por el endotelio, la glia y las neuronas que probablemente actúan a través de los pericitos (Matsugi y col., 1997). Estos se encuentran en todos los lechos vasculares, pero su proporción es mucho mayor en la retina. ET-1, vía los receptores ETR-A es uno de los principales reguladores de la contracción y proliferación de los pericitos retinales (Yamagishi y col., 1993, Kawamura y col., 2002).

La presencia de la barrera hemato-retinal y la glia perivascular podrían reducir la exposición de la túnica media a niveles elevados de ET-1. Los astrocitos expresan receptores ETR-B, que además de participar en la señalización endotelinérgica, pueden regular los niveles extracelulares de ET-1 por medio de la internalización (D'Orleans-Juste y col., 2002, Gregan y col., 2004). La simple acumulación del exceso de ET-1 proveniente del espacio perivascular solo explicaría el aumento de la inmunorreactividad ET-1 en los astrocitos. Sin embargo, en la retina de los TG la inmunorreactividad GFAP indica un aumento de la masa astrocitaria. Esta hipertrofia obedecería a un mecanismo más complejo, donde la activación de los ETR-B resulta en un aumento de la proliferación celular (Lazarini y col., 1996, Hasselblatt y col., 1998, Hasselblatt y col., 2001, Rogers y col., 2003, Gadea y col., 2008). La estimulación autocrina o paracrina de la vía ETR-B activa a su vez la vía JNK/c-Jun, y posiblemente a ERK (Gadea y col., 2008). Esta cascada de señales conduce a la proliferación y también se asocia con mayor expresión de GDNF (glia derived neurotrophic factor) (Koyama y col., 2003b), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) y neurotrophin-3 (Koyama y col., 2005).

Nuestras observaciones indican que la endotelina producida por el endotelio es capaz de alterar la túnica media de los vasos y producir activación de los

astrocitos. En la retina, sin embargo, las alteraciones de la túnica media aparecen a mayor edad que en otros lechos vasculares. Esta diferencia puede atribuirse al efecto regulador de los astrocitos, que limitarían la disponibilidad de endotelina tanto para el parénquima neuronal como para los pericitos y células musculares de la túnica media. Estos hallazgos son relevantes para comprender la retinopatía hipertensiva.

Capítulo 8

Conclusiones generales

Los experimentos presentados en esta tesis aportan nuevas evidencias sobre la participación de las endotelinas en la fisiología y patología de la retina, y permiten hacer inferencias con proyección a la clínica oftalmológica y cerebrovascular.

Los resultados obtenidos en nuestra investigación de la localización inmunohistoquímica de las distintas isoformas y precursores de ET-1 nos permiten afirmar que este péptido es producido en el epitelio pigmentario, los fotorreceptores, las células de la capa ganglionar y los astrocitos. Estas últimas células merecen un comentario especial, ya que acumulan grandes cantidades del péptido maduro. Concluimos que los astrocitos servirían como adaptadores fisiológicos capaces de equilibrar los niveles de ET-1 en el espacio extracelular, ya que podrían almacenar tanto el péptido proveniente del endotelio vascular, como el producido por las células de la retina. El empleo de una línea de ratones transgénicos que hiperexpresan ET-1 en el endotelio nos permitió confirmar parcialmente esta hipótesis.

Demostramos además, mediante la detección de los correspondientes ARNm, que la retina no solo expresa ET-1, sino también sus otras dos isoformas conocidas, ET-2 y ET-3. Curiosamente las tres isoformas se expresan de manera diferencial, ya que el ET-2 ARNm es mucho más abundante que los ET-1 y ET-3 ARNm. Será necesario continuar estos estudios para comprender el papel de cada una de estas moléculas.

Encontramos también que la retina expresa los dos receptores endotelinérgicos, ETR-A y ETR-B. La localización de los mismos predice la existencia de diversos circuitos autocrinos y paracrinos intrarretinales. Uno de ellos estaría localizado en la primera sinapsis de la vía visual, entre los fotorreceptores, las células bipolares

y las horizontales. La presencia del receptor ETR-A en el fotorreceptor y la de ETR-B en la célula horizontal podría constituir un sistema de regulación de la cantidad de neurotransmisor disponible para excitar o inhibir a las células bipolares. El circuito localizado a nivel del epitelio pigmentario, permitiría regular la barrera hemato-retinal externa y la interacción epitelio pigmentario-fotorreceptor de la que depende la supervivencia de las células visuales. El tercer circuito es el que utiliza a los astrocitos y su receptor ETR-B como sistema de almacenamiento y regulación.

Entendemos que estas propiedades del sistema endotelinérgico de la retina son importantes para la respuesta a la injuria, ya que pueden determinar la muerte o supervivencia de sus neuronas. Efectivamente, en la degeneración de la retina inducida por luz demostramos importantes modificaciones de las moléculas endotelinérgicas. Entre ellas, la desaparición de ET-1 y ETR-A que acompañan a la degeneración de los fotorreceptores, el aumento de los receptores ETR-A en neuronas secundarias de la vía visual, y el aumento de ET-1 y ETR-B en los astrocitos. Los rápidos cambios que ocurren en los astrocitos, relativamente alejados del sitio primario de la injuria luminosa en los fotorreceptores, nos muestran la importancia de las interacciones entre los diversos circuitos endotelinérgicos de la retina.

Comprobamos experimentalmente estas interacciones al estudiar el efecto del bloqueo farmacológico sobre el curso de la degeneración inducida por luz. El bloqueante utilizado, tezosentan, tuvo efectos beneficiosos sobre la degeneración, verificados por: la reducción de la caspasa 3 clivada, un marcador de muerte celular, en los fotorreceptores, reducción de la hipertrofia glial, tanto de los astrocitos como de las células de Müller.

Por otra parte, obtuvimos evidencia de la importancia de la señalización endotelinérgica sobre las cascadas intracelulares que activan genes pro- o antiapoptóticos. Estas cascadas de estrés, que estudiamos mediante la detección inmunohistoquímica de las quinasas JNK y ERK, y de factores de transcripción como c-fos y c-Jun, resultaron activadas selectivamente durante la exposición de las retinas a niveles tóxicos de iluminación. Más importante aún, logramos

demostrar como el bloqueo de los receptores endotelinérgicos puede modular las señales de estrés. Este es un hecho de potencial importancia clínica, ya que la degeneración de la retina inducida por la luz en los roedores reproduce en escala experimental, los eventos más característicos de la degeneración macular asociada con la edad, una de las causas más frecuentes de ceguera en los países desarrollados.

La localización celular de las señales de estrés nos permite postular una red de respuesta a la injuria. Entre los nodos de la red observados en nuestros experimentos se encuentran, la activación del factor de transcripción c-Jun en los núcleos de los fotorreceptores, y la activación de las quinasas ERK 1/ 2 en los astrocitos. Otro nodo importante, por la magnitud de las respuestas observadas, es el constituido por las células de Müller. Los bloqueantes endotelinérgicos modifican la respuesta al estrés de las células de Müller. Dada su gran extensión, las células de Müller pueden interactuar con todos los fenotipos retinales. Por lo tanto, los efectos endotelinérgicos sobre estas células podrían reflejar señales originadas en los astrocitos, las células ganglionares, las células amacrinas, las células horizontales o los fotorreceptores, es decir, cualquiera de los fenotipos retinales donde hemos demostrado la presencia de receptores endotelinérgicos. Sin embargo, realizamos algunos experimentos, no incluidos en esta tesis, que sugieren la presencia de bajas cantidades de ETR-B en las células de Müller. Directa o indirectamente, las señales endotelinérgicas llegan a las células de Müller, que parecen ser capaces de enviar señales neuroprotectoras a los fotorreceptores.

Por último evaluamos el impacto de la sobreexpresión endotelial de prepro-ET-1 sobre la retina murina. Este es también un modelo de relevancia clínica, ya que la alteración del sistema endotelinérgico vascular es un componente importante en la fisiopatología de la hipertensión arterial. El estudio de estos ratones transgénicos mostró dos aspectos desconocidos hasta ahora. En primer término, que la remodelación de la túnica media vascular causada por el exceso de endotelina endotelial es más lenta en la retina que en las arterias periféricas. Luego, que la remodelación vascular en la retina es acompañada por la hipertrofia de los

astrocitos y por la acumulación de ET-1 en los astrocitos. Este fenómeno, que probablemente contribuye a demorar la remodelación de la túnica media vascular, también produciría injuria difusa de la red retinal de respuesta al estrés.

