

**UNIVERSIDAD AUSTRAL**

**Facultad de Ciencias Biomédicas**



**NUEVOS REGULADORES MOLECULARES DE  
LAS BARRERAS OCULARES**

**Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas**

**Lic. María Iribarne**

**Directora: Dra. Angela M. Suburo**

**Pilar, Buenos Aires, 2009**

## Agradecimientos

Es preciso y oportuno expresar mi agradecimiento a mi Directora de Tesis la Dra. Angela M Suburo, quien con su ejemplo me enseñó el valor de la búsqueda de la excelencia, cimentado en el entusiasmo y el trabajo diario.

Son dignos de mención su entrega generosa, su amplitud de pensamiento, su constante esfuerzo en la transmisión de los conocimientos y el cuidado minucioso en nuestra formación científica; privilegios de los que he disfrutado por haberla tenido como guía en este camino de formación. Por todo esto es que quiero manifestarle una vez más mi gratitud.

Solo debo agregar que ha logrado infundir en mí las ansias por saber, conocer y dar respuestas, elementos distintivos de su persona, y del verdadero hombre de ciencia. Por mi parte, tenga plena confianza en que es mi empeño conquistarlas y mantenerlas a través del tiempo.

Hago extensivo mi reconocimiento a quienes formaron parte del trabajo cotidiano en su círculo más íntimo, estas palabras intentarán ser pequeñas pinceladas para que todos sin excluir a nadie puedan conocerles y rendirles su justo homenaje. Por eso digo:

*'A mis pares de investigación, flor y nata de la comunidad científica. Junto a quienes conocí el valor del Orden, las distracciones, esa loca vaguedad