



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

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

Trabajo de Fin de Grado por:
Jorge González Zamora

Tutorizado por:
Javier García Sancho / M.^a Teresa Alonso Alonso / Jonathan Rojo Ruiz



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

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

Trabajo de Fin de Grado por:
Jorge González Zamora

Tutorizado por:
Javier García Sancho / M.^a Teresa Alonso Alonso / Jonathan Rojo Ruiz

PREFACIO Y AGRADECIMIENTOS

Ser alumno de Medicina e interesado en la participación activa en la investigación es, desgraciadamente, una situación muy poco habitual; de los muchos compañeros que tengo, en esta y otras Facultades de Medicina, un porcentaje extraordinariamente ínfimo tiene inquietudes investigadoras. Algunos de nosotros empezamos la carrera con este interés, especialmente en los primeros años, pero poco a poco, según progresa nuestra formación, ese interés se ve nublado por la ingente presencia de la actividad clínica. Yo tuve la suerte de empezar a introducirme en los laboratorios, curioso, antes de que esto pasara, gracias al buen acogimiento que el campo ofrece a la casi inexistente figura del Médico-Investigador. Desde entonces, he puesto el mismo esfuerzo e ilusión en mi formación como clínico que en mi formación como investigador.

Personalmente me gustaría destacar algunas personas que merecen mi agradecimiento. En primer y destacado lugar, a la Dra. Ana Sánchez García por ser la primera persona que me impulsó a luchar por el perfil dual Médico-Investigador y cada verano me ha ayudado a ser acogido en algunos de los mejores centros de investigación, con fantásticos tutores, a muchos de los cuales ahora considero amigos. Felicitar a Diego Sánchez Romero y Lola Ganfornina Álvarez, con quienes realicé mi primera colaboración empleando moscas *Drosophila*, por la ilusión que transmiten y el buen recibimiento que dan a los alumnos con interés. Agradecer también al Dr. Javier García Sancho y a la Dra. M^a Teresa Alonso Alonso que a partir de mi segundo curso del Grado en Medicina me recibieran en su laboratorio y pusieran en mí su confianza, los conocimientos y los medios para poder aprender a desenvolverme en un laboratorio, a razonar científicamente y poder encargarme de mis propios experimentos. Y sin duda, mis agradecimientos al Dr. Jonathan Rojo Ruiz, quien ha sido la persona más presente en mi día a día de laboratorio, como tutor y mentor.

Gracias a esta formación y mi creciente interés en la oftalmología, finalmente me atreví a dar un paso más y proponer el inicio y diseño de un nuevo proyecto que llevar a cabo en su laboratorio, con la ayuda de mi compañera Sara Álvarez Sánchez, que a día de hoy se ve reflejado en este TFG y con suerte, en futuras publicaciones.

Finalmente destacar a las personas que han participado o colaborado en realización de este trabajo:

- Dña. Sara Álvarez Sánchez: Compañera del G. en Medicina con quien he realizado los experimentos en el laboratorio.
- Dr. Javier García Sancho y Dra. M^a Teresa Alonso-Alonso: Tutores del TFG supervisando todo el trabajo.
- Dr. Jonathan Rojo Ruiz: Co-tutor, supervisor de los experimentos y su análisis, así como corrector en la realización de esta memoria.
- Dña. Miriam Daniela García Cubillas: Técnico de Laboratorio ayudando a la obtención del clon estable ARPE-19/erGAP3 y al cuidado de los cultivos celulares.
- Dr. Girish Kumar Srivastava y Dr. Iván Fernández Bueno: Por la cesión de la línea celular ARPE-19 desde el Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IBGM).

RESUMEN

Hasta el más simple órgano de la visión se compone de al menos dos tipos celulares: los fotorreceptores y las células pigmentadas, demostrando la vital importancia de su interacción. En vertebrados, el epitelio pigmentario de la retina (EPR) se localiza entre los segmentos externos de los fotorreceptores y los capilares de la coroides y desde esta posición estratégica realiza una gran variedad de funciones: absorbe luz, actúa de barrera hemato-retiniana, secreta numerosos factores, recicla el foto-pigmento de los fotorreceptores y fagocita sus segmentos externos entre otras muchas funciones. El Ca^{2+} es un señalizador intracelular ubicuo responsable del control de un extraordinario número de procesos celulares y el EPR no es una excepción, en él se han descrito multitud de procesos en los que está implicado una señal de calcio, incluyendo ondas de Ca^{2+} intercelulares (OCI) que se extienden radialmente desde el foco en que se originan. En EPR y otros tipos celulares que presentan OCI se hace referencia al incremento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ desde los depósitos intracelulares, cuyo principal exponente es el retículo endoplasmático (RE), sin embargo mediciones directas de la concentración de Ca^{2+} reticular $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ no habían sido realizadas debido a la dificultad para medir precisamente la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$. En el presente trabajo usamos el nuevo sensor de calcio recientemente descrito por nuestro grupo, GAP3, en la línea celular de EPR humano ARPE-19 para profundizar en los mecanismos y realizar las primeras mediciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ durante la OCI. De los resultados se confirma la existencia de una OCI desencadenada por estímulo mecánico en la línea ARPE-19, de extensión limitada a unas 7 capas celulares. El ATP difunde extracelularmente, a partir de la célula estimulada, y es la principal molécula implicada en la propagación de la OCI descartándose una contribución significativa de las gap junctions en el origen y/o extensión de la OCI. Por otro lado, se demuestra que la OCI es independiente del $[\text{Ca}^{2+}]$ extracelular, siendo originada por liberación de calcio desde el RE. Realizamos las primeras medidas directas de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ durante la OCI. Destaca un vaciamiento del RE más dilatado en el tiempo que el pico citosólico abriendo la posibilidad a nuevos efectos de la OCI en la fisiología celular y la fisiopatología oftalmológica.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
Cultivo celular.....	4
Creación del clon estable	4
Mediciones de calcio	5
Estimulación mecánica.....	6
Análisis de los datos	6
Inmunofluorescencia.....	7
RESULTADOS	8
Clon estable de ARPE-19 expresando el sensor GAP3 en RE	8
Efecto del ATP extracelular sobre el calcio citosólico y reticular.....	9
Onda de calcio intercelular por estímulo mecánico.....	10
Origen y efecto del Ca^{2+} citoplasmático en la OCI.....	12
Propagación de la OCI por contigüidad de célula a célula	13
Propagación paracrina de la OCI: ATP.....	14
$[Ca^{2+}]_{RE}$ durante la OCI en las diferentes condiciones	15
DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIÓN.....	19
BIBLIOGRAFÍA.....	20
ANEXOS.....	23

INTRODUCCIÓN

La capacidad para percibir luz es una de las adaptaciones más frecuentes entre los seres vivos. Su desarrollo a lo largo de la evolución ha dado lugar a una enorme variedad de órganos destinados a la visión, pero sin embargo en todos ellos existe una constante; hasta el más simple se compone al menos de dos tipos celulares: los fotorreceptores y las células pigmentadas. Ambos tipos celulares aparecen en cada ojo del reino animal, desde insectos y moluscos hasta los vertebrados superiores (1). Este hecho demuestra la vital importancia de la interacción entre el epitelio pigmentado y los fotorreceptores sin la cual no puede desarrollarse la función visual (2–5).

En el ojo de los vertebrados, el epitelio pigmentario de la retina (EPR) se localiza entre los segmentos externos de los fotorreceptores y los capilares de la coroides (Fig.1) y desde esta posición estratégica realiza una gran variedad de funciones. Absorbe la luz y evita que se refleje gracias a los gránulos de melanina que dan nombre a este epitelio (6). Actúa de barrera hemato-retiniana al formar un epitelio con uniones estrechas que regula el transporte activo y pasivo de agua, iones y productos metabólicos entre el torrente sistémico, la coroides, y la retina (2,6,7). Durante el ciclo visual los fotorreceptores generan cambios muy drásticos en la concentración de iones del espacio subretiniano, principalmente de potasio, y el EPR se encarga de amortiguar estas variaciones (8). La visión comienza con la absorción de un fotón en los fotorreceptores por el 11-cis-retinal (9), como resultado se produce un cambio conformacional a todo-trans-retinal y para que un nuevo fotón pueda ser detectado se requiere la re-isomerización a 11-cis-retinal, proceso que tiene lugar en el EPR (10). Los segmentos externos de los fotorreceptores están sometidos durante la visión a un constante e intenso daño foto-oxidativo que los daña y para mantener la visión el EPR, durante las primeras horas diurnas, fagocita los extremos de los segmentos externos permitiendo que se renueven (12–15). El EPR tiene un papel central en mantener la homeostasis de la retina y para ello interacciona liberando una gran variedad de factores y moléculas de señalización: ATP, Fas-L, FGF, TGF- β , IGF-1, PDGF, VEGF y PEDF entre otros muchos (5). La función de barrera del EPR confiere al ojo el ser un órgano inmuno privilegiado, lo que se ve reforzado por el silenciamiento de la respuesta inmune conseguido mediante la secreción de factores inmuno moduladores (16–18).

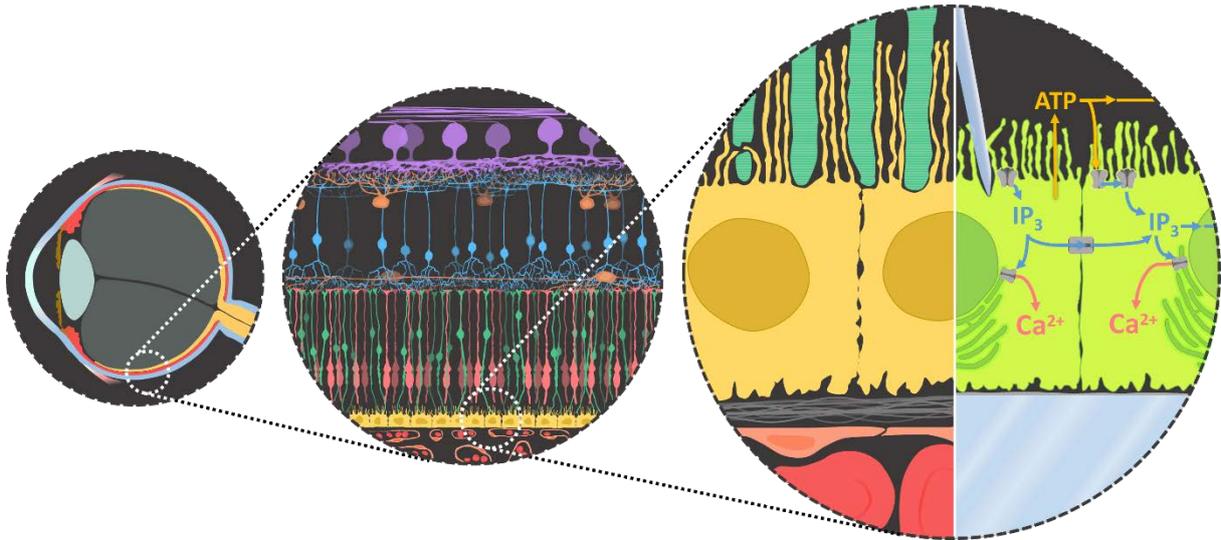


FIGURA 1. La primera imagen muestra un corte sagital medio del ojo humano donde se pueden apreciar las principales capas del polo posterior del ojo: retina (amarillo), coroides (rojo) y esclera (azul). La segunda imagen magnífica la arquitectura de la retina. Se aprecia como el EPR (amarillo) interacciona superiormente con los segmentos externos de los fotorreceptores conos (rojo) y bastones (verde), y los separa de la capa vascular, la coroides. La tercera imagen, en su primera mitad, amplía a mayor aumento la relación fisiológica anteriormente descrita y la compara en su segunda mitad con las condiciones experimentales empleadas: la línea celular ARPE-19, cultivada sobre cubreobjetos de cristal, es transfectada y expresa el sensor GAP3 en su RE emitiendo fluorescencia en el espectro verde-azul. La teoría propuesta para explicar la génesis de ondas de calcio intercelulares tras estimulación mecánica se representa esquemáticamente.