Referencias

- Abler, A. S., Chang, C. J., Ful, J., Tso, M. O. y Lam, T. T., 1996. Photic injury triggers apoptosis of photoreceptor cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 92, 177-189.
- Altschuler, L. R., Parisi, M. N., Cagiao, L. F., Chiochio, S. R., Fernandez-Pol, J. A. y Zaninovich, A. A., 1993. Epidermal growth factor stimulates thyrotropin secretion in the rat. *Neuroendocrinology.* 57, 23-27.
- Amiri, F., Viridis, A., Neves, M. F., Iglarz, M., Seidah, N. G., Touyz, R. M., Reudelhuber, T. L. y Schiffrin, E. L., 2004. Endothelium-restricted overexpression of human endothelin-1 causes vascular remodeling and endothelial dysfunction. *Circulation.* 110, 2233-2240.
- Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H. y Nakanishi, S., 1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* 348, 730-732.
- Araki, M., Hasegawa, K., Iwai-Kanai, E., Fujita, M., Sawamura, T., Kakita, T., Wada, H., Morimoto, T. y Sasayama, S., 2000. Endothelin-1 as a protective factor against beta-adrenergic agonist-induced apoptosis in cardiac myocytes. *J Am Coll Cardiol.* 36, 1411-1418.
- Aramori, I. y Nakanishi, S., 1992. Coupling of two endothelin receptor subtypes to differing signal transduction in transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 267, 12468-12474.
- Baba, A., 1998. Role of endothelin B receptor signals in reactive astrocytes. *Life Sci.* 62, 1711-1715.
- Barthel, L. K. y Raymond, P. A., 1990. Improved method for obtaining 3-microns cryosections for immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem.* 38, 1383-1388.
- Bauer, B., Hartz, A. M. y Miller, D. S., 2007. Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol.* 71, 667-675.
- Biesiada, E., Razandi, M. y Levin, E. R., 1996. Egr-1 activates basic fibroblast growth factor transcription. Mechanistic implications for astrocyte proliferation. *J Biol Chem.* 271, 18576-18581.
- Blanks, J. C. y Johnson, L. V., 1986. Vascular atrophy in the retinal degenerative rd mouse. *J Comp Neurol.* 254, 543-553.
- Bode, C. y Wolfrum, U., 2003. Caspase-3 inhibitor reduces apoptotic photoreceptor cell death during inherited retinal degeneration in tubby mice. *Mol Vis.* 9, 144-150.
- Boivin, B., Chevalier, D., Villeneuve, L. R., Rousseau, E. y Allen, B. G., 2003. Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 278, 29153-29163.
- Bossy-Wetzell, E., Bakiri, L. y Yaniv, M., 1997. Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *Embo J.* 16, 1695-1709.
- Bouallegue, A., Daou, G. B. y Srivastava, A. K., 2007. Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells. *Curr Vasc Pharmacol.* 5, 45-52.
- Bouchier-Hayes, L., Munoz-Pinedo, C., Connell, S. y Green, D. R., 2008. Measuring apoptosis at the single cell level. *Methods.* 44, 222-228.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
- Bramall, A., Szego, M., Pacione, L., D'Orleans-Juste, P., Yanagisawa, M. y McInnes, R. R., 2007. The absence of endothelin-2 partially rescues photoreceptor (PR) death in two models of inherited photoreceptor degeneration (IPD). In: Benigni, A. (Ed.). *Proceedings of the 10th International Conference on Endothelin*, Bergamo, Italy, pp.

- Bremnes, T., Paasche, J. D., Mehlum, A., Sandberg, C., Bremnes, B. y Attramadal, H., 2000. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem.* 275, 17596-17604.
- Bringmann, A. y Reichenbach, A., 2001. Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci.* 6, E72-92.
- Bussolino, D. F., de Arriba Zerpa, G. A., Grabois, V. R., Conde, C. B., Guido, M. E. y Caputto, B. L., 1998. Light affects c-fos expression and phospholipid synthesis in both retinal ganglion cells and photoreceptor cells in an opposite way for each cell type. *Brain Res Mol Brain Res.* 58, 10-15.
- Callera, G. E., Touyz, R. M., Teixeira, S. A., Muscara, M. N., Carvalho, M. H., Fortes, Z. B., Nigro, D., Schiffrin, E. L. y Tostes, R. C., 2003. ETA receptor blockade decreases vascular superoxide generation in DOCA-salt hypertension. *Hypertension.* 42, 811-817.
- Cao, W., Tombran-Tink, J., Elias, R., Sezate, S., Mrazek, D. y McGinnis, J. F., 2001. In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42, 1646-1652.
- Caputto, B. L. y Guido, M. E., 2000. Immediate early gene expression within the visual system: light and circadian regulation in the retina and the suprachiasmatic nucleus. *Neurochem Res.* 25, 153-162.
- Casson, R. J., Wood, J. P., Melena, J., Chidlow, G. y Osborne, N. N., 2003. The effect of ischemic preconditioning on light-induced photoreceptor injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44, 1348-1354.
- Castañeda, M., 2009. En preparación.
- Cattaruzza, M., Dimigen, C., Ehrenreich, H. y Hecker, M., 2000. Stretch-induced endothelin B receptor-mediated apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Faseb J.* 14, 991-998.
- Cayouette, M., Behn, D., Sendtner, M., Lachapelle, P. y Gravel, C., 1998. Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. *J Neurosci.* 18, 9282-9293.
- Cazaubon, S., Chaverot, N., Romero, I. A., Girault, J. A., Adamson, P., Strosberg, A. D. y Couraud, P. O., 1997. Growth factor activity of endothelin-1 in primary astrocytes mediated by adhesion-dependent and -independent pathways. *J Neurosci.* 17, 6203-6212.
- Ceelen, P. W., Lockridge, A. y Newman, E. A., 2001. Electrical coupling between glial cells in the rat retina. *Glia.* 35, 1-13.
- Cellerino, A., Arango-Gonzalez, B. A. y Kohler, K., 1999. Effects of brain-derived neurotrophic factor on the development of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase-positive amacrine cells in the rodent retina. *Eur J Neurosci.* 11, 2824-2834.
- Cervar-Zivkovic, M., Hu, C., Barton, A., Sadovsky, Y., Desoye, G., Lang, U. y Nelson, D. M., 2007. Endothelin-1 attenuates apoptosis in cultured trophoblasts from term human placentas. *Reprod Sci.* 14, 430-439.
- Ciolofan, C., Lynn, B. D., Wellershaus, K., Willecke, K. y Nagy, J. I., 2007. Spatial relationships of connexin36, connexin57 and zonula occludens-1 in the outer plexiform layer of mouse retina. *Neuroscience.* 148, 473-488.
- Clozel, M., Ramuz, H., Clozel, J. P., Breu, V., Hess, P., Loffler, B. M., Coassolo, P. y Roux, S., 1999. Pharmacology of tezosentan, new endothelin receptor antagonist designed for parenteral use. *J Pharmacol Exp Ther.* 290, 840-846.
- Collado, M. P., Latorre, E., Fernandez, I., Aragones, M. D. y Catalan, R. E., 2003. Endothelin-1 decreases ethanolamine plasmalogen levels and evokes PAF production in brain microvessels. *Microvasc Res.* 66, 197-203.
- Cramer, H., Muller-Esterl, W. y Schroeder, C., 1998. Subtype-specific endothelin-A and endothelin-B receptor desensitization correlates with differential receptor phosphorylation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 31 Suppl 1, S203-206.
- Cramer, H., Schmenger, K., Heinrich, K., Horstmeyer, A., Boning, H., Breit, A., Piiper, A., Lundstrom, K., Muller-Esterl, W. y Schroeder, C., 2001. Coupling of endothelin

- receptors to the ERK/MAP kinase pathway. Roles of palmitoylation and G(alpha)q. *Eur J Biochem.* 268, 5449-5459.
- Cunha-Vaz, J. G., 2004. The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res.* 78, 715-721.
- Curran, T. y Franza, B. R., Jr., 1988. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell.* 55, 395-397.
- Chakrabarti, S., Gan, X. T., Merry, A., Karmazyn, M. y Sima, A. A., 1998. Augmented retinal endothelin-1, endothelin-3, endothelinA and endothelinB gene expression in chronic diabetes. *Curr Eye Res.* 17, 301-307.
- Chauhan, B. C., LeVatte, T. L., Jollimore, C. A., Yu, P. K., Reitsamer, H. A., Kelly, M. E., Yu, D. Y., Tremblay, F. y Archibald, M. L., 2004. Model of endothelin-1-induced chronic optic neuropathy in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45, 144-152.
- Chaum, E., 2003. Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. *J Cell Biochem.* 88, 57-75.
- Choi, Y. K. y Kim, K. W., 2008. AKAP12 in astrocytes induces barrier functions in human endothelial cells through protein kinase Czeta. *Febs J.* 275, 2338-2353.
- Chong, N. H., Alexander, R. A., Waters, L., Barnett, K. C., Bird, A. C. y Luthert, P. J., 1999. Repeated injections of a ciliary neurotrophic factor analogue leading to long-term photoreceptor survival in hereditary retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40, 1298-1305.
- Chrysostomou, V., Stone, J., Stowe, S., Barnett, N. L. y Valter, K., 2008. The status of cones in the rhodopsin mutant P23H-3 retina: light-regulated damage and repair in parallel with rods. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, 1116-1125.
- D'Orleans-Juste, P., Labonte, J., Bkaily, G., Choufani, S., Plante, M. y Honore, J. C., 2002. Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacol Ther.* 95, 221-238.
- Dacey, D. M., 1999. Primate retina: cell types, circuits and color opponency. *Prog Retin Eye Res.* 18, 737-763.
- Dallinger, S., Dorner, G. T., Wenzel, R., Graselli, U., Findl, O., Eichler, H. G., Wolzt, M. y Schmetterer, L., 2000. Endothelin-1 contributes to hyperoxia-induced vasoconstriction in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 864-869.
- Dang, L., Pulukuri, S., Mears, A. J., Swaroop, A., Reese, B. E. y Sitaramayya, A., 2004. Connexin 36 in photoreceptor cells: studies on transgenic rod-less and cone-less mouse retinas. *Mol Vis.* 10, 323-327.
- Danielyan, L., Mueller, L., Proksch, B., Kabisch, D., Weller, M., Wiesinger, H., Buniatian, G. H. y Gleiter, C. H., 2005. Similar protective effects of BQ-123 and erythropoietin on survival of neural cells and generation of neurons upon hypoxic injury. *Eur J Cell Biol.* 84, 907-913.
- Davenport, A. P. y Maguire, J. J., 1994. Is endothelin-induced vasoconstriction mediated only by ETA receptors in humans? *Trends Pharmacol Sci.* 15, 9-11.
- Davenport, A. P. y Maguire, J. J., 2006. Endothelin. *Handb Exp Pharmacol.* 176 Pt 1, 295-329.
- Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, R. K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, A. M., Armstrong, D. L., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P., Hofman, F., Kindy, M., Stern, D. y Zlokovic, B., 2003. RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med.* 9, 907-913.
- Dehouck, M. P., Vigne, P., Torpier, G., Breittmayer, J. P., Cecchelli, R. y Frelin, C., 1997. Endothelin-1 as a mediator of endothelial cell-pericyte interactions in bovine brain capillaries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 17, 464-469.
- Del Bufalo, D., Di Castro, V., Biroccio, A., Salani, D., Rosano, L., Spinella, F. y Bagnato, A., 2002. Endothelin-1 acts as a survival factor in ovarian carcinoma cells. *Clin Sci (Lond).* 103 Suppl 48, 302S-305S.
- Delyfer, M. N., Forster, V., Neveux, N., Picaud, S., Leveillard, T. y Sahel, J. A., 2005. Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the rd1 mouse retina. *Mol Vis.* 11, 688-696.

- Deng, D., Evans, T., Mukherjee, K., Downey, D. y Chakrabarti, S., 1999. Diabetes-induced vascular dysfunction in the retina: role of endothelins. *Diabetologia*. 42, 1228-1234.
- Desai, D., He, S., Yorio, T., Krishnamoorthy, R. R. y Prasanna, G., 2004. Hypoxia augments TNF-alpha-mediated endothelin-1 release and cell proliferation in human optic nerve head astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 318, 642-648.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M. y Kaufmann, S. H., 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 68, 383-424.
- Ehrenreich, H., Nau, T. R., Dembowski, C., Hasselblatt, M., Barth, M., Hahn, A., Schilling, L., Siren, A. L. y Bruck, W., 2000. Endothelin b receptor deficiency is associated with an increased rate of neuronal apoptosis in the dentate gyrus. *Neuroscience*. 95, 993-1001.
- Eichler, W., Kuhrt, H., Hoffmann, S., Wiedemann, P. y Reichenbach, A., 2000. VEGF release by retinal glia depends on both oxygen and glucose supply. *Neuroreport*. 11, 3533-3537.
- Eisenfeld, A. J., Bunt-Milam, A. H. y Sarthy, P. V., 1984. Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 25, 1321-1328.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 35, 495-516.
- Emoto, N. y Yanagisawa, M., 1995. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *J Biol Chem*. 270, 15262-15268.
- Ershov, A. V., Lukiw, W. J. y Bazan, N. G., 1996. Selective transcription factor induction in retinal pigment epithelial cells during photoreceptor phagocytosis. *J Biol Chem*. 271, 28458-28462.
- Fain, G. L., Matthews, H. R., Cornwall, M. C. y Koutalos, Y., 2001. Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev*. 81, 117-151.
- Faktorovich, E. G., Steinberg, R. H., Yasumura, D., Matthes, M. T. y LaVail, M. M., 1990. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature*. 347, 83-86.
- Faktorovich, E. G., Steinberg, R. H., Yasumura, D., Matthes, M. T. y LaVail, M. M., 1992. Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J Neurosci*. 12, 3554-3567.
- Fontaine, V., Kinkl, N., Sahel, J., Dreyfus, H. y Hicks, D., 1998. Survival of purified rat photoreceptors in vitro is stimulated directly by fibroblast growth factor-2. *J Neurosci*. 18, 9662-9672.
- Frank, R. N., Turczyn, T. J. y Das, A., 1990. Pericyte coverage of retinal and cerebral capillaries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 31, 999-1007.
- Frasson, M., Picaud, S., Leveillard, T., Simonutti, M., Mohand-Said, S., Dreyfus, H., Hicks, D. y Sabel, J., 1999. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 40, 2724-2734.
- Fuchsjaeger-Mayrl, G., Luksch, A., Malec, M., Polska, E., Wolzt, M. y Schmetterer, L., 2003. Role of endothelin-1 in choroidal blood flow regulation during isometric exercise in healthy humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44, 728-733.
- Fyhrquist, F., Saijonmaa, O., Metsarinne, K., Tikkanen, I., Rosenlof, K. y Tikkanen, T., 1990. Raised plasma endothelin-I concentration following cold pressor test. *Biochem Biophys Res Commun*. 169, 217-221.
- Gadea, A., Schinelli, S. y Gallo, V., 2008. Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J Neurosci*. 28, 2394-2408.
- Garcia, C. M., Darland, D. C., Massingham, L. J. y D'Amore, P. A., 2004. Endothelial cell-astrocyte interactions and TGF beta are required for induction of blood-neural barrier properties. *Brain Res Dev Brain Res*. 152, 25-38.

- Gardner, T. W., Lieth, E., Khin, S. A., Barber, A. J., Bonsall, D. J., Leshner, T., Rice, K. y Brennan, W. A., Jr., 1997. Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38, 2423-2427.
- Geller, S. F., Lewis, G. P. y Fisher, S. K., 2001. FGFR1, signaling, and AP-1 expression after retinal detachment: reactive Muller and RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42, 1363-1369.
- German, O. L., Insua, M. F., Gentili, C., Rotstein, N. P. y Politi, L. E., 2006. Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. *J Neurochem.* 98, 1507-1520.
- Glass, P., Avery, G. B., Subramanian, K. N., Keys, M. P., Sostek, A. M. y Friendly, D. S., 1985. Effect of bright light in the hospital nursery on the incidence of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med.* 313, 401-404.
- Graeber, M. B., Lopez-Redondo, F., Ikoma, E., Ishikawa, M., Imai, Y., Nakajima, K., Kreuzberg, G. W. y Kohsaka, S., 1998. The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res.* 813, 241-253.
- Grant, K., Knowles, J., Dawas, K., Burnstock, G., Taylor, I. y Loizidou, M., 2007. Mechanisms of endothelin 1-stimulated proliferation in colorectal cancer cell lines. *Br J Surg.* 94, 106-112.
- Gregan, B., Jurgensen, J., Papsdorf, G., Furkert, J., Schaefer, M., Beyermann, M., Rosenthal, W. y Oksche, A., 2004. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem.* 279, 27679-27687.
- Grimm, C., Wenzel, A., Hafezi, F. y Reme, C. E., 2000. Gene expression in the mouse retina: the effect of damaging light. *Mol Vis.* 6, 252-260.
- Grimshaw, M. J., 2007. Endothelins and hypoxia-inducible factor in cancer. *Endocr Relat Cancer.* 14, 233-244.
- Grunwald, J. E., Maguire, A. M. y Dupont, J., 1996. Retinal hemodynamics in retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol.* 122, 502-508.
- Gu, D., Beltran, W. A., Li, Z., Acland, G. M. y Aguirre, G. D., 2007. Clinical light exposure, photoreceptor degeneration, and AP-1 activation: a cell death or cell survival signal in the rhodopsin mutant retina? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48, 4907-4918.
- Guerin, C. J., Lewis, G. P., Fisher, S. K. y Anderson, D. H., 1993. Recovery of photoreceptor outer segment length and analysis of membrane assembly rates in regenerating primate photoreceptor outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 34, 175-183.
- Gulati, A., Rebello, S. y Kumar, A., 1997. Role of sympathetic nervous system in cardiovascular effects of centrally administered endothelin-1 in rats. *Am J Physiol.* 273, H1177-1186.
- Hafezi, F., Grimm, C., Wenzel, A., Abegg, M., Yaniv, M. y Reme, C. E., 1999a. Retinal photoreceptors are apoptosis-competent in the absence of JunD/AP-1. *Cell Death Differ.* 6, 934-936.
- Hafezi, F., Marti, A., Grimm, C., Wenzel, A. y Reme, C. E., 1999b. Differential DNA binding activities of the transcription factors AP-1 and Oct-1 during light-induced apoptosis of photoreceptors. *Vision Res.* 39, 2511-2518.
- Hafezi, F., Steinbach, J. P., Marti, A., Munz, K., Wang, Z. Q., Wagner, E. F., Aguzzi, A. y Reme, C. E., 1997. The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat Med.* 3, 346-349.
- Hama, H., Kasuya, Y., Sakurai, T., Yamada, G., Suzuki, N., Masaki, T. y Goto, K., 1997. Role of endothelin-1 in astrocyte responses after acute brain damage. *J Neurosci Res.* 47, 590-602.
- Hao, W., Wenzel, A., Obin, M. S., Chen, C. K., Brill, E., Krasnoperova, N. V., Eversole-Cire, P., Kleyner, Y., Taylor, A., Simon, M. I., Grimm, C., Reme, C. E. y Lem, J., 2002. Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nat Genet.* 32, 254-260.
- Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, K., Ohno, S., Mamada, H., Tanaka, K., Parada, L. F. y Wada, K., 2002. Microglia-Muller glia cell interactions