El ion calcio (Ca^{2+}) es un señalizador intracelular ubicuo responsable del control de un extraordinario número de procesos celulares (19,20) y el EPR no es una excepción, en él multitud de los procesos descritos se han relacionado con una señal de calcio: regulación hídrica del transporte transmembrana y la composición química del espacio subretiniano (21–29), neovascularización e inflamación (26,30–32), fagocitosis de los segmentos externos de fotorreceptores (33), organogénesis de la retina (34), pigmentación y migración de los gránulos de pigmento (35–37), proliferación (36) y degeneración (38–40) entre otros. Al formar parte de un órgano el EPR debe regular su funcionamiento como tejido de forma coordinada con su entorno, siendo imprescindible la comunicación intercelular. En 1990 se comenzaron a describir ondas de Ca^{2+} que se comunicaban célula a célula y se extendían radialmente desde el foco en que se habían desencadenado (41,42). Desde ese momento se ha descrito la existencia de ondas de Ca^{2+} intercelulares (OCI) en un gran número de tejidos: células gliales (43,44), neuronas (45), células endoteliales (46–48), músculo liso (49,50),

cardiomiocitos (51), hepatocitos (52), osteocitos (53), condrocitos (54), células renales (55,56), células glandulares (57,58), células pancreáticas (59), queratinocitos (60), así como en la retina (61) y el EPR (62–64).

La línea celular humana de epitelio pigmentario de la retina ARPE-19 (65) es actualmente el modelo celular de EPR más usado por su semejanza con el EPR fisiológico y su facilidad de cultivo. En el 2013 se describió la propagación de OCI inducida por estímulo mecánico en esta línea (64). En dicho artículo describen una doble vía de propagación de la OCI: intracelularmente por contacto célula a célula y extracelularmente por vía paracrina. La vía intracelular se propagaría a través de gap junctions, complejos de seis conexinas que crean un poro entre dos células vecinas por el que pueden difundir pequeños metabolitos, siendo el Ca^{2+} y el inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3) los principales candidatos que se han descrito (fig.1). La vía paracrina no requiere contacto célula a célula y se sustenta en la liberación de moléculas señalizadoras al medio extracelular y su difusión a células vecinas. En ARPE-19 y en otros EPR se ha demostrado la existencia del receptor purinérgico P2Y_2 (23) y ha sido descrito como principal responsable de la extensión de la OCI por vía paracrina (64). La unión de ATP extracelular a dicho receptor desencadenaría la generación de IP_3 (fig1).

En ARPE-19 y el resto de tipos celulares mencionados se hace referencia al incremento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ de forma parcial o total desde los depósitos intracelulares, cuyo principal exponente es el retículo endoplasmático (RE), como resultado final de ambas vías de propagación. La movilización de calcio desde el RE es un mecanismo fundamental por el que muchos procesos están mediados, siendo el receptor de IP_3 (IP_3R) y el receptor de rianodina (RyR) los dos principales canales permeables a Ca^{2+} presentes en la membrana del RE. Pero la relación entre el contenido de Ca^{2+} del RE $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ y la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ durante la señalización aún no están aclarados, en parte debido a la dificultad de medir precisamente la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$.

En el presente trabajo usamos el nuevo sensor de calcio recientemente descrito por nuestro grupo, GAP3 (GFP-Aequorin Protein) (66,67), para monitorizar la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ junto con un registro simultáneo de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en respuesta a ATP en células individuales y en un contexto multicelular durante la OCI resultante de estimulación

mecánica. Con este fin se generó un clon estable de la línea celular humana de epitelio pigmentario de la retina ARPE-19 transfectada con el sensor GAP3, obteniendo las primeras mediciones directas del calcio reticular durante una OCI y en EPR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Los experimentos se llevaron a cabo en una línea celular humana comercializada de EPR (ARPE-19. Donada por el IOBA). Se cultivaron en un Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM/F12 cat nº 21331020; Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), suplementado con 10% (vol/vol) de suero fetal bobino, 2 mM L-glutamina, 100 µg/mL estreptomicina, 100 U/mL penicilina, y 5 µg/ml Plasmocin™ (InvivoGen). Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

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

Creación del clon estable

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

A partir de las colonias que presentaban una mayor expresión de GAP3.7 determinado por su intensidad de fluorescencia, se aislaron células (mediante digestión de la colonia con tripsina) con las que se generaron diferentes clones estables, obteniéndose de esta manera tres clones estables con una buena expresión de GAP3.7. Finalmente, comparando el nivel de expresión y el porcentaje de células expresando GAP3.7, se decidió hacer el estudio con el clon nº 2.

Mediciones de calcio

Células ARPE-19 sembradas sobre cubreobjetos de 18 mm de diámetro se situaron sobre el estativo de un microscopio invertido Nikon Diaphot equipado con un objetivo de 20x PlanApoUV (NA 0,7; Olympus). Las células fueron perfundidas con un medio extracelular estándar con la siguiente composición (en mM): NaCl 145, KCl 5, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, glucosa 10, y 10 HEPES-Na (pH 7,4); a 22-25°C y con un velocidad de flujo de 5-6 ml/min.

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

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

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

Estimulación mecánica

La estimulación mecánica se llevó a cabo al tocar y presionar físicamente la membrana celular de la célula diana, con pipetas de patch-clamp en cuya punta se situó un hilo de tungsteno (0.075 mm Ø) afilado mediante electrolisis. Con objeto de asegurar una estimulación reproducible en todos los experimentos, el estímulo mecánico fue de tal magnitud que originaba la rotura de la célula diana (fig. 3).

Análisis de los datos

Las imágenes obtenidas se analizaron digitalmente mediante el software libre ImageJ. Se cuantificó el valor de intensidad de fluorescencia media en cada fotograma del

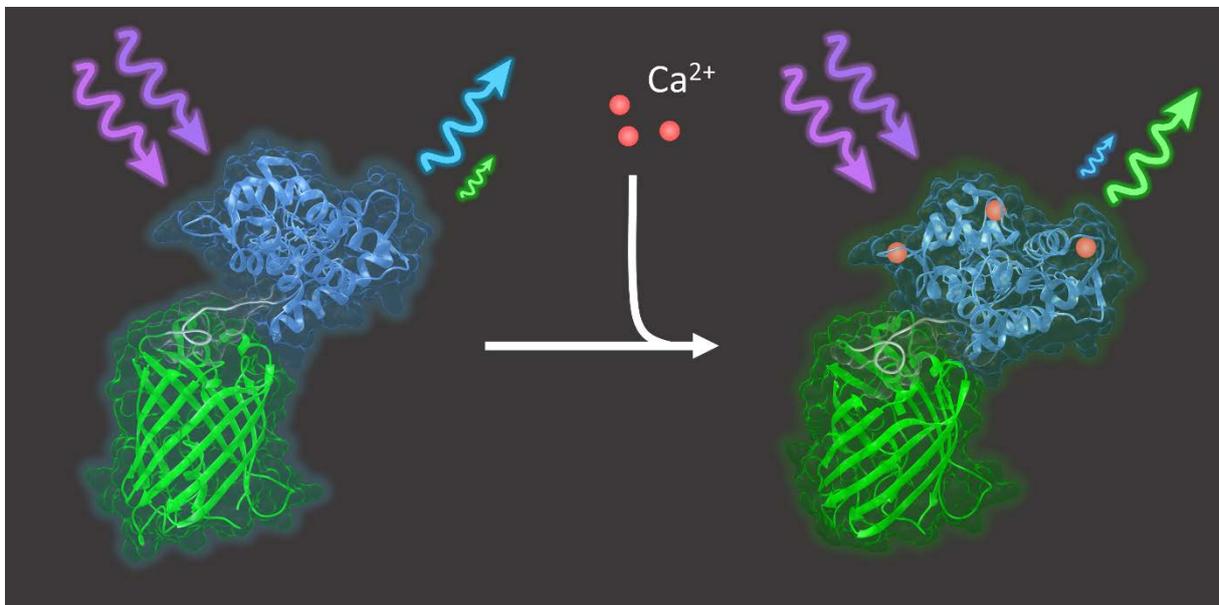


FIGURA 2. El sensor GAP3 es el resultado de la combinación de la proteína GFP (barril- β en verde) y la proteína unidora de calcio aequorina (conjunto de hélices- α en azul) por una secuencia linker (cadena en gris). GAP3 presenta dos picos de fluorescencia, al ser iluminada a 403 nm y a 470 nm. La fluorescencia emitida con la iluminación de 470 nm incrementa paralelamente al incremento en la concentración de calcio (flecha verde). Inversamente, la fluorescencia emitida con iluminación a 403 nm decrece con el incremento de la concentración de calcio (flecha azul). La conformación proteica mostrada es hipotética.

registro en 7 capas concéntricas a la célula estimulada mecánicamente [(NB1-BN7) determinadas por regiones de interés (ROI)], siendo la anchura radial de cada nivel de 25 μ m (fig.3). La razón $\Delta F_{470}/\Delta F_{403}$ se utilizó como un índice de la $[Ca^{2+}]_{RE}$, expresado generalmente como R/R0. Cuando no fue posible medir el ratio, los resultados se expresaron como $\Delta F/F_0$ en las mediciones a 470 nm. Para las

mediciones citosólicas, a 380 nm, se empleó $F_0/\Delta F$. Tanto F_0 como R_0 fueron el promedio de los valores de fluorescencia obtenidos durante los primeros 5-10 fotogramas previos al estímulo. Para determinar la intensidad de fluorescencia emitida por el sensor GAP3 en condiciones de máximo vaciamiento del calcio reticular, al final del registro se perfundió con una solución conteniendo ($0 \text{ Ca}^{2+} + 0.1 \text{ mM EGTA} + 100 \mu\text{M ATP} + 10\mu\text{M TBHQ}$); esta combinación permite desencadenar el vaciamiento del retículo (ATP) y evitar que se vuelva a almacenar ($0 \text{ Ca}^{2+} + \text{EGTA} + \text{TBHQ}$). En aquellos experimentos en los que se empleó esta solución extracelular se determinó esa intensidad de fluorescencia mínima como F_{min} , dándole el valor 0 y la intensidad basal, F_0 , el valor 1, y se expresaron los cambios provocados por los diferentes mecanismos en relación a esta transformación, $(\Delta F - F_{\text{min}})/(F_0 - F_{\text{min}})$.

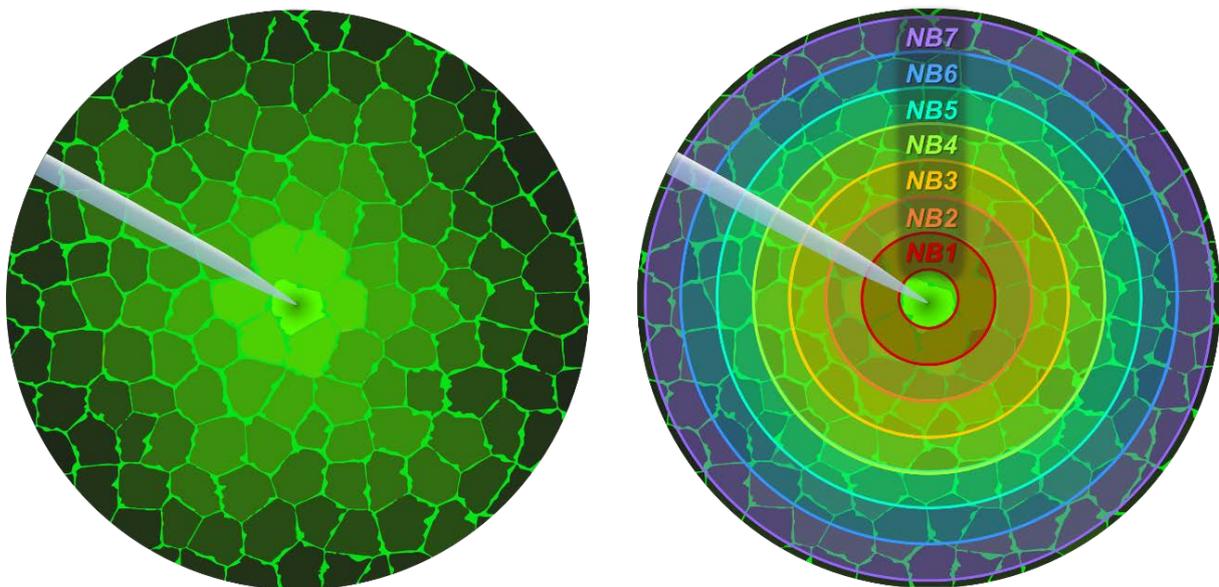


FIGURA 3. Representación gráfica del cultivo en monocapa de ARPE-19 durante la estimulación mecánica con microfilamento de la célula central e hipotética variación en la fluorescencia emitida por un sensor de calcio consecuencia de la OCI. A la derecha se muestra la configuración de las ROI empleadas en el análisis (NB1-NB7).