- control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci.* 22, 9228-9236.
- Harada, T., Harada, C., Nakayama, N., Okuyama, S., Yoshida, K., Kohsaka, S., Matsuda, H. y Wada, K., 2000. Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron.* 26, 533-541.
- Hartz, A. M., Bauer, B., Fricker, G. y Miller, D. S., 2004. Rapid regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier by endothelin-1. *Mol Pharmacol.* 66, 387-394.
- Hasselblatt, M., Bunte, M., Dringen, R., Taberner, A., Medina, J. M., Giaume, C., Siren, A. L. y Ehrenreich, H., 2003. Effect of endothelin-1 on astrocytic protein content. *Glia.* 42, 390-397.
- Hasselblatt, M., Kamrowski-Kruck, H., Jensen, N., Schilling, L., Kratzin, H., Siren, A. L. y Ehrenreich, H., 1998. ETA and ETB receptor antagonists synergistically increase extracellular endothelin-1 levels in primary rat astrocyte cultures. *Brain Res.* 785, 253-261.
- Hasselblatt, M., Lewczuk, P., Loffler, B. M., Kamrowski-Kruck, H., von Ahsen, N., Siren, A. L. y Ehrenreich, H., 2001. Role of the astrocytic ET(B) receptor in the regulation of extracellular endothelin-1 during hypoxia. *Glia.* 34, 18-26.
- Haynes, W. G., Hamer, D. W., Robertson, C. E. y Webb, D. J., 1994. Plasma endothelin following cardiac arrest: differences between survivors and non-survivors. *Resuscitation.* 27, 117-122.
- Haynes, W. G., Moffat, S. y Webb, D. J., 1995. An investigation into the direct and indirect vasoconstrictor effects of endothelin-1 and big endothelin-1 in man. *Br J Clin Pharmacol.* 40, 307-311.
- Hembury, A. y Mabondzo, A., 2008. Endothelin-1 Reduces P-Glycoprotein Transport Activity in an In Vitro Model of Human Adult Blood-brain Barrier. *Cell Mol Neurobiol.*
- Hisatomi, O. y Tokunaga, F., 2002. Molecular evolution of proteins involved in vertebrate phototransduction. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 133, 509-522.
- Humayun, M. S., de Juan, E., Jr., del Cerro, M., Dagnelie, G., Radner, W., Sadda, S. R. y del Cerro, C., 2000. Human neural retinal transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 3100-3106.
- Hunter, T. y Karin, M., 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell.* 70, 375-387.
- Hynynen, M. M. y Khalil, R. A., 2006. The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov.* 1, 95-108.
- Iribarne, M., Canto-Soler, M. V., Torbidoni, V. y Suburo, A. M., 2007. Controlling retinal pigment epithelium injury after experimental detachment of the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48, 1348-1354.
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y. y Kohsaka, S., 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res.* 57, 1-9.
- Ito, D., Tanaka, K., Suzuki, S., Dembo, T. y Fukuuchi, Y., 2001. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke.* 32, 1208-1215.
- Ivanova, E. y Muller, F., 2006. Retinal bipolar cell types differ in their inventory of ion channels. *Vis Neurosci.* 23, 143-154.
- Iwasaki, H., Eguchi, S., Marumo, F. y Hirata, Y., 1998. Endothelin-1 stimulates DNA synthesis of vascular smooth-muscle cells through transactivation of epidermal growth factor receptor. *J Cardiovasc Pharmacol.* 31 Suppl 1, S182-184.
- Jablonski, M. M., Tombran-Tink, J., Mrazek, D. A. y Iannaccone, A., 2000. Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *J Neurosci.* 20, 7149-7157.
- Janzer, R. C. y Raff, M. C., 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature.* 325, 253-257.

- Jiang, M. H., Hoog, A., Ma, K. C., Nie, X. J., Olsson, Y. y Zhang, W. W., 1993. Endothelin-1-like immunoreactivity is expressed in human reactive astrocytes. *Neuroreport*. 4, 935-937.
- Kakita, T., Hasegawa, K., Iwai-Kanai, E., Adachi, S., Morimoto, T., Wada, H., Kawamura, T., Yanazume, T. y Sasayama, S., 2001. Calcineurin pathway is required for endothelin-1-mediated protection against oxidant stress-induced apoptosis in cardiac myocytes. *Circ Res*. 88, 1239-1246.
- Kanzawa, N., Poma, C. P., Takebayashi-Suzuki, K., Diaz, K. G., Layliev, J. y Mikawa, T., 2002. Competency of embryonic cardiomyocytes to undergo Purkinje fiber differentiation is regulated by endothelin receptor expression. *Development*. 129, 3185-3194.
- Karin, M., Liu, Z. y Zandi, E., 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 9, 240-246.
- Kaur, C., Foulds, W. S. y Ling, E. A., 2008. Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: Basic concepts, clinical features and management. *Prog Retin Eye Res*. 27, 622-647.
- Kaur, C. y Ling, E. A., 2008. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Curr Neurovasc Res*. 5, 71-81.
- Kawamura, H., Oku, H., Li, Q., Sakagami, K. y Puro, D. G., 2002. Endothelin-induced changes in the physiology of retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43, 882-888.
- Kim, J. H., Kim, J. H., Park, J. A., Lee, S. W., Kim, W. J., Yu, Y. S. y Kim, K. W., 2006. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol*. 39, 339-345.
- Kim, S. I., Grum-Tokars, V., Swanson, T. A., Cotter, E. J., Cahill, P. A., Roberts, J. L., Cummins, P. M. y Glucksman, M. J., 2003. Novel roles of neuropeptide processing enzymes: EC3.4.24.15 in the neurome. *J Neurosci Res*. 74, 456-467.
- Kis, B., Chen, L., Ueta, Y. y Busija, D. W., 2006. Autocrine peptide mediators of cerebral endothelial cells and their role in the regulation of blood-brain barrier. *Peptides*. 27, 211-222.
- Kohzuki, M., Onodera, H., Yasujima, M., Itoyama, Y., Kanazawa, M., Sato, T. y Abe, K., 1995. Endothelin receptors in ischemic rat brain and Alzheimer brain. *J Cardiovasc Pharmacol*. 26 Suppl 3, S329-331.
- Koizumi, S., Kataoka, Y., Niwa, M., Yamashita, K., Taniyama, K. y Kudo, Y., 1994. Endothelin increased $[Ca^{2+}]_i$ in cultured neurones and slices of rat hippocampus. *Neuroreport*. 5, 1077-1080.
- Koyama, Y., Baba, A. y Matsuda, T., 2005. Endothelins stimulate the expression of neurotrophin-3 in rat brain and rat cultured astrocytes. *Neuroscience*. 136, 425-433.
- Koyama, Y., Tsujikawa, K., Matsuda, T. y Baba, A., 2003a. Endothelin-1 stimulates glial cell line-derived neurotrophic factor expression in cultured rat astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 303, 1101-1105.
- Koyama, Y., Tsujikawa, K., Matsuda, T. y Baba, A., 2003b. Intracerebroventricular administration of an endothelin ETB receptor agonist increases expressions of GDNF and BDNF in rat brain. *Eur J Neurosci*. 18, 887-894.
- Kreutzberg, G. W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 19, 312-318.
- Krishnamoorthy, R. R., Rao, V. R., Dauphin, R., Prasanna, G., Johnson, C. y Yorio, T., 2008. Role of the ETB receptor in retinal ganglion cell death in glaucoma. *Can J Physiol Pharmacol*. 86, 380-393.
- Kueng-Hitz, N., Grimm, C., Linsel, N., Hafezi, F., He, L., Fox, D. A., Reme, C. E., Niemeyer, G. y Wenzel, A., 2000. The retina of *c-fos*^{-/-} mice: electrophysiologic, morphologic and biochemical aspects. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41, 909-916.
- Kuwabara, T. y Gorn, R. A., 1968. Retinal damage by visible light. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol*. 79, 69-78.
- Lahav, R., Suva, M. L., Rimoldi, D., Patterson, P. H. y Stamenkovic, I., 2004. Endothelin receptor B inhibition triggers apoptosis and enhances angiogenesis in melanomas. *Cancer Res*. 64, 8945-8953.

- Lam, H. C., Lee, J. K., Lu, C. C., Chu, C. H., Chuang, M. J. y Wang, M. C., 2003. Role of endothelin in diabetic retinopathy. *Curr Vasc Pharmacol.* 1, 243-250.
- Lau, J., Dang, M., Hockmann, K. y Ball, A. K., 2006. Effects of acute delivery of endothelin-1 on retinal ganglion cell loss in the rat. *Exp Eye Res.* 82, 132-145.
- LaVail, M. M., Gorrin, G. M., Yasumura, D. y Matthes, M. T., 1999. Increased susceptibility to constant light in nr and pcd mice with inherited retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40, 1020-1024.
- LaVail, M. M., Unoki, K., Yasumura, D., Matthes, M. T., Yancopoulos, G. D. y Steinberg, R. H., 1992. Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 11249-11253.
- LaVail, M. M., Yasumura, D., Matthes, M. T., Lau-Villacorta, C., Unoki, K., Sung, C. H. y Steinberg, R. H., 1998. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39, 592-602.
- Lazarini, F., Strosberg, A. D., Couraud, P. O. y Cazaubon, S. M., 1996. Coupling of ETB endothelin receptor to mitogen-activated protein kinase stimulation and DNA synthesis in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurochem.* 66, 459-465.
- Lee, E. S. y Flannery, J. G., 2007. Transport of truncated rhodopsin and its effects on rod function and degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48, 2868-2876.
- Lewis, G. P. y Fisher, S. K., 2003. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol.* 230, 263-290.
- Li, J. S., Lariviere, R. y Schiffrin, E. L., 1994. Effect of a nonselective endothelin antagonist on vascular remodeling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. Evidence for a role of endothelin in vascular hypertrophy. *Hypertension.* 24, 183-188.
- Lin, C. L., Winardi, W., Jeng, A. Y. y Kwan, A. L., 2006. Endothelin-converting enzyme inhibitors for the treatment of subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm. *Neurol Res.* 28, 721-729.
- Liu, C., Li, Y., Peng, M., Laties, A. M. y Wen, R., 1999. Activation of caspase-3 in the retina of transgenic rats with the rhodopsin mutation s334ter during photoreceptor degeneration. *J Neurosci.* 19, 4778-4785.
- Liu, S., Premont, R. T., Kontos, C. D., Huang, J. y Rockey, D. C., 2003. Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt. *J Biol Chem.* 278, 49929-49935.
- Loo, L. S., Ng, Y. K., Zhu, Y. Z., Lee, H. S. y Wong, P. T., 2002. Cortical expression of endothelin receptor subtypes A and B following middle cerebral artery occlusion in rats. *Neuroscience.* 112, 993-1000.
- MacCumber, M. W. y D'Anna, S. A., 1994. Endothelin receptor-binding subtypes in the human retina and choroid. *Arch Ophthalmol.* 112, 1231-1235.
- MacCumber, M. W., Ross, C. A., Glaser, B. M. y Snyder, S. H., 1989. Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 7285-7289.
- MacCumber, M. W., Ross, C. A. y Snyder, S. H., 1990. Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 2359-2363.
- MacLaren, R. E. y Pearson, R. A., 2007. Stem cell therapy and the retina. *Eye.* 21, 1352-1359.
- MacLaren, R. E., Pearson, R. A., MacNeil, A., Douglas, R. H., Salt, T. E., Akimoto, M., Swaroop, A., Sowden, J. C. y Ali, R. R., 2006. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature.* 444, 203-207.
- Maeda, A., Maeda, T., Golczak, M. y Palczewski, K., 2008. Retinopathy in mice induced by disrupted all-trans-retinal clearance. *J Biol Chem.* 283, 26684-26693.
- Marc, R. E., Jones, B. W., Watt, C. B., Vazquez-Chona, F., Vaughan, D. K. y Organisciak, D. T., 2008. Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Mol Vis.* 14, 782-806.

- Marti, A., Hafezi, F., Lansel, N., Hegi, M. E., Wenzel, A., Grimm, C., Niemeyer, G. y Reme, C. E., 1998. Light-induced cell death of retinal photoreceptors in the absence of p53. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39, 846-849.
- Masuda, K. y Watanabe, I., 2000. Short wavelength light-induced retinal damage in rats. *Jpn J Ophthalmol.* 44, 615-619.
- Matsugi, T., Chen, Q. y Anderson, D. R., 1997. Adenosine-induced relaxation of cultured bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 38, 2695-2701.
- May, C. A. y Lutjen-Drecoll, E., 2002. Morphology of the murine optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 2206-2212.
- McCarron, R. M., Chen, Y., Tomori, T., Strasser, A., Mechoulam, R., Shohami, E. y Spatz, M., 2006. Endothelial-mediated regulation of cerebral microcirculation. *J Physiol Pharmacol.* 57 Suppl 11, 133-144.
- Mellstrom, B., Achaval, M., Montero, D., Naranjo, J. R. y Sassone-Corsi, P., 1991. Differential expression of the jun family members in rat brain. *Oncogene.* 6, 1959-1964.
- Miller, R. D., Monsul, N. T., Vender, J. R. y Lehmann, J. C., 1996. NMDA- and endothelin-1-induced increases in blood-brain barrier permeability quantitated with Lucifer yellow. *J Neurol Sci.* 136, 37-40.
- Monje, P., Marinissen, M. J. y Gutkind, J. S., 2003. Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-Fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of AP-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol.* 23, 7030-7043.
- Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L. y Curran, T., 1987. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science.* 237, 192-197.
- Morrow, E. M., Furukawa, T., Lee, J. E. y Cepko, C. L., 1999. NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development.* 126, 23-36.
- Nakagomi, S., Kiryu-Seo, S. y Kiyama, H., 2000. Endothelin-converting enzymes and endothelin receptor B messenger RNAs are expressed in different neural cell species and these messenger RNAs are coordinately induced in neurons and astrocytes respectively following nerve injury. *Neuroscience.* 101, 441-449.
- Nakajima, K., Kikuchi, Y., Ikoma, E., Honda, S., Ishikawa, M., Liu, Y. y Kohsaka, S., 1998. Neurotrophins regulate the function of cultured microglia. *Glia.* 24, 272-289.
- Nakajima, K. y Kohsaka, S., 2001. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biochem.* 130, 169-175.
- Nakazawa, T., Shimura, M., Ryu, M., Nishida, K., Pages, G., Pouyssegur, J. y Endo, S., 2008. ERK1 plays a critical protective role against N-methyl-D-aspartate-induced retinal injury. *J Neurosci Res.* 86, 136-144.
- Narayan, S., Brun, A. M. y Yorio, T., 2004. Endothelin-1 distribution and basolateral secretion in the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res.* 79, 11-19.
- Narayan, S., Prasanna, G., Krishnamoorthy, R. R., Zhang, X. y Yorio, T., 2003. Endothelin-1 synthesis and secretion in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19): differential regulation by cholinergics and TNF-alpha. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44, 4885-4894.
- Newman, E. y Reichenbach, A., 1996. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* 19, 307-312.
- Newman, E. A. y Zahs, K. R., 1997. Calcium waves in retinal glial cells. *Science.* 275, 844-847.
- Nie, X. J. y Olsson, Y., 1996. Endothelin peptides in brain diseases. *Rev Neurosci.* 7, 177-186.
- Noell, W. K., Walker, V. S., Kang, B. S. y Berman, S., 1966. Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol.* 5, 450-473.
- Ogata, Y., Takahashi, M., Ueno, S., Takeuchi, K., Okada, T., Mano, H., Ookawara, S., Ozawa, K., Berk, B. C., Ikeda, U., Shimada, K. y Kobayashi, E., 2003. Antiapoptotic effect of endothelin-1 in rat cardiomyocytes in vitro. *Hypertension.* 41, 1156-1163.