Inmunofluorescencia

Para corroborar la localización del sensor de calcio GAP3.7 en el RE, cultivos de ARPE-19 se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos, tras 3 lavados con PBS, las células fueron permeabilizadas con Tx-100 al 0.5% y bloqueados los sitios de unión inespecífica con suero de cabra al 10% durante 20 minutos. Posteriormente las células fueron incubadas durante toda la noche (a 4°C) con el anticuerpo primario

anti-calreticulina (1:200; Ac policlonal de conejo frente a la calreticulina). Tras 3 lavados con PBS, las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo AF568, 1:500 1h. Después las células fueron lavadas con PBS 3 veces durante 5 minutos y acto seguido montadas para su posterior visualización al microscopio de epifluorescencia.

RESULTADOS

Clon estable de ARPE-19 expresando el sensor GAP3 en RE

Con el fin de poder realizar la primera monitorización directa de la dinámica del calcio del retículo endoplasmático en el epitelio pigmentario de la retina, se empleó el sensor de calcio GAP3 (64,65) y se generó un clon estable de la línea celular humana de EPR más empleada actualmente, ARPE-19. Esta línea creada expresa GAP3 que es acumulado y retenido por la célula en el interior del RE. Para confirmar la expresión del sensor en el interior del RE se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo frente a calreticulina, una proteína chaperona del RE que además quela calcio y que se localiza exclusivamente en el RE (68,69). Tal y como se observa en la figura 4, el patrón de fluorescencia emitido por la GAP3 coincide con el obtenido con el anticuerpo frente a la calreticulina, lo que nos indicaría una expresión selectiva de GAP3 en el retículo (erGAP3).

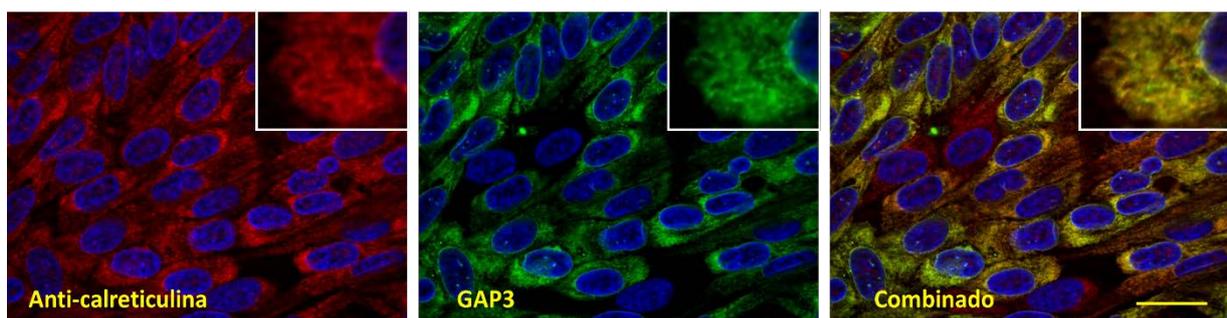


FIGURA 4. Inmunofluorescencia de células ARPE-19/erGAP3 teñidas con anticuerpos frente a calreticulina. De izquierda a derecha: señal debida a anti-calreticulina (rojo), GAP3 (verde) y superposición de los anteriores; los núcleos están teñidos en azul. En la imagen superpuesta la colocalización de la señal de la calreticulina con la de la GAP da lugar a una señal amarilla. En la esquina superior-izquierda de cada imagen se observa una región ampliada para mayor detalle. Barra de escala = 25 μ m.

Efecto del ATP extracelular sobre el calcio citosólico y reticular

Como se ha mencionado, se han descrito dos vías de propagación de la OCI en ARPE-19, siendo el ATP el principal candidato de la vía paracrina. Para confirmar la existencia de receptores purinérgicos funcionales en el clon ARPE-19/erGAP3 y conocer la dosis-respuesta a dicho agonista purinérgico se caracterizó su efecto a diferentes concentraciones de ATP.

La figura 5 muestra los registros simultáneos de las medidas de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ y la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en cultivos de células ARPE-19/erGAP3 estimuladas con concentraciones crecientes de ATP, desde $0.01 \mu M$ hasta $100 \mu M$. Cada una de las concentraciones de agonista se aplicó durante 30s y al final de cada experimento se perfundió sobre las células una solución extracelular modificada con objeto de depletar completamente de calcio el RE.

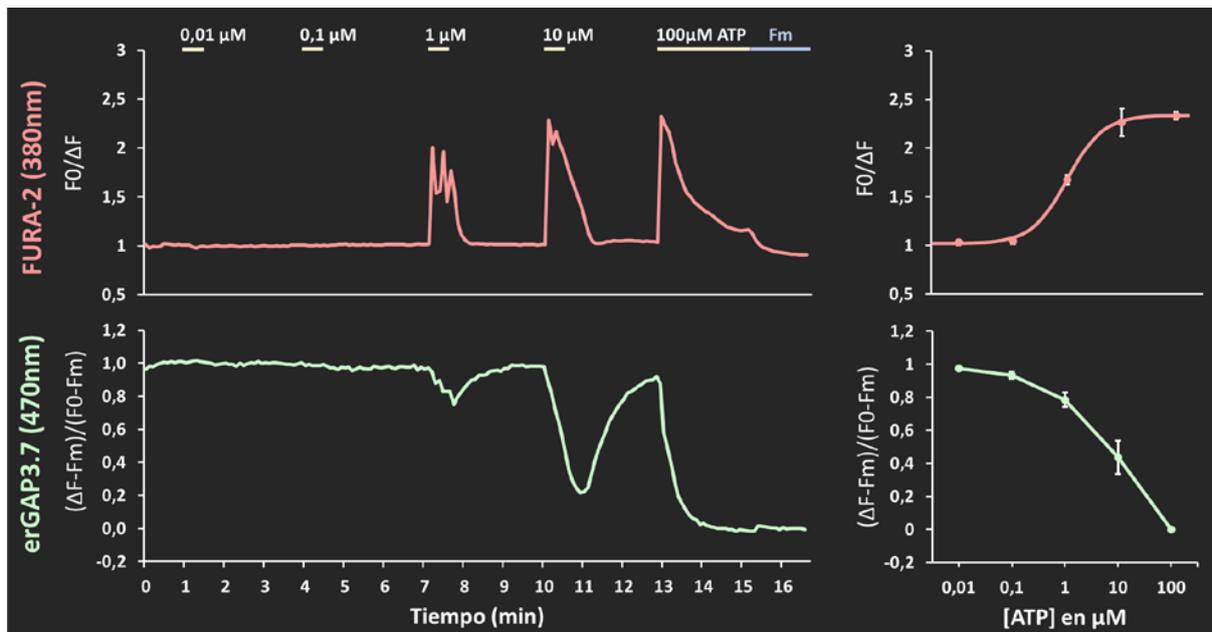


FIGURA 5. Curva dosis-respuesta representativa obtenida en respuesta a breves aplicaciones (30s) de diferentes concentraciones de ATP. Se registró simultáneamente la $[Ca^{2+}]$ en citosol con FURA-2 (trazado superior) y en el retículo mediante erGAP3 (trazado inferior). Ambos registros muestran una respuesta dosis dependiente inducida por $0.01-100 \mu M$ ATP (barras superiores). El registro de FURA-2 a 380 nm se ha invertido para facilitar la comprensión de la gráfica.

Como se aprecia en la gráfica dosis-efecto, la mínima concentración a la que se inicia una pequeña respuesta de las células a ATP es $0,1 \mu M$, alcanzándose el máximo de la respuesta, tanto en citosol como en retículo a $100 \mu M$, aunque la respuesta

citoplasmática ya se satura en torno a 10 μM ; encontrándose la concentración efectiva 50% (EC_{50}) en $0,85 \pm 0,25 \mu\text{M}$. A concentraciones de respuesta máxima en citosol (10 μM) el vaciamiento reticular es submáximo.

Como se puede observar en el panel superior de la figura 4, en respuesta a concentraciones submáximas de ATP el incremento del calcio intracelular presenta oscilaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ en continua presencia del agonista. Estas oscilaciones sólo parecen apreciarse a nivel del RE a la concentración más baja del agonista con respuesta (1 μM). Por otro lado, aunque temporalmente el inicio de la respuesta al agonista es prácticamente simultáneo para citosol y RE, el pico máximo de la respuesta en el citosol se alcanza mucho más rápidamente que en el RE.

Onda de calcio intercelular por estímulo mecánico

En numerosos tipos celulares se ha descrito la existencia de ondas de calcio que se transmiten célula a célula. Su mecanismo de producción y transmisión presenta variaciones de un tipo celular a otro, sin embargo, en todos ellos se habla de una contribución total o parcial del calcio proveniente del RE, pero siempre haciendo extrapolaciones indirectas debido a la dificultad para medir directamente la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$. Para evaluar la dinámica del calcio reticular en este contexto multicelular se realizó estimulación mecánica de una célula en un cultivo del clon ARPE-19/erGAP3 en confluencia iniciando así una onda de calcio intercelular radialmente a la célula estimulada. Para registrar la expansión de la onda a cada capa de células vecinas (NB; "neighboring") se analizó la intensidad de señal en 7 capas concéntricas de células vecinas (NB1-NB7). La cinética de la concentración de calcio, tanto citoplasmático como reticular, de las capas NB1-NB7 se muestra en la figura 6.

En el registro de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ con FURA-2 se puede observar un rápido incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ tras el estímulo mecánico que se inicia en la capa NB1 y se extiende posteriormente capa a capa, disminuyendo en velocidad e intensidad. Simultáneamente registrada, la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ sigue una cinética muy diferente. El descenso en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ se inicia con el estímulo mecánico y su intensidad disminuye progresivamente en capas distantes a la célula estimulada, al igual que los datos citoplasmáticos. Sin embargo, su cinética está mucho más dilatada en el tiempo y aun

cuando la $[Ca^{2+}]_{cit}$ ha comenzado a descender y se aproxima a la basal, la $[Ca^{2+}]_{RE}$ continúa descendiendo.

La intensidad media de los picos de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ y la $[Ca^{2+}]_{RE}$ en cada una de las capas concéntricas de células vecinas (NB1-NB7) se representa en la figura 7. Se puede apreciar como la disminución de la intensidad de la respuesta citosólica al estímulo mecánico conforme nos alejamos del estímulo sigue una tendencia más lineal que la disminución del vaciamiento del calcio reticular. En las primeras capas (NB1-NB2) existe un vaciamiento sustancial del RE pero rápidamente decrece el vaciamiento en capas más distantes.

En la parte inferior de la figura 7 se puede apreciar, como ya se ha mencionado en relación a la figura 6, que el tiempo necesario para alcanzar el pico máximo de variación en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ tras el estímulo mecánico es mucho menor que el necesario para alcanzar el pico de máxima respuesta en el RE (citosol $10-30\pm 5s$ y RE $107\pm 30s$). Manteniéndose aproximadamente constante este retraso entre ambos picos en las diferentes capas.