- Oku, H., Sugiyama, T., Kojima, S., Watanabe, T. y Azuma, I., 1999. Experimental optic cup enlargement caused by endothelin-1-induced chronic optic nerve head ischemia. *Surv Ophthalmol.* 44 Suppl 1, S74-84.
- Omura, T., Kaneko, M., Okuma, Y., Orba, Y., Nagashima, K., Takahashi, R., Fujitani, N., Matsumura, S., Hata, A., Kubota, K., Murahashi, K., Uehara, T. y Nomura, Y., 2006. A ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael receptor, a substrate of Parkin. *J Neurochem.* 99, 1456-1469.
- Organisciak, D. T., Darrow, R. A., Barsalou, L., Darrow, R. M. y Lininger, L. A., 1999. Light-induced damage in the retina: differential effects of dimethylthiourea on photoreceptor survival, apoptosis and DNA oxidation. *Photochem Photobiol.* 70, 261-268.
- Organisciak, D. T., Darrow, R. M., Barsalou, L., Darrow, R. A., Kutty, R. K., Kutty, G. y Wiggert, B., 1998. Light history and age-related changes in retinal light damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39, 1107-1116.
- Organisciak, D. T., Jiang, Y. L., Wang, H. M. y Bicknell, I., 1990. The protective effect of ascorbic acid in retinal light damage of rats exposed to intermittent light. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 31, 1195-1202.
- Organisciak, D. T., Jiang, Y. L., Wang, H. M., Pickford, M. y Blanks, J. C., 1989. Retinal light damage in rats exposed to intermittent light. Comparison with continuous light exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 30, 795-805.
- Organisciak, D. T., Wang, H. M. y Noell, W. K., 1987. Aspects of the ascorbate protective mechanism in retinal light damage of rats with normal and reduced ROS docosahexaenoic acid. *Prog Clin Biol Res.* 247, 455-468.
- Ostrow, L. W. y Sachs, F., 2005. Mechanosensation and endothelin in astrocytes--hypothetical roles in CNS pathophysiology. *Brain Res Brain Res Rev.* 48, 488-508.
- Paasche, J. D., Attramadal, T., Sandberg, C., Johansen, H. K. y Attramadal, H., 2001. Mechanisms of endothelin receptor subtype-specific targeting to distinct intracellular trafficking pathways. *J Biol Chem.* 276, 34041-34050.
- Pacione, L. R., Szego, M. J., Ikeda, S., Nishina, P. M. y McInnes, R. R., 2003. Progress toward understanding the genetic and biochemical mechanisms of inherited photoreceptor degenerations. *Annu Rev Neurosci.* 26, 657-700.
- Palamalai, V., Darrow, R. M., Organisciak, D. T. y Miyagi, M., 2006. Light-induced changes in protein nitration in photoreceptor rod outer segments. *Mol Vis.* 12, 1543-1551.
- Palanisamy, G. S., Cheon, Y. P., Kim, J., Kannan, A., Li, Q., Sato, M., Mantena, S. R., Sitruk-Ware, R. L., Bagchi, M. K. y Bagchi, I. C., 2006. A novel pathway involving progesterone receptor, endothelin-2, and endothelin receptor B controls ovulation in mice. *Mol Endocrinol.* 20, 2784-2795.
- Paolillo, M., Barbieri, A., Zanassi, P. y Schinelli, S., 2006. Expression of endothelins and their receptors in glioblastoma cell lines. *J Neurooncol.* 79, 1-7.
- Park, M. H. y Lee, D. H., 2008. Endothelin 1 protects HN33 cells from serum deprivation-induced neuronal apoptosis through Ca(2+)-PKCalpha-ERK pathway. *Exp Mol Med.* 40, 92-97.
- Pedram, A., Razandi, M., Hu, R. M. y Levin, E. R., 1998. Astrocyte progression from G1 to S phase of the cell cycle depends upon multiple protein interaction. *J Biol Chem.* 273, 13966-13972.
- Peichl, L., 2005. Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat and lifestyle? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 287, 1001-1012.
- Pekny, M. y Pekna, M., 2004. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol.* 204, 428-437.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., Bogestal, Y. R. y Pekna, M., 2007. The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *Int Rev Neurobiol.* 82, 95-111.
- Perche, O., Doly, M. y Ranchon-Cole, I., 2007. Caspase-dependent apoptosis in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48, 2753-2759.
- Petrov, T., Steiner, J., Braun, B. y Rafols, J. A., 2002. Sources of endothelin-1 in hippocampus and cortex following traumatic brain injury. *Neuroscience.* 115, 275-283.

- Pla, P. y Larue, L., 2003. Involvement of endothelin receptors in normal and pathological development of neural crest cells. *Int J Dev Biol.* 47, 315-325.
- Polak, K., Luksch, A., Frank, B., Jandrasits, K., Polska, E. y Schmetterer, L., 2003. Regulation of human retinal blood flow by endothelin-1. *Exp Eye Res.* 76, 633-640.
- Polak, K., Petternel, V., Luksch, A., Krohn, J., Findl, O., Polska, E. y Schmetterer, L., 2001. Effect of endothelin and BQ123 on ocular blood flow parameters in healthy subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42, 2949-2956.
- Politi, L. E., Rotstein, N. P. y Carri, N. G., 2001. Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: additive protection with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42, 3008-3015.
- Portal, M. M., Ferrero, G. O. y Caputto, B. L., 2007. N-Terminal c-Fos tyrosine phosphorylation regulates c-Fos/ER association and c-Fos-dependent phospholipid synthesis activation. *Oncogene.* 26, 3551-3558.
- Portera-Cailliau, C., Sung, C. H., Nathans, J. y Adler, R., 1994. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 974-978.
- Prasanna, G., Hulet, C., Desai, D., Krishnamoorthy, R. R., Narayan, S., Brun, A.-M., Suburo, A. M. y Yorio, T., 2005. Effect of elevated intraocular pressure on endothelin-1 in a rat model of glaucoma. *Pharmacol Res.* 51, 41-50.
- Prasanna, G., Krishnamoorthy, R., Clark, A. F., Wordinger, R. J. y Yorio, T., 2002a. Human optic nerve head astrocytes as a target for endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 2704-2713.
- Prasanna, G., Krishnamoorthy, R., Clark, A. F., Wordinger, R. J. y Yorio, T., 2002b. Human optic nerve head astrocytes as a target for endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 2704-2713.
- Quesada, A., Prada, F. A., Aguilera, Y., Espinar, A., Carmona, A. y Prada, C., 2004. Peripapillary glial cells in the chick retina: A special glial cell type expressing astrocyte, radial glia, neuron, and oligodendrocyte markers throughout development. *Glia.* 46, 346-355.
- Radu, R. A., Yuan, Q., Hu, J., Peng, J. H., Lloyd, M., Nusinowitz, S., Bok, D. y Travis, G. H., 2008. Accelerated accumulation of lipofuscin pigments in the RPE of a mouse model for ABCA4-mediated retinal dystrophies following Vitamin A supplementation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, 3821-3829.
- Rapp, L. M., Fisher, P. L. y Dhindsa, H. S., 1994. Reduced rate of rod outer segment disk synthesis in photoreceptor cells recovering from UVA light damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35, 3540-3548.
- Rattner, A. y Nathans, J., 2005. The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia. *J Neurosci.* 25, 4540-4549.
- Reme, C. E., 2005. The dark side of light: rhodopsin and the silent death of vision the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46, 2671-2682.
- Reme, C. E., Grimm, C., Hafezi, F., Wenzel, A. y Williams, T. P., 2000. Apoptosis in the Retina: The Silent Death of Vision. *News Physiol Sci.* 15, 120-124.
- Reme, C. E. y Terman, M., 1992. Does light therapy present an ocular hazard? *Am J Psychiatry.* 149, 1762-1763.
- Renteria, R. C., Tian, N., Cang, J., Nakanishi, S., Stryker, M. P. y Copenhagen, D. R., 2006. Intrinsic ON responses of the retinal OFF pathway are suppressed by the ON pathway. *J Neurosci.* 26, 11857-11869.
- Rhinn, H., Marchand-Leroux, C., Croci, N., Plotkine, M., Scherman, D. y Escriou, V., 2008. Housekeeping while brain's storming Validation of normalizing factors for gene expression studies in a murine model of traumatic brain injury. *BMC Mol Biol.* 9, 62.
- Rodieck, R. W., 1979. Visual pathways. *Annu Rev Neurosci.* 2, 193-225.
- Roduit, R. y Schorderet, D. F., 2008. MAP kinase pathways in UV-induced apoptosis of retinal pigment epithelium ARPE19 cells. *Apoptosis.* 13, 343-353.
- Rogers, S. D., Demaster, E., Catton, M., Ghilardi, J. R., Levin, L. A., Maggio, J. E. y Mantyh, P. W., 1997. Expression of endothelin-B receptors by glia in vivo is

- increased after CNS injury in rats, rabbits, and humans. *Exp Neurol.* 145, 180-195.
- Rogers, S. D., Peters, C. M., Pomonis, J. D., Hagiwara, H., Ghilardi, J. R. y Mantyh, P. W., 2003. Endothelin B receptors are expressed by astrocytes and regulate astrocyte hypertrophy in the normal and injured CNS. *Glia.* 41, 180-190.
- Roque, R. S., Imperial, C. J. y Caldwell, R. B., 1996. Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37, 196-203.
- Rosano, L., Di Castro, V., Spinella, F., Nicotra, M. R., Natali, P. G. y Bagnato, A., 2007. ZD4054, a specific antagonist of the endothelin A receptor, inhibits tumor growth and enhances paclitaxel activity in human ovarian carcinoma in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.* 6, 2003-2011.
- Rosano, L., Spinella, F., Di Castro, V., Decandia, S., Nicotra, M. R., Natali, P. G. y Bagnato, A., 2006. Endothelin-1 is required during epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer progression. *Exp Biol Med (Maywood).* 231, 1128-1131.
- Rosenberg, E. A. y Sperazza, L. C., 2008. The visually impaired patient. *Am Fam Physician.* 77, 1431-1436.
- Sabbatini, M., Strocchi, P., Vitaioli, L. y Amenta, F., 2001. Changes of retinal neurons and glial fibrillary acid protein immunoreactive astrocytes in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 19, 1861-1869.
- Sarthy, A. V., McGonigal, T., Capobianco, J. O., Schmidt, M., Green, S. R., Moehle, C. M. y Goldman, R. C., 1998. Identification and kinetic analysis of a functional homolog of elongation factor 3, YEF3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 14, 239-253.
- Sasaki, Y., Takimoto, M., Oda, K., Fruh, T., Takai, M., Okada, T. y Hori, S., 1997. Endothelin evokes efflux of glutamate in cultures of rat astrocytes. *J Neurochem.* 68, 2194-2200.
- Sato, K., Ishikawa, K., Ui, M. y Okajima, F., 1999. Sphingosine 1-phosphate induces expression of early growth response-1 and fibroblast growth factor-2 through mechanism involving extracellular signal-regulated kinase in astroglial cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 74, 182-189.
- Schiffrin, E. L., 2001. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 38 Suppl 2, S3-6.
- Schiffrin, E. L. y Touyz, R. M., 1998. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 32 Suppl 3, S2-13.
- Schinelli, S., 2006. Pharmacology and physiopathology of the brain endothelin system: an overview. *Curr Med Chem.* 13, 627-638.
- Schinelli, S., Zanassi, P., Paolillo, M., Wang, H., Feliciello, A. y Gallo, V., 2001a. Stimulation of endothelin B receptors in astrocytes induces cAMP response element-binding protein phosphorylation and c-fos expression via multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Neurosci.* 21, 8842-8853.
- Schinelli, S., Zanassi, P., Paolillo, M., Wang, H., Feliciello, A. y Gallo, V., 2001b. Stimulation of endothelin B receptors in astrocytes induces cAMP response element-binding protein phosphorylation and c-fos expression via multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Neurosci.* 21, 8842-8853.
- Shaulian, E. y Karin, M., 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 20, 2390-2400.
- Shepro, D. y Morel, N. M., 1993. Pericyte physiology. *Faseb J.* 7, 1031-1038.
- Shichiri, M., Kato, H., Marumo, F. y Hirata, Y., 1997. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension.* 30, 1198-1203.
- Shihara, M., Hirooka, Y., Hori, N., Matsuo, I., Tagawa, T., Suzuki, S., Akaike, N. y Takeshita, A., 1998. Endothelin-1 increases the neuronal activity and augments the responses to glutamate in the NTS. *Am J Physiol.* 275, R658-665.
- Siffroi-Fernandez, S., Felder-Schmittbuhl, M. P., Khanna, H., Swaroop, A. y Hicks, D., 2008. FGF19 exhibits neuroprotective effects on adult mammalian photoreceptors in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, 1696-1704.

- Silva, K. C., Pinto, C. C., Biswas, S. K., de Faria, J. B. y de Faria, J. M., 2007. Hypertension increases retinal inflammation in experimental diabetes: a possible mechanism for aggravation of diabetic retinopathy by hypertension. *Curr Eye Res.* 32, 533-541.
- Sims, D. E., 1991. Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease. *Can J Cardiol.* 7, 431-443.
- Siren, A. L., Lewczuk, P., Hasselblatt, M., Dembowski, C., Schilling, L. y Ehrenreich, H., 2002. Endothelin B receptor deficiency augments neuronal damage upon exposure to hypoxia-ischemia in vivo. *Brain Res.* 945, 144-149.
- Sofroniew, M. V., 2005. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 11, 400-407.
- Sokolovsky, M., 1992. Structure-function relationships of endothelins, sarafotoxins, and their receptor subtypes. *J Neurochem.* 59, 809-821.
- Sperduto, R. D., Hiller, R. y Seigel, D., 1981. Lens opacities and senile maculopathy. *Arch Ophthalmol.* 99, 1004-1008.
- Steiner, J., Rafols, D., Park, H. K., Katar, M. S., Rafols, J. A. y Petrov, T., 2004. Attenuation of iNOS mRNA exacerbates hypoperfusion and upregulates endothelin-1 expression in hippocampus and cortex after brain trauma. *Nitric Oxide.* 10, 162-169.
- Steuer, H., Jaworski, A., Elger, B., Kaussmann, M., Keldenich, J., Schneider, H., Stoll, D. y Schlosshauer, B., 2005. Functional characterization and comparison of the outer blood-retina barrier and the blood-brain barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46, 1047-1053.
- Stokely, M. E., Brady, S. T. y Yorio, T., 2002. Effects of endothelin-1 on components of anterograde axonal transport in optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 3223-3230.
- Strettoi, E., Dacheux, R. F. y Raviola, E., 1994. Cone bipolar cells as interneurons in the rod pathway of the rabbit retina. *J Comp Neurol.* 347, 139-149.
- Suburo, A. M., Gibson, S. J., Moscoso, G., Terenghi, G. y Polak, J. M., 1992. Transient expression of neuropeptide Y and its C-flanking peptide immunoreactivities in the spinal cord and ganglia of human embryos and fetuses. *Neuroscience.* 46, 571-584.
- Swiderski, R. E., Nishimura, D. Y., Mullins, R. F., Olvera, M. A., Ross, J. L., Huang, J., Stone, E. M. y Sheffield, V. C., 2007. Gene expression analysis of photoreceptor cell loss in bbs4-knockout mice reveals an early stress gene response and photoreceptor cell damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48, 3329-3340.
- Szikra, T., Cusato, K., Thoreson, W. B., Barabas, P., Bartoletti, T. M. y Krizaj, D., 2008. Depletion of calcium stores regulates calcium influx and signal transmission in rod photoreceptors. *J Physiol.* 586, 4859-4875.
- Thanos, S., 1992. Sick photoreceptors attract activated microglia from the ganglion cell layer: a model to study the inflammatory cascades in rats with inherited retinal dystrophy. *Brain Res.* 588, 21-28.
- Thomas, B. B., Seiler, M. J., Aramant, R. B., Samant, D., Qiu, G., Vyas, N., Arai, S., Chen, Z. y Sadda, S. R., 2007. Visual functional effects of constant blue light in a retinal degenerate rat model. *Photochem Photobiol.* 83, 759-765.
- Torbidoni, V., Iribarne, M., Ogawa, L., Prasanna, G. y Suburo, A. M., 2005. Endothelin-1 and its receptors in light-induced retinal degeneration. *Exp Eye Res.* 81, 265-275.
- Torbidoni, V., Iribarne, M. y Suburo, A. M., 2006. Endothelin receptors in light-induced retinal degeneration. *Exp Biol Med (Maywood).* 231, 1095-1100.
- Trumpler, J., Dedek, K., Schubert, T., de Sevilla Muller, L. P., Seeliger, M., Humphries, P., Biel, M. y Weiler, R., 2008. Rod and cone contributions to horizontal cell light responses in the mouse retina. *J Neurosci.* 28, 6818-6825.
- Tsukamoto, Y., Morigiwa, K., Ueda, M. y Sterling, P., 2001. Microcircuits for night vision in mouse retina. *J Neurosci.* 21, 8616-8623.
- Uchida, T., Masuda, H., Mitsui, Y. y Saida, K., 1999. Gene expression of vasoactive intestinal contractor/endothelin-2 in ovary, uterus and embryo: comprehensive gene expression profiles of the endothelin ligand-receptor system revealed by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis in