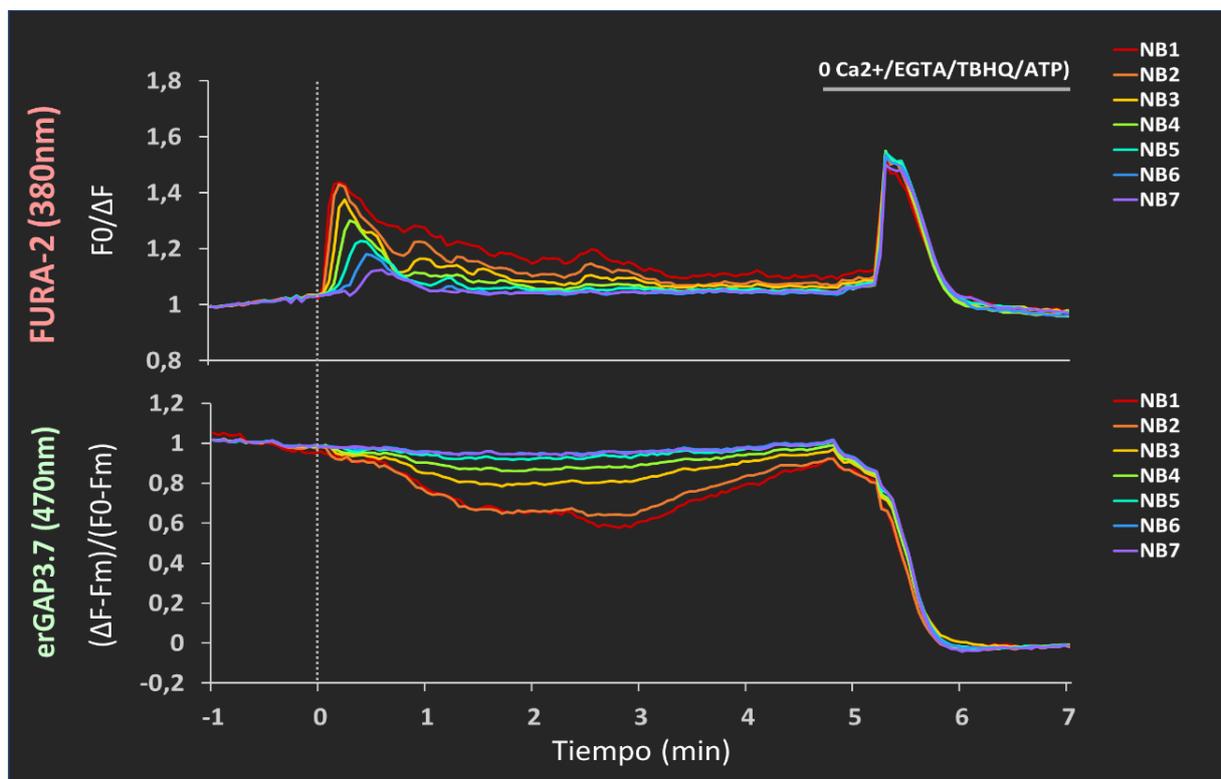


FIGURA 6. Propagación de la OCI en las células ARPE-19/erGAP3 tras estímulo mecánico en las capas NB1-NB7. La gráfica superior muestra el curso temporal de la variación del calcio citosólico que ocurre tras el estímulo mecánico (barra discontinuada vertical); en la inferior se muestra lo mismo para la $[Ca^{2+}]_{RE}$. Al final del registro se inicia perfusión con la solución ya descrita para vaciar el retículo (barra superior).

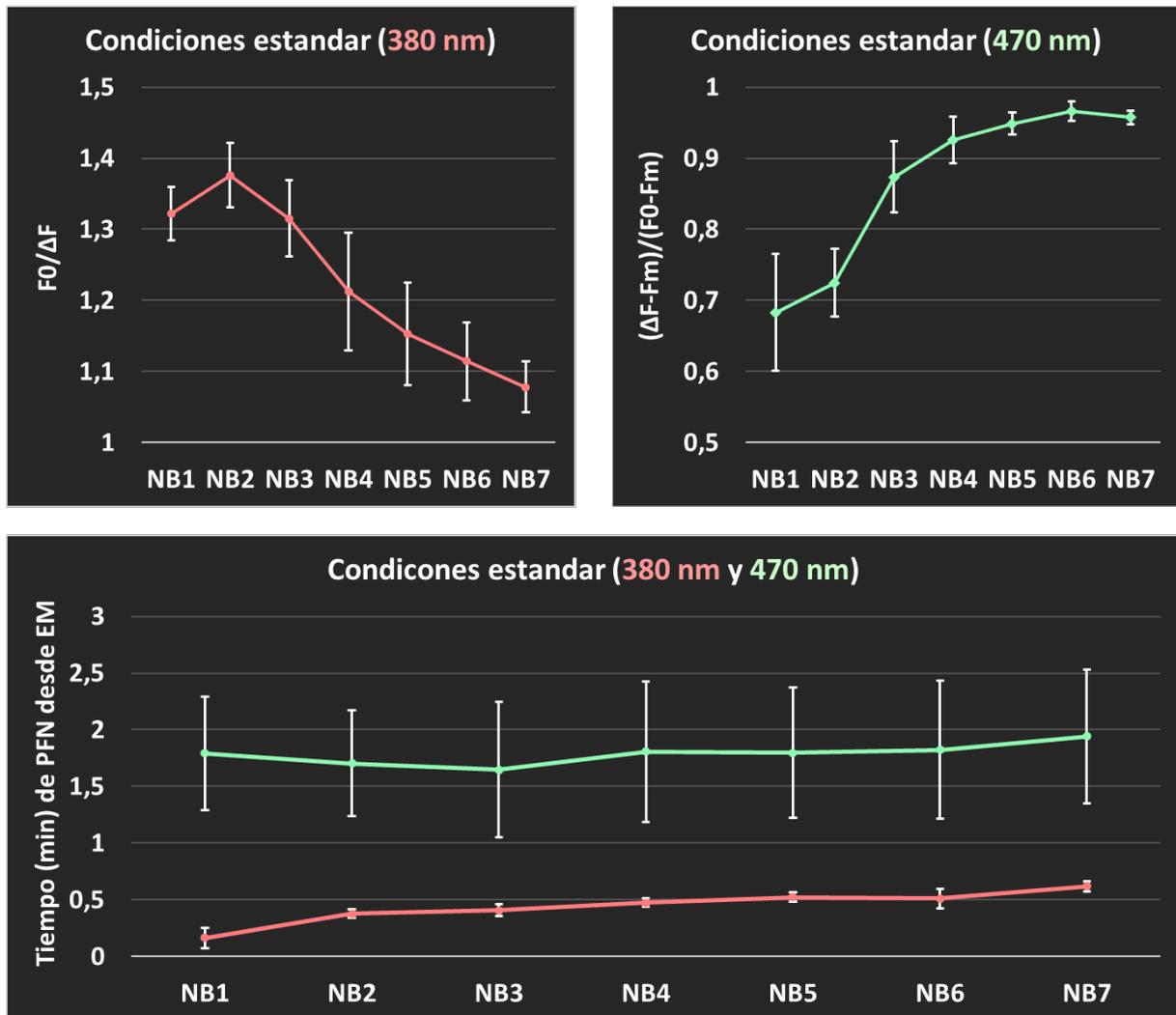


FIGURA 7. Respuestas máximas generadas en citosol y RE tras la estimulación mecánica en función de la distancia al estímulo. Las medidas se obtuvieron en las capas NB1-NB7; los valores se normalizaron respecto a la F_{min} . En el panel inferior se muestra el tiempo que tarda en alcanzarse la respuesta máxima en citosol o RE, tras la aplicación del estímulo mecánico (EM), en función de la distancia al estímulo (medido en las capas NB1-NB7).

Origen y efecto del Ca^{2+} citoplasmático en la OCI

El incremento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ desencadenado por el estímulo mecánico, podría ser debido a la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular o a la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares. Por ello para determinar el origen del aumento del calcio citosólico durante la OCI, se emplearon varias condiciones diferentes para bloquear selectivamente cada una de las posibles vías. La estimulación mecánica en un medio libre de Ca^{2+} extracelular no alteró significativamente la intensidad de pico citosólico ni la extensión de la onda (fig. 8A). La taspigargina, un inhibidor no competitivo de la

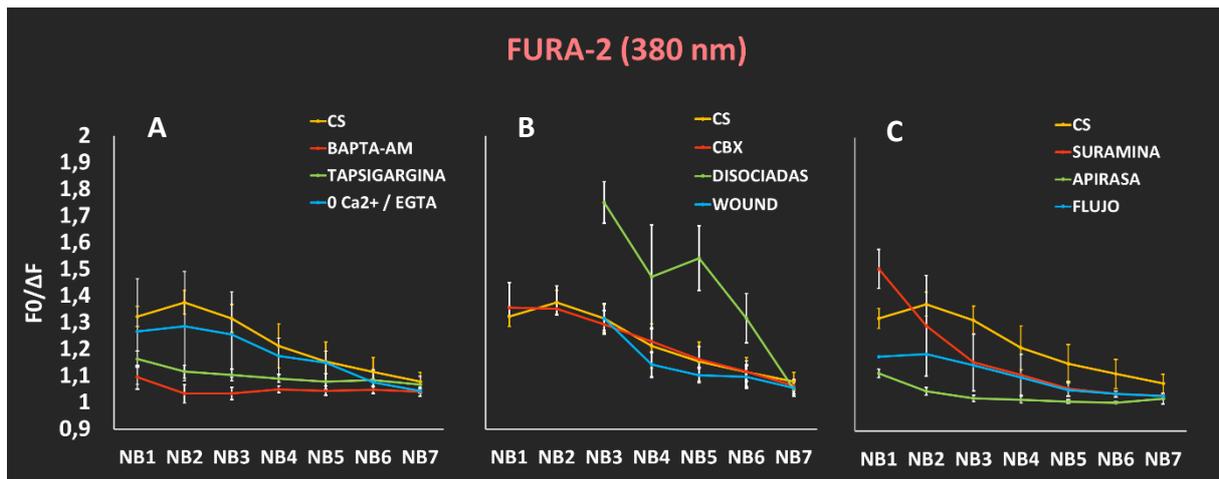


FIGURA 8. Efectos de diferentes condiciones y fármacos en la elevación del calcio citosólico tras la aplicación del estímulo mecánico. Los experimentos se han agrupado en tres bloques. **A.** Las condiciones que modifican la concentración de Ca^{2+} . **B.** Aquellas que afectan a la comunicación célula a célula. **C.** Las que influyen en el componente paracrino. “CS”: Condiciones estándar.

Ca^{2+} ATPasa del retículo endoplásmico, permite depletar el RE de Ca^{2+} . Tras 10 minutos de preincubación con $1\mu\text{M}$ de tapsigargina el estímulo mecánico no producía ningún incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ medible o este se encontraba severamente disminuido (fig. 8A), anulándose completamente la onda de calcio, tanto a nivel citosólico como reticular. Para determinar el efecto de la quelación del Ca^{2+} intracelular se usó BAPTA-AM. Como puede observarse en las figuras 8A y 9, la incubación con BAPTA-AM anuló la aparición de la onda de calcio citosólica a pesar de que se mantenía la liberación de calcio desde el RE.

Propagación de la OCI por contigüidad de célula a célula

Existen dos principales mecanismos descritos en este tipo celular (64) por los cuales se puede propagar la OCI: extracelularmente por mediadores paracrinos o por contacto célula a célula mediado por gap junctions. La carbenoxolona es un bloqueante inespecífico de gap junctions comúnmente usado en fisiología. Para determinar el efecto del bloqueo de dichas uniones en la OCI se incubaron durante 30 min con carbenoxolona [$100\mu\text{M}$] sin observarse cambios significativos (fig. 8B). Para romper el contacto célula a célula y evaluar la extensión de la OCI a través de una distancia libre de células se realizaron dos experimentos, un rayado con microfilamento para crear una brecha en la continuidad del cultivo en confluencia y un

segundo experimento con células aisladas subconfluentes. En ambas situaciones la OCI afectaba a células distantes sin contacto célula a célula (fig.8B).

Propagación paracrina de la OCI: ATP.

El hecho de que la onda se propague en ausencia de contacto célula a célula hace imprescindible la existencia de un factor paracrina que se extienda por el medio extracelular. Para probar esta hipótesis se realizó el registro en existencia de flujo (6 ml/min) durante la estimulación mecánica y se observó una desviación de la onda en la dirección de lavado del flujo (fig. suplementaria 4). En ARPE-19 y otros tipos celulares se ha descrito la molécula de ATP como principal mediador paracrina (62–64). Para bloquear los receptores purinérgicos presentes en estas células, se

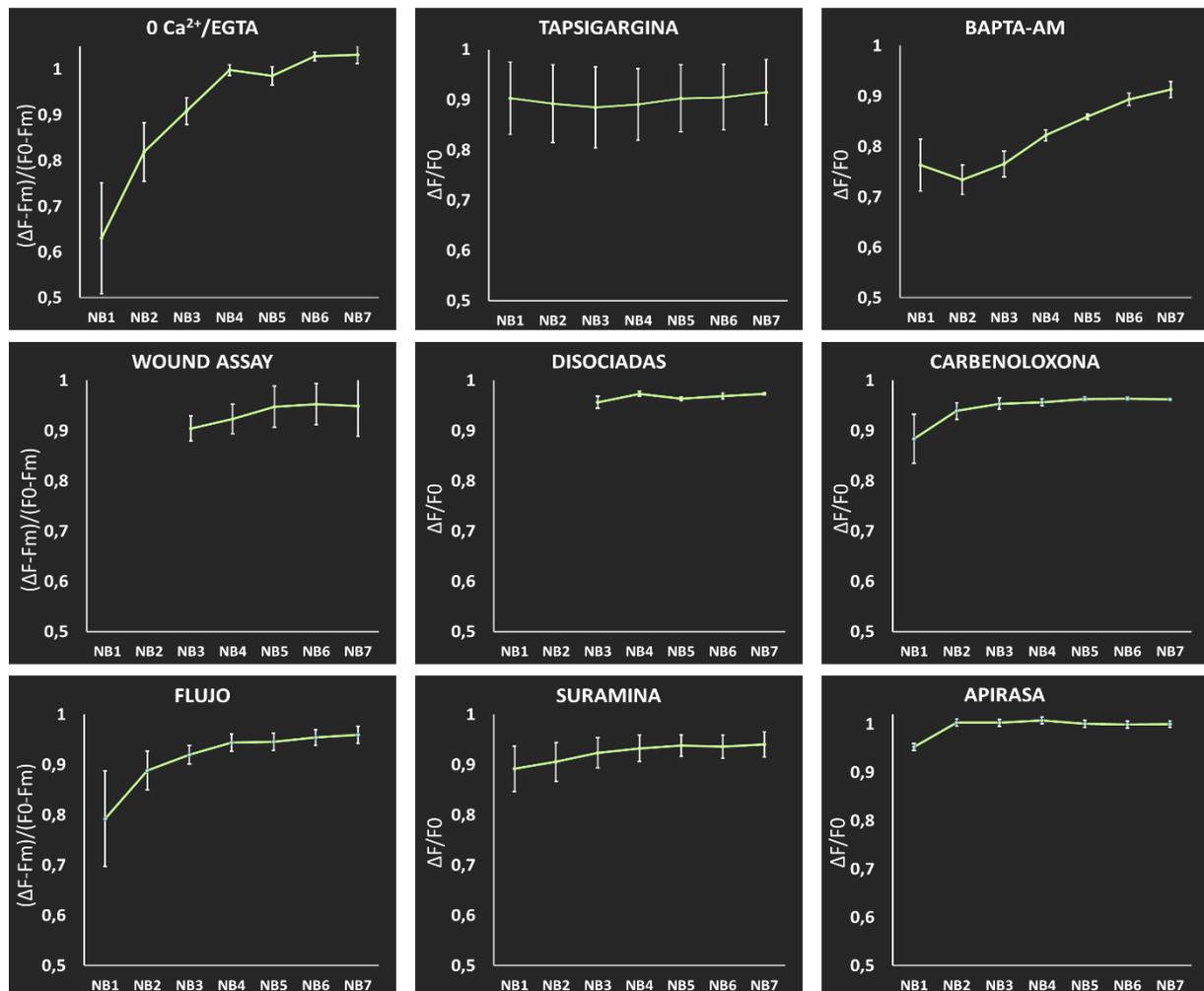


FIGURA 9. Registros de la concentración de calcio reticular en las diferentes condiciones empleadas durante el estudio de la OCI. Aquellos experimentos con solución para vaciar el RE al final del experimento están representados como $(\Delta F-F_{min})/(F_0-F_{min})$, el resto como $(\Delta F/F_0)$.

preincubaron las células con suramina, un bloqueante selectivo de estos receptores, sin obtener unos datos concluyentes (fig. 7C). La apirasa es un enzima que cataliza la hidrólisis del ATP a AMP y su presencia extracelularmente durante los registros inhibió drásticamente la OCI (fig. 8C).

[Ca²⁺]_{RE} durante la OCI en las diferentes condiciones

Para registrar el efecto que cada una de las condiciones mencionadas tenía sobre el calcio reticular se hizo nuevamente un registro simultáneo del calcio citosólico y reticular con el clon ARPE-19/erGAP3 (fig. 8). En conjunto se observa que las condiciones experimentales que no alteraban el pico citosólico presentaban un pequeño vaciamiento del RE, mayor en las primeras capas (NB1-NB2) frente a las últimas (NB6-NB7) a excepción de BAPTA-AM que presenta un elevado vaciamiento reticular en comparación al resto de condiciones, en ausencia de onda de Ca²⁺ citosólica. En el caso de la apirasa que había producido una notable inhibición de la onda citosólica se ve igualmente abolido el vaciamiento reticular.

D I S C U S I Ó N

Desde el primer momento en que un cigoto es formado y comienza a dividirse hasta que finalmente constituye un órgano tan complicado espacial y funcionalmente como el ojo, existe un complejo intercambio, entre células y tejidos, de señales biológicas para coordinar y organizar su armonioso desarrollo. Pero incluso una vez constituidos los tejidos, las células no se comportan como entidades individuales, su correcto funcionamiento depende de una precisa emisión y recepción de señales que permiten la comunicación intercelular.

Las ondas de Ca²⁺ intercelulares se inician en una célula y se extienden a células adyacentes al lugar de origen, revelando una respuesta coordinada del tejido. En algunos tipos celulares como el epitelio bronquial se ha demostrado que como consecuencia de ésta OCI existe un movimiento coordinado de los cilios que permite un arrastre más efectivo de sustancias. En otros muchos tejidos, como el EPR, aún se desconoce que función desempeña.

En el presente artículo se ha profundizado en los mecanismos de la OCI que han sido descritos para la línea celular ARPE-19 (64) a nivel del calcio citoplasmático y por primera vez se han realizado mediciones directas de la $[Ca^{2+}]_{RE}$.

En condiciones fisiológicas e in vitro, se pueden describir, entre otros, tres espacios relevantes con concentraciones de calcio muy diferentes: el espacio extracelular, el citosol y el retículo sarcoplasmático. Para determinar la influencia que tiene una marcada disminución de la $[Ca^{2+}]$ en cada uno de estos espacios en la OCI se han empleado tres condiciones diferentes (fig. 8A). La ausencia de calcio extracelular no interrumpe ni el inicio ni la extensión de la OCI significativamente a pesar de que la presencia de canales de calcio tipo L en la membrana (70) deja abierta la posible existencia de corrientes de calcio desde el espacio extracelular. La presencia de un pico de calcio citosólico en un medio libre de calcio sugiere el origen de la OCI en los depósitos intracelulares. El vaciamiento con tapsigargina del calcio del RE, la principal organela que se ha descrito implicada en este tipo de señales, provoca una prácticamente total abolición del incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ lo que sugiere que la mayor contribución de calcio entrante al citosol durante la OCI proviene del RE. Estos datos son semejantes a los descritos en anteriores publicaciones (62–64). Sin embargo, en otros artículos no se explora el efecto que tiene la quelación del calcio en el espacio donde es biológicamente más activo en términos de señalización, el citosol, principalmente debido a que es el espacio en el que se monitoriza tradicionalmente la OCI. En nuestros experimentos se realiza una doble monitorización de la onda de calcio, a nivel citosólico y reticular, por ello se empleó el registro reticular (fig. 9) para evaluar el efecto de la quelación del calcio citosólico, observándose la propagación de la OCI a un número de capas equivalente a las condiciones estándar pero con un mayor vaciamiento del retículo que puede ser explicado por la ausencia de inhibición de los IP_3R al ser el incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ un factor que disminuye la probabilidad de apertura (71). Este resultado sugiere que la propagación de la onda es independiente de la $[Ca^{2+}]_{cit}$, por lo que algunas de las teorías propuestas en la propagación de la OCI, como el paso de iones de calcio a través de GAP junctions o la secreción calcio-dependiente de factores paracrinicos quedarían descartadas.

En esta línea celular se había descrito la vía paracrina, mediada por ATP, como principal mecanismo de propagación de la onda (64). En nuestros experimentos (fig. 8C) el hecho de que la onda se vea desviada en la dirección del flujo y que pueda

inhibirse casi totalmente con la adición de apirasa, verifica que el ATP liberado al medio es el principal responsable de la OCI.

En anteriores publicaciones se habla de una dudosa contribución a la expansión de la onda mediante gap junctions en las primeras capas celulares (64). Nuestros resultados, en los que la OCI se propaga en células aisladas, separadas por un rayado o tras un periodo de incubación con carbenoxolona (fig. 8B), indican que la propagación de la OCI es independiente del contacto célula a célula. Sin embargo, estos datos deben ser evaluados con precaución debido a que la formación de gap junctions es un proceso lento y en la línea celular ARPE-19 se alcanza la mayor resistencia transmembrana a los 30 días de alcanzada la confluencia (65). En nuestro trabajo y en anteriores publicaciones se evalúa la vía célula a célula tras un tiempo inferior a los 7 días en cultivo. Un periodo de incubación in vitro de 15 días ha sido el tiempo máximo que hemos analizado, determinándose que la OCI desencadenada por estímulo mecánico en estas condiciones no presentaba variaciones significativas respecto a los experimentos realizados en cultivos a los 2-4 días post-confluencia, aunque en estas condiciones de cultivo (15 días in vitro (DIV)) no se ha analizado la posible contribución de las gap junctions a la OCI de una forma más específica.

Agrupando todos los resultados se puede hipotetizar que el principal mecanismo de generación y propagación de la OCI se iniciaría con la liberación de ATP por la célula estimulada mecánicamente (canales de calcio mecano-sensible se han demostrado en otros EPR (62). Se desconoce el mecanismo exacto por el que la estimulación mecánica desencadena la liberación de ATP, pero se ha descrito que la liberación implica transporte vesicular y canales CFTR (72). La unión del ATP a receptores P2Y (siendo el subtipo P2Y₂ el principal candidato, aunque se ha descrito la existencia de receptores P2Y₁ y P2Y₆ en EPR (73)) en la membrana de células adyacentes activaría secundariamente una fosfolipasa C (PLC) conduciendo a un incremento en la producción de IP3. El incremento en la concentración de IP3 ocasionaría la apertura del IP3R (se ha escrito la existencia del subtipo 3 en otros tipos de epitelio (74,75)) en la membrana del RE y la consecuente liberación de calcio reticular hacia el citosol. El incremento en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ incrementaría la probabilidad de apertura de los receptores de rianodina (RyR) (su presencia ha sido verificada en ARPE-19 (76)) favoreciendo un mayor vaciamiento del RE. La difusión del ATP por el medio extracelular explicaría

la generación de una onda que induce un pico de calcio citosólico por la liberación de calcio reticular.