- adult mouse tissues and during late embryonic development. *J Mol Endocrinol.* 22, 161-171.
- Vaughan, D. K., Coulibaly, S. F., Darrow, R. M. y Organisciak, D. T., 2003. A morphometric study of light-induced damage in transgenic rat models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44, 848-855.
- Vidovic, M., Chen, M. M., Lu, Q. Y., Kalloniatis, K. F., Martin, B. M., Tan, A. H., Lynch, C., Croaker, G. D., Cass, D. T. y Song, Z. M., 2008. Deficiency in endothelin receptor B reduces proliferation of neuronal progenitors and increases apoptosis in postnatal rat cerebellum. *Cell Mol Neurobiol.* 28, 1129-1138.
- Wagner, O. F., Christ, G., Wojta, J., Vierhapper, H., Parzer, S., Nowotny, P. J., Schneider, B., Waldhausl, W. y Binder, B. R., 1992. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 267, 16066-16068.
- Wahlin, K. J., Campochiaro, P. A., Zack, D. J. y Adler, R., 2000. Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 927-936.
- Wang, L., Cioffi, G. A., Cull, G., Dong, J. y Fortune, B., 2002. Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43, 1088-1094.
- Wang, S., Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M. y Lund, R. D., 2000. Progressive optic axon dystrophy and vascular changes in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41, 537-545.
- Wang, X., Baldrige, W. H. y Chauhan, B. C., 2008. Acute endothelin-1 application induces reversible fast axonal transport blockade in adult rat optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, 961-967.
- Wang, X., Hu, S. X., Li, W. y Lin, S. C., 2007. Role of Caspase-3 in acute light damage to retina of rats. *Chin Med Sci J.* 22, 44-48.
- Wassle, H., 2004. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci.* 5, 747-757.
- Wenzel, A., Grimm, C., Marti, A., Kueng-Hitz, N., Hafezi, F., Niemeyer, G. y Reme, C. E., 2000. c-fos controls the "private pathway" of light-induced apoptosis of retinal photoreceptors. *J Neurosci.* 20, 81-88.
- Wenzel, A., Grimm, C., Samardzija, M. y Reme, C. E., 2005. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 24, 275-306.
- Wenzel, A., Grimm, C., Seeliger, M. W., Jaissle, G., Hafezi, F., Kretschmer, R., Zrenner, E. y Reme, C. E., 2001. Prevention of photoreceptor apoptosis by activation of the glucocorticoid receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42, 1653-1659.
- Werblin, F., 1991. Synaptic connections, receptive fields, and patterns of activity in the tiger salamander retina. A simulation of patterns of activity formed at each cellular level from photoreceptors to ganglion cells [the Friedenwald lecture]. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32, 459-483.
- Werblin, F. S. y Dowling, J. E., 1969. Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *J Neurophysiol.* 32, 339-355.
- Wexler, E. M., Berkovich, O. y Nawy, S., 1998. Role of the low-affinity NGF receptor (p75) in survival of retinal bipolar cells. *Vis Neurosci.* 15, 211-218.
- Wilhelmsson, U., Li, L., Pekna, M., Berthold, C. H., Blom, S., Eliasson, C., Renner, O., Bushong, E., Ellisman, M., Morgan, T. E. y Pekny, M., 2004. Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci.* 24, 5016-5021.
- Williams, R. A., Howard, A. G. y Williams, T. P., 1985. Retinal damage in pigmented and albino rats exposed to low levels of cyclic light following a single mydriatic treatment. *Curr Eye Res.* 4, 97-102.
- Williams, T. P., Henrich, S. y Reiser, M., 1998. Effect of eye closures and openings on photostasis in albino rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39, 603-609.
- Winkler, B. S., 2008. An hypothesis to account for the renewal of outer segments in rod and cone photoreceptor cells: renewal as a surrogate antioxidant. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49, 3259-3261.

- Winkler, B. S., Boulton, M. E., Gottsch, J. D. y Sternberg, P., 1999. Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 5, 32.
- Wu, J., Seregard, S. y Algvare, P. V., 2006a. Photochemical damage of the retina. *Surv Ophthalmol.* 51, 461-481.
- Wu, K. H., Madigan, M. C., Billson, F. A. y Penfold, P. L., 2003a. Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis. *Br J Ophthalmol.* 87, 1159-1166.
- Wu, K. H., Madigan, M. C., Billson, F. A. y Penfold, P. L., 2003b. Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis. *Br J Ophthalmol.* 87, 1159-1166.
- Wu, K. Y., Hong, S. J., Fong, J. C. y Wang, H. Z., 2003c. Differential effects of endothelin-1 on calcium mobility in cultured porcine pigment epithelial cells of iris and retina. *J Formos Med Assoc.* 102, 465-473.
- Wu, X., Zhang, T., Bossuyt, J., Li, X., McKinsey, T. A., Dedman, J. R., Olson, E. N., Chen, J., Brown, J. H. y Bers, D. M., 2006b. Local InsP3-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest.* 116, 675-682.
- Xue, L. y Lucocq, J. M., 1997. Low extracellular pH induces activation of ERK 2, JNK, and p38 in A431 and Swiss 3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 241, 236-242.
- Yagami, T., Ueda, K., Asakura, K., Kuroda, T., Hata, S., Sakaeda, T., Kambayashi, Y. y Fujimoto, M., 2002. Effects of endothelin B receptor agonists on amyloid beta protein (25-35)-induced neuronal cell death. *Brain Res.* 948, 72-81.
- Yagami, T., Ueda, K., Sakaeda, T., Okamura, N., Nakazato, H., Kuroda, T., Hata, S., Sakaguchi, G., Itoh, N., Hashimoto, Y. y Fujimoto, M., 2005. Effects of an endothelin B receptor agonist on secretory phospholipase A2-IIA-induced apoptosis in cortical neurons. *Neuropharmacology.* 48, 291-300.
- Yamagishi, S., Hsu, C. C., Kobayashi, K. y Yamamoto, H., 1993. Endothelin 1 mediates endothelial cell-dependent proliferation of vascular pericytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 191, 840-846.
- Yanagisawa, M., Inoue, A., Ishikawa, T., Kasuya, Y., Kimura, S., Kumagaye, S., Nakajima, K., Watanabe, T. X., Sakakibara, S., Goto, K. y et al., 1988a. Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 6964-6967.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Goto, K. y Masaki, T., 1988b. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl.* 6, S188-191.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Goto, K. y Masaki, T., 1988c. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. *J Hypertens Suppl.* 6, S188-191.
- Yanagisawa, M. y Masaki, T., 1989. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci.* 10, 374-378.
- Yogi, A., Callera, G. E., Montezano, A. C., Aranha, A. B., Tostes, R. C., Schiffrin, E. L. y Touyz, R. M., 2007. Endothelin-1, but not Ang II, activates MAP kinases through c-Src independent Ras-Raf dependent pathways in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27, 1960-1967.
- Yorio, T., Krishnamoorthy, R. y Prasanna, G., 2002. Endothelin: is it a contributor to glaucoma pathophysiology? *J Glaucoma.* 11, 259-270.
- Yoshizawa, K., Kiuchi, K., Nambu, H., Yang, J., Senzaki, H., Kiyozuka, Y., Shikata, N. y Tsubura, A., 2002. Caspase-3 inhibitor transiently delays inherited retinal degeneration in C3H mice carrying the rd gene. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 240, 214-219.
- Zack, D. J., 2000. Neurotrophic rescue of photoreceptors: are Muller cells the mediators of survival? *Neuron.* 26, 285-286.
- Zhang, R. L., Zhang, C., Zhang, L., Roberts, C., Lu, M., Kapke, A., Cui, Y., Ninomiya, M., Nagafuji, T., Albalá, B., Zhang, Z. G. y Chopp, M., 2008. Synergistic effect of an endothelin type A receptor antagonist, S-0139, with rtPA on the neuroprotection after embolic stroke. *Stroke.* 39, 2830-2836.

Zhang, W. W., Badonic, T., Hoog, A., Jiang, M. H., Ma, K. C., Nie, X. J. y Olsson, Y., 1994. Astrocytes in Alzheimer's disease express immunoreactivity to the vasoconstrictor endothelin-1. *J Neurol Sci.* 122, 90-96.