A pesar del importante papel de calcio reticular, su medición directa no había sido realizada en la OCI de ningún tipo celular por la complejidad que entraña. Con la creación del clon ARPE-19/erGAP se han podido realizar las primeras mediciones simultáneas al registro citosólico. La primera observación que se extrae de los registros es que efectivamente existe un vaciamiento del RE como consecuencia de estímulo mecánico y que adopta una disposición radial. Sin embargo, la intensidad del vaciamiento del RE, valorado en relación al máximo vaciamiento conseguido con una solución para depletarlo de calcio como ya se ha explicado, es muy variable de unos experimentos a otros, siendo a veces difícil de cuantificar. A su vez, al contrario que a nivel citosólico donde existe una disminución casi lineal de la intensidad del pico, en el RE existe una gran diferencia entre la intensidad del vaciamiento en las primeras capas analizadas (NB1-NB3) frente al resto (NB4-NB7), siendo muy superior en las primeras y prácticamente imperceptible en las últimas. Ambas situaciones pueden interpretarse a partir de la gráfica dosis-efecto de ATP. Si suponemos que la concentración de ATP en el medio extracelular próximo al foco de estimulación se encuentra en valores en torno a la EC50, 1 μ M, el resultado es que existen picos de calcio citosólico de una intensidad considerable que decrecen moderadamente conforme el ATP liberado se diluye al difundir en el medio. Sin embargo, la gráfica dosis-efecto del vaciamiento del RE se encuentra desplazada a la derecha, y para valores en torno a la EC50 citosólica, el vaciamiento reticular es del 22 \pm 4% del total posible, por lo que este pequeño-moderado vaciamiento en las primeras capas se hace imperceptible en las últimas o incluso en las primeras capas de algunos experimentos en los que la liberación de ATP fuera menor. Parece contraintuitivo pensar que siendo, según los resultados, el RE el responsable del pico citosólico, existan experimentos y/o capas en las que a pesar de un intenso pico en la $[Ca^{2+}]_{cit}$ no sean casi perceptibles los cambios en la $[Ca^{2+}]_{RE}$ pero hay que tener en cuenta que la concentración en citosol, \sim [100 nM], es tres órdenes de magnitud inferior a la concentración en RE, \sim [0,5 mM] y eso sumado al gran volumen que ocupa el RE en la célula hace que pequeños vaciamientos del RE supongan grandes variaciones de la $[Ca^{2+}]_{cit}$.

Otra observación muy interesante que se obtiene al comparar las cinéticas de ambas concentraciones es que la $[Ca^{2+}]_{cit}$ se eleva rápidamente tras el estímulo y se aproxima

a la basal en pocos segundos. Sin embargo, la $[Ca^{2+}]_{RE}$ inicia su descenso prácticamente simultáneo al cambio citosólico, pero con un ritmo mucho más lento que el citosólico, de tal forma que incluso cuando la $[Ca^{2+}]_{cit}$ ha iniciado su descenso y se acerca a la basal, la $[Ca^{2+}]_{RE}$ sigue descendiendo, tardando minutos en retornar a la basal. Nuevamente resulta contraintuitivo pensar que el pico citosólico se produzca cuando el retículo ha iniciado un mínimo vaciamiento y conforme progresa el vaciamiento no exista un acompañante incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$. A partir de esta observación se deduce la existencia de mecanismos de aclaramiento de calcio citosólico que se desencadenan por el rápido incremento de la $[Ca^{2+}]_{cit}$ y se contraponen a la liberación del calcio desde el RE. El principal candidato que se ha descrito implicado en este proceso es la mitocondria (77,78) aunque los melanosomas, una organela característica de este tejido, también parecen estar implicados en el tamponamiento de la elevación del calcio citosólico (79,80). A pesar de este proceso de aclaramiento es importante visualizar (fig. 6) que en aquellas capas en las que persiste un consistente y continuado vaciamiento del RE, la $[Ca^{2+}]_{cit}$ se aproxima, pero no llega a alcanzar los valores basales hasta que el retículo deja de vaciarse.

Estas puntualizaciones sobre el registro de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ abren varias e interesantes preguntas sobre su efecto en el funcionamiento celular: ¿tiene una finalidad fisiológica un vaciamiento del RE dilatado en el tiempo? ¿Se altera el funcionamiento de la mitocondria al actuar como tampón de calcio durante la OCI? ¿La $[Ca^{2+}]_{cit}$ suprabasal que se mantiene durante el vaciamiento del RE tiene algún efecto sobre la señalización intracelular? ¿Actúa el lento vaciamiento del RE como periodo refractario al desencadenamiento de nuevos picos citosólicos? Aún es necesaria una mayor profundización dirigida a responder estas y nuevas preguntas.

C O N C L U S I Ó N

Nuestros resultados confirman la existencia de una onda de calcio intercelular desencadenada por estímulo mecánico en la línea ARPE-19, de extensión limitada a unas 7 capas celulares y no autorregenerativa. Demostramos que el ATP difunde extracelularmente, a partir de la célula estimulada, y es la principal molécula implicada en la propagación de la OCI. Se descarta una contribución significativa de las gap

junctions en el origen y/o extensión de la OCI en las condiciones estudiadas. Demostramos que la propagación de la OCI es un proceso independiente de la $[Ca^{2+}]_{cit}$. Por otro lado, se demuestra que la OCI es independiente de la $[Ca^{2+}]_{extracelular}$, siendo originada por liberación de calcio desde el RE, probablemente vía IP3. Realizamos las primeras medidas directas de la $[Ca^{2+}]_{RE}$ durante la OCI. Destaca un vaciamiento del RE más dilatado en el tiempo que el pico citosólico abriendo la posibilidad a nuevos efectos de la OCI, y otras señales que desencadenen un vaciamiento del RE, en la fisiología celular y la fisiopatología oftalmológica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lamb TD, Collin SP, Pugh EN. Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat Rev Neurosci*. diciembre de 2007;8(12):960-76.
2. Steinberg RH. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc Ophthalmol Adv Ophthalmol*. 15 de octubre de 1985;60(4):327-46.
3. Bok D. The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl*. 1993;17:189-95.
4. Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med*. diciembre de 2010;10(9):802-23.
5. Strauss O. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiol Rev*. 1 de julio de 2005;85(3):845-81.
6. Miller SS, Steinberg RH. Active transport of ions across frog retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res*. septiembre de 1977;25(3):235-48.
7. Miller SS, Steinberg RH. Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. *J Membr Biol*. 1977;36(4):337-72.
8. Steinberg RH, Linsenmeier RA, Griff ER. Three light-evoked responses of the retinal pigment epithelium. *Vision Res*. 1983;23(11):1315-23.
9. Baylor D. How photons start vision. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 de enero de 1996;93(2):560-5.
10. Rushton WA, Henry GH. Bleaching and regeneration of cone pigments in man. *Vision Res*. 1968;8(6):617-31.
11. Lamb TD, Pugh EN. Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Prog Retin Eye Res*. 2004;23(3):307-80.
12. Kevany BM, Palczewski K. Phagocytosis of Retinal Rod and Cone Photoreceptors. *Physiology*. 2010;25(1):8-15.
13. LaVail MM. Outer segment disc shedding and phagocytosis in the outer retina. *Trans Ophthalmol Soc U K*. 1983;103 (Pt 4):397-404.
14. LaVail MM. Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1980;19(4):407-11.
15. LaVail MM. Rod outer segment disc shedding in relation to cyclic lighting. *Exp Eye Res*. 1976;23(2):277-80.
16. Wenkel H, Streilein JW. Evidence that Retinal Pigment Epithelium Functions as an Immune-Privileged Tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1 de octubre de 2000;41(11):3467-73.
17. Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Ng TF, Zamiri P. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res*. 2002;42(4):487-95.
18. Ishida K, Panjwani N, Cao Z, Streilein JW. Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. Epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress T-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocul Immunol Inflamm*. 2003;11(2):91-105.
19. Clapham DE. Calcium Signaling. *Cell*. 2007;131(6):1047-58.
20. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(7):517-29.
21. Peterson WM, Meggyesy C, Yu K, Miller SS. Extracellular ATP activates calcium signaling, ion, and fluid transport in retinal pigment epithelium. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1997;17(7):2324-37.
22. Quinn RH, Quong JN, Miller SS. Adrenergic receptor activated ion transport in human fetal retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(1):255-64.
23. Mitchell CH. Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space. *J Physiol*. 2001;534(1):193-202.
24. Maminishkis A, Jalickee S, Blaug SA, Rymer J, Yerxa BR, Peterson WM, et al. The P2Y(2) receptor agonist INS37217 stimulates RPE fluid transport in vitro and retinal reattachment in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(11):3555-66.
25. Edelman JL, Miller SS. Epinephrine stimulates fluid absorption across bovine retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(12):3033-40.
26. Barro-Soria R, Stindl J, Müller C, Foeckler R, Todorov V, Castrop H, et al. Angiotensin-2-Mediated Ca²⁺ Signaling in the Retinal Pigment Epithelium: Role of Angiotensin-Receptor-Associated-Protein and TRPV2 Channel. *Boulton ME, editor. PLoS ONE*. 012;7(11):e49624.
27. Echtenkamp SF, Kennedy BG, Mangini NJ. Regulation of calcium transport by the mammalian retinal pigment epithelium. *FASEB J*. 2009;23(1 Supplement):796.35-796.35.
28. Kennedy BG, Echtenkamp SF, Kostrominova T, Alloosh M, Mangini NJ. Calcium Transport in Retinal Pigment Epithelium of the Ossabaw Swine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(13):2535-2535.
29. Mangini NJ, Haugh-Scheidt L, Valle JE, Cragoe, Jr EJ, Ripps H, Kennedy BG. Sodium-Calcium Exchanger in Cultured Human Retinal Pigment Epithelium. *Exp Eye Res*. 1997;65(6):821-34.
30. Hollborn M, Fischer S, Kuhrt H, Wiedemann P, Bringmann A, Kohen L. Osmotic regulation of NFAT5 expression in RPE cells:

- The involvement of purinergic receptor signaling. *Mol Vis.* 2017;23:116-30.
31. Crane IJ, Wallace CA, McKillop-Smith S, Forrester JV. CXCR4 Receptor Expression on Human Retinal Pigment Epithelial Cells from the Blood-Retina Barrier Leads to Chemokine Secretion and Migration in Response to Stromal Cell-Derived Factor 1. *J Immunol.* 2000;165(8):4372-8.
 32. Rosenthal R, Heimann H, Agostini H, Martin G, Hansen LL, Strauss O. Ca²⁺ channels in retinal pigment epithelial cells regulate vascular endothelial growth factor secretion rates in health and disease. *Mol Vis.* 2007;13:443-56.
 33. Karl MO, Kroeger W, Wimmers S, Milenkovic VM, Valtink M, Engelmann K, et al. Endogenous Gas6 and Ca²⁺-channel activation modulate phagocytosis by retinal pigment epithelium. *Cell Signal.* 2008;20(6):1159-68.
 34. Pearson RA, Catsicas M, Becker DL, Bayley P, Luneborg NL, Mobbs P. Ca²⁺ signalling and gap junction coupling within and between pigment epithelium and neural retina in the developing chick. *Eur J Neurosci.* 2004;19(9):2435-45.
 35. King-Smith C, Chen P, Garcia D, Rey H, Burnside B. Calcium-independent regulation of pigment granule aggregation and dispersion in teleost retinal pigment epithelial cells. *J Cell Sci.* 1996;109 (Pt 1):33-43.
 36. Smith-Thomas L, Haycock JW, Metcalfe R, Boulton M, Ellis S, Rennie IG, et al. Involvement of calcium in retinal pigment epithelial cell proliferation and pigmentation. *Curr Eye Res.* 1998;17(8):813-22.
 37. Johnson AS, Garcia DM. Carbachol-mediated pigment granule dispersion in retinal pigment epithelium requires Ca²⁺ and calcineurin. *BMC Cell Biol.* 2007;8(1):53.
 38. Neussert R, Müller C, Milenkovic VM, Strauß O. The presence of bestrophin-1 modulates the Ca²⁺ recruitment from Ca²⁺ stores in the ER. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* 2010;460(1):163-75.
 39. Zhang L, Hui Y-N, Wang Y-S, Ma J-X, Wang J-B, Ma L-N. Calcium overload is associated with lipofuscin formation in human retinal pigment epithelial cells fed with photoreceptor outer segments. *Eye.* 2011;25(4):519-27.
 40. Gómez NM, Tamm ER, Strauß O. Role of bestrophin-1 in store-operated calcium entry in retinal pigment epithelium. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* 2013;465(4):481-95.
 41. Sanderson MJ, Charles AC, Dirksen ER. Mechanical stimulation and intercellular communication increases intracellular Ca²⁺ in epithelial cells. *Cell Regul.* 1990;1(8):585-96.
 42. Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science.* 1990;247(4941):470-3.
 43. Scemes E, Giaume C. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia.* 2006;54(7):716-25.
 44. Takeda M, Nelson DJ, Soliven B. Calcium signaling in cultured rat oligodendrocytes. *Glia.* 1995;14(3):225-36.
 45. Charles AC, Kodali SK, Tyndale RF. Intercellular Calcium Waves in Neurons. *Mol Cell Neurosci.* 1996;7(5):337-53.
 46. Burdyga T, Shmygol A, Eisner DA, Wray S. A new technique for simultaneous and in situ measurements of Ca²⁺ signals in arteriolar smooth muscle and endothelial cells. *Cell Calcium.* 2003;34(1):27-33.
 47. Gap Junctional Intercellular Communication in Bovine Corneal Endothelial Cells [Internet]. PubMed Journals. 2017.
 48. Vandamme W, Braet K, Cabooter L, Leybaert L. Tumour necrosis factor alpha inhibits purinergic calcium signalling in blood-brain barrier endothelial cells. *J Neurochem.* 2004;88(2):411-21.
 49. Hennig GW, Smith CB, O'Shea DM, Smith TK. Patterns of intracellular and intercellular Ca²⁺ waves in the longitudinal muscle layer of the murine large intestine In vitro. *J Physiol.* 2002;543(Pt 1):233-53.
 50. Young RC, Schumann R, Zhang P. The signaling mechanisms of long distance intercellular calcium waves (far waves) in cultured human uterine myocytes. *J Muscle Res Cell Motil.* 2002;23(4):279-84.
 51. Suadcani SO, Vink MJ, Spray DC. Slow intercellular Ca²⁺ signaling in wild-type and Cx43-null neonatal mouse cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279(6):H3076-3088.
 52. Amaya MJ, Nathanson MH. Calcium signaling in the liver. *Compr Physiol.* 2013;3(1):515-39.
 53. Jørgensen NR. Short-range intercellular calcium signaling in bone. *APMIS Suppl.* 2005;(118):5-36.
 54. Kono T, Nishikori T, Kataoka H, Uchio Y, Ochi M, Enomoto K. Spontaneous oscillation and mechanically induced calcium waves in chondrocytes. *Cell Biochem Funct.* 2006;24(2):103-11.
 55. Peti-Peterdi J. Calcium wave of tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;291(2):F473-480.
 56. Yao J, Morioka T, Li B, Oite T. Coordination of Mesangial Cell Contraction by Gap Junction-Mediated Intercellular Ca²⁺ Wave. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(8):2018-26.
 57. Enomoto K, Furuya K, Yamagishi S, Maeno T. Mechanically induced electrical and intracellular calcium responses in normal and cancerous mammary cells. *Cell Calcium.* 1 de agosto de 1992;13(8):501-11.
 58. Ryu S-Y, Peixoto PM, Won J-H, Yule DJ, Kinnally KW. Extracellular ATP and P2Y2 receptors mediate intercellular Ca²⁺ waves induced by mechanical stimulation in submandibular gland cells: role of mitochondrial regulation of store operated Ca²⁺ entry. *Cell Calcium.* 2010;47(1):65.
 59. Yule DJ, Stuenkel E, Williams JA. Intercellular calcium waves in rat pancreatic acini: mechanism of transmission. *Am J Physiol.* 1996;271(4 Pt 1):C1285-1294.
 60. Koizumi S, Fujishita K, Inoue K, Shigemoto-Mogami Y, Tsuda M, Inoue K. Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation. *Biochem J.* 2004;380(Pt 2):329-38.
 61. Newman EA, Zahs KR. Calcium waves in retinal glial cells. *Science.* 1997;275(5301):844-7.
 62. Himpens B, Stalmans P, Gomez P, Malfait M, Vereecke J. Intra- and intercellular Ca²⁺ signaling in retinal pigment epithelial cells during mechanical stimulation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1999;13 Suppl:S63-68.
 63. Stalmans P, Himpens B. Properties of intra- and intercellular Ca²⁺-wave propagation elicited by mechanical stimulation in cultured RPE cells. *Cell Calcium.* 1999;25(6):391-9.
 64. Abu Khamidakh AE, Juuti-Uusitalo K, Larsson K, Skottman H, Hyttinen J. Intercellular Ca²⁺ wave propagation in human retinal pigment epithelium cells induced by mechanical stimulation. *Exp Eye Res.* 2013;108:129-39.
 65. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res.* 1996;62(2):155-69.
 66. Rodríguez-Prados M, Rojo-Ruiz J, Aulestia FJ, García-Sancho J, Alonso MT. A new low-Ca²⁺ affinity GAP indicator to monitor high Ca²⁺ in organelles by luminescence. *Cell Calcium.* 2015;58(6):558-64.
 67. Alonso MT, Rodríguez-Prados M, Navas-Navarro P, Rojo-Ruiz J, García-Sancho J. Using aequorin probes to measure Ca²⁺ in intracellular organelles. *Cell Calcium.* 2017.
 68. Michalak M, Robert Parker J., Opas M. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium.* 2002;32(5-6):269-78.
 69. Gelebart P, Opas M, Michalak M. Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(2):260-6.
 70. Rosenthal R, Strauss O. Ca²⁺-channels in the RPE. *Adv Exp Med Biol.* 2002;514:225-35.

71. Foskett JK, White C, Cheung K-H, Mak D-OD. Inositol Trisphosphate Receptor Ca²⁺ Release Channels. *Physiol Rev.* 2007;87(2):593-658.
72. Reigada D. Release of ATP from RPE Cells Involves both CFTR and Vesicular Transport. *AJP Cell Physiol* 288, 2005.
73. Tovell VE, Sanderson J. Distinct P2Y Receptor Subtypes Regulate Calcium Signaling in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2008;49(1):350.
74. Siefjediers A, Hardt M, Prinz G, Diener M. Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor subtypes at rat colonic epithelium. *Cell Calcium.* 2007;41(4):303-15.
75. Maranto AR. Primary structure, ligand binding, and localization of the human type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expressed in intestinal epithelium. *J Biol Chem.* 1994;269(2):1222-30.
76. Wimmers S, Halsband C, Seyler S, Milenkovic V, Strauss O. Voltage-dependent Ca²⁺ channels, not ryanodine receptors, activate Ca²⁺-dependent BK potassium channels in human retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis.* 2008;14:2340-8.
77. Vasington FD, Murphy JV. Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *J Biol Chem.* 1962;237:2670-7.
78. Deluca HF, Engstrom GW. Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1961;47:1744-50.
79. Bush WD, Simon JD. Quantification of Ca(2+) binding to melanin supports the hypothesis that melanosomes serve a functional role in regulating calcium homeostasis. *Pigment Cell Res.* 2007;20(2):134-9.
80. Salceda R, Sánchez-Chávez G. Calcium uptake, release and ryanodine binding in melanosomes from retinal pigment epithelium. *Cell Calcium.* 2000;27(4):223-9.

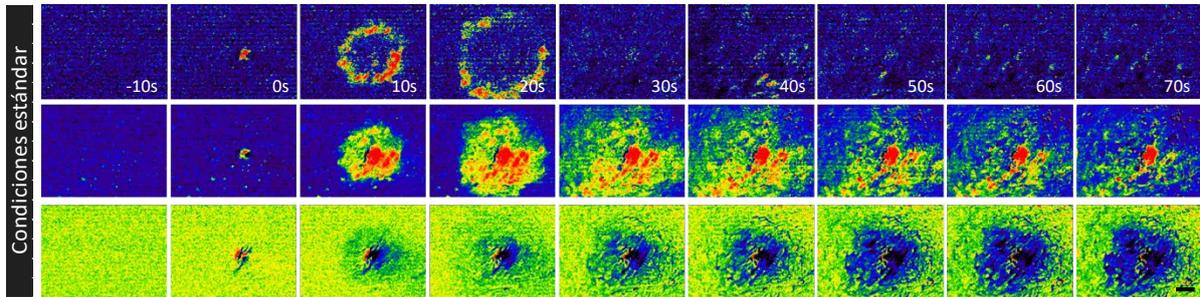


FIGURA SUPLEMENTARIA 1. Secuencia de imágenes antes (tiempo -10s), durante (tiempo 0s) y posteriormente a la estimulación mecánica (tiempo 0-70s) en condiciones estándar. La primera fila de 9 imágenes refleja el frente de onda obtenido con excitación a 380 nm (FURA-2) al restar el fotograma del tiempo indicado al fotograma anterior ($F_{x-1}-F_x$). La segunda fila muestra la secuencia normalizada de los cambios registrados con FURA-2 ($F_0/\Delta F$). La tercera fila los cambios de fluorescencia normalizados, con excitación a 470 nm, registrados con GAP3 ($\Delta F/F_0$). Barra de escala: 50 μ m.

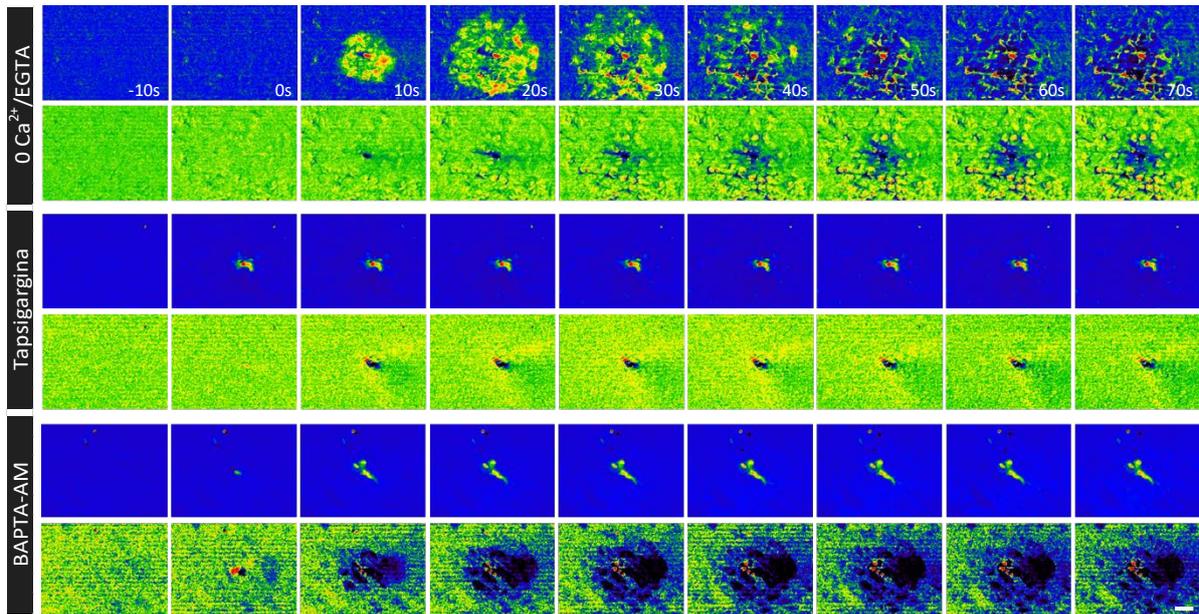


FIGURA SUPLEMENTARIA 2. Secuencia de imágenes antes (tiempo -10s), durante (tiempo 0s) y posteriormente a la estimulación mecánica (tiempo 0-70s) en $0Ca^{2+}/EGTA$, tapsigargina y BAPTA-AM. La primera fila de cada condición muestra la secuencia normalizada de los cambios registrados con FURA-2 ($F_0/\Delta F$). La segunda fila los cambios de fluorescencia normalizados, con excitación a 470 nm, registrados con GAP3 ($\Delta F/F_0$). La tercera fila muestra la secuencia normalizada de los cambios registrados con FURA-2 ($F_0/\Delta F$). Barra de escala: 50 μ m.

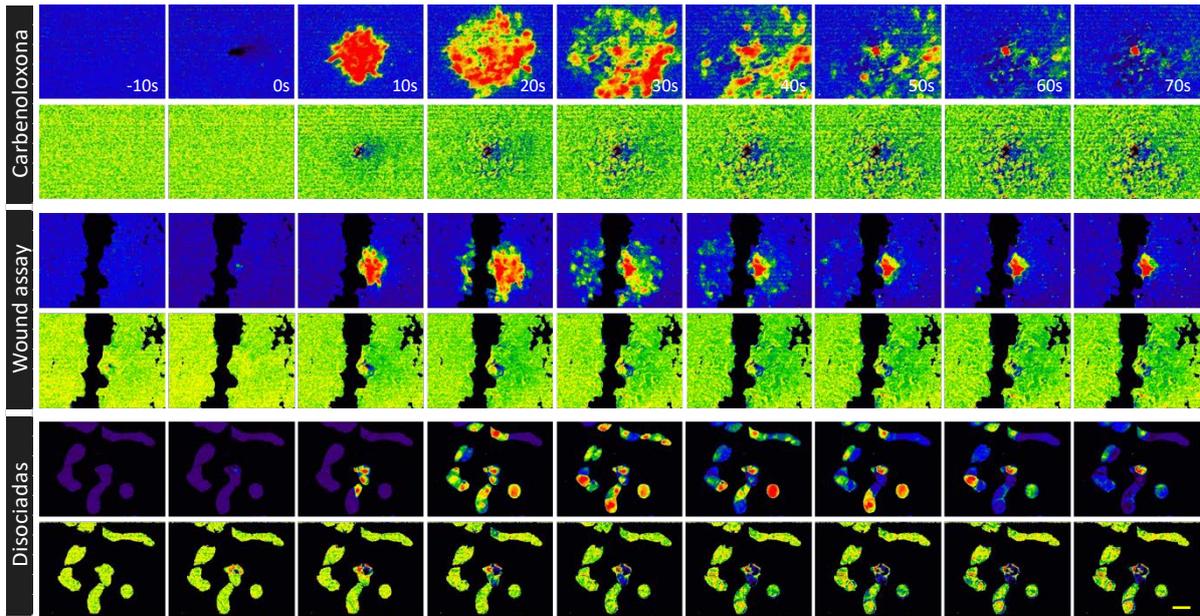


FIGURA SUPLEMENTARIA 3. Secuencia de imágenes antes (tiempo -10s), durante (tiempo 0s) y posteriormente a la estimulación mecánica (tiempo 0-70s) con carbenoxolona, tras rayado y en células disociadas. La primera fila de cada condición muestra la secuencia normalizada de los cambios registrados con FURA-2 ($F_0/\Delta F$). La segunda fila los cambios de fluorescencia normalizados, con excitación a 470 nm, registrados con GAP3 ($\Delta F/F_0$). Barra de escala: 50 μ m.

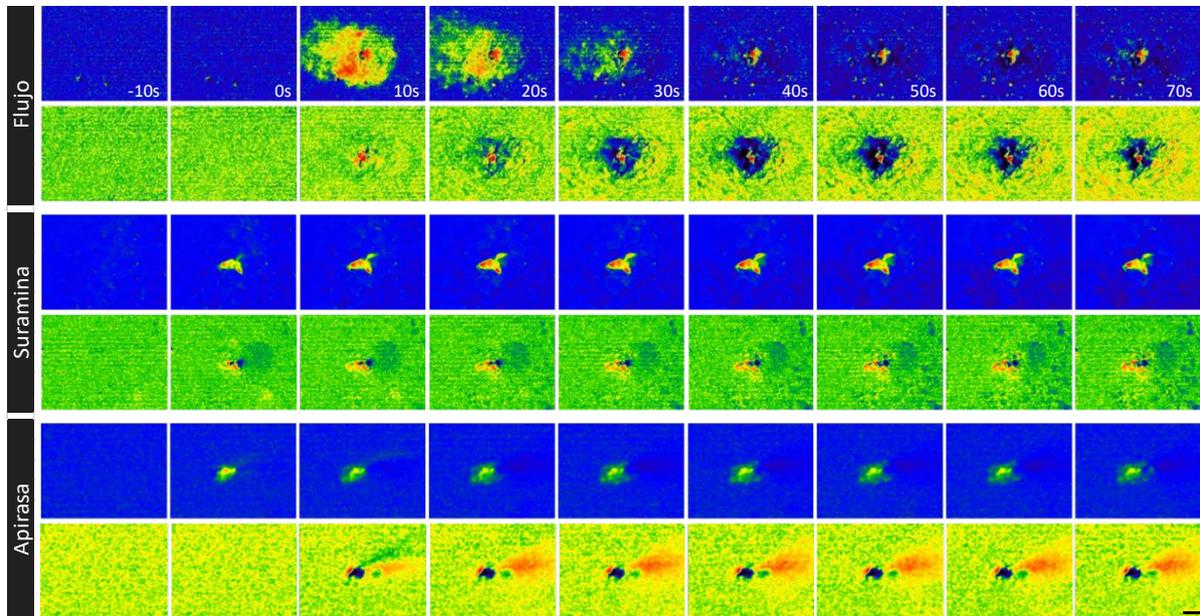


FIGURA SUPLEMENTARIA 4. Secuencia de imágenes antes (tiempo -10s), durante (tiempo 0s) y posteriormente a la estimulación mecánica (tiempo 0-70s) con flujo, suramina y apirasa. La primera fila de cada condición muestra la secuencia normalizada de los cambios registrados con FURA-2 ($F_0/\Delta F$). La segunda fila los cambios de fluorescencia normalizados, con excitación a 470 nm, registrados con GAP3 ($\Delta F/F_0$). Barra de escala: 50 μ m.

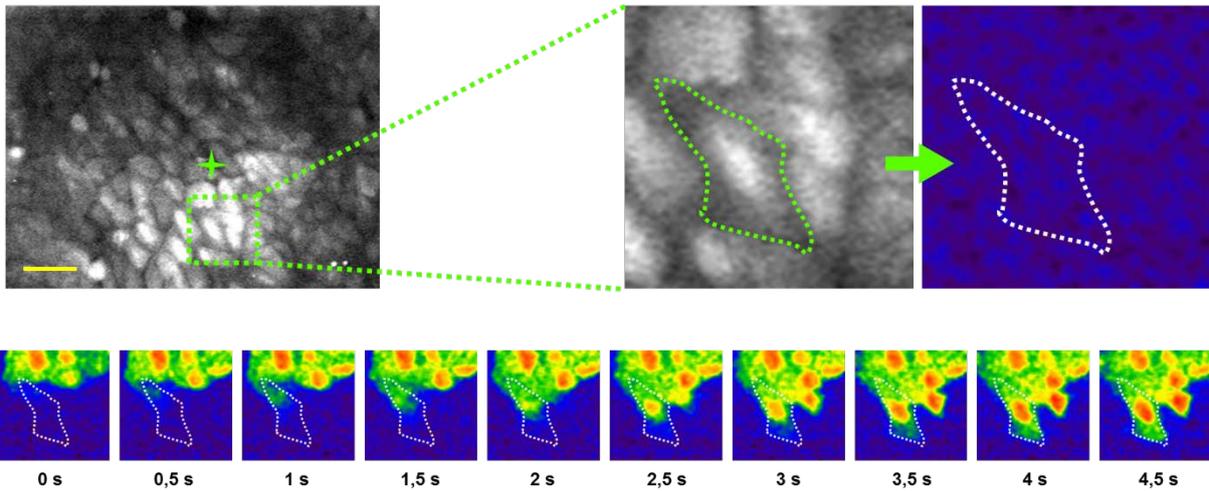


FIGURA SUPLEMENTARIA 5. Detalle de la progresión intracelular de la onda de calcio en una célula durante la OCI generada tras estímulo mecánico (estrella verde). En la parte superior fotografía del cultivo en monocapa al que se realiza la EM y a su derecha, ampliación de un sector en que se ha destacado el contorno de una célula. Inferiormente, secuencia de imágenes normalizada de los cambios registrados con FURA-2 ($F_0/\Delta F$) desde que se inicia un cambio en la fluorescencia dentro del ROI señalado (tiempo 0s) hasta su progresión a la totalidad de la célula 4,5s más tarde. Barra de escala: 50 μ m.

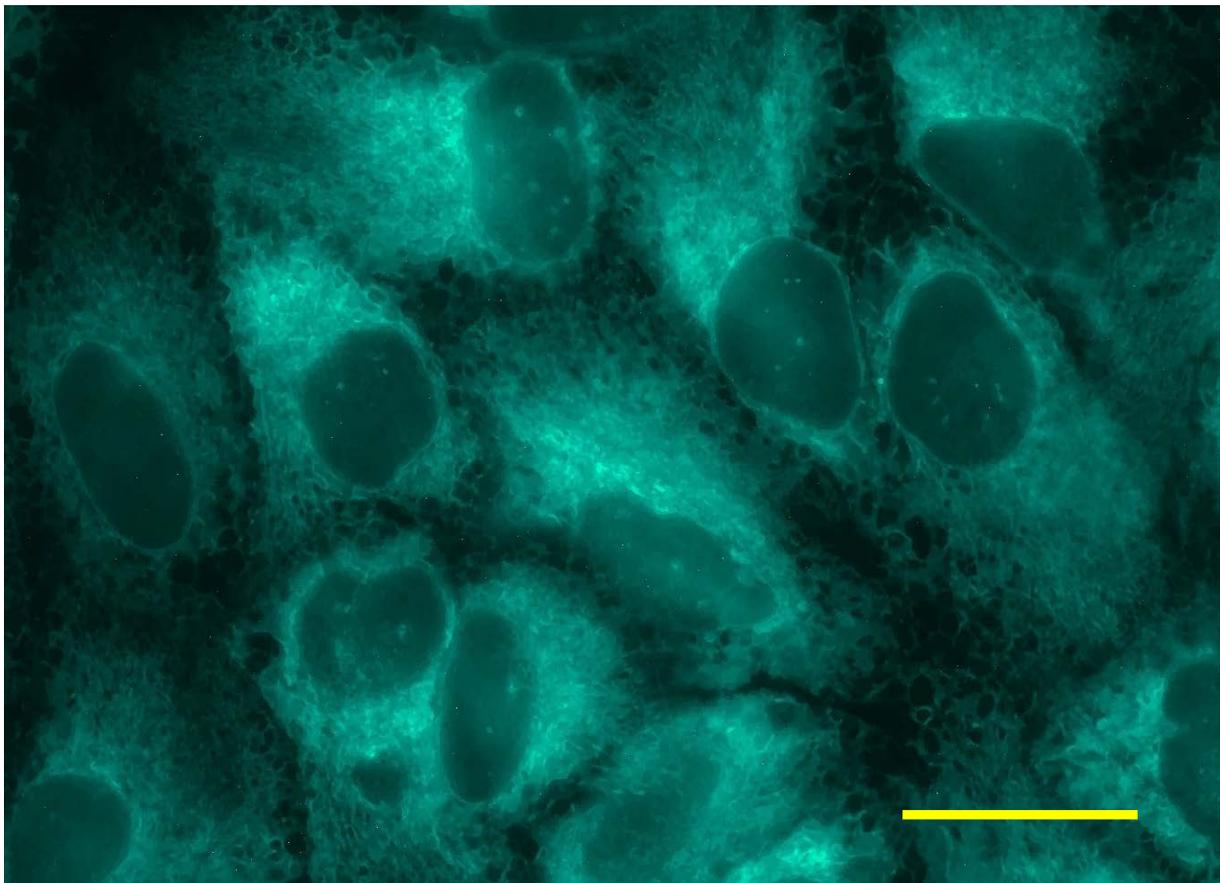


FIGURA SUPLEMENTARIA 6. Imagen de epifluorescencia del clon ARPE-19/erGAP3 con excitación a 470 nm en que se visualiza el patrón de distribución en cisternas característico del RE en células vivas. Barra de escala: 25 μ m.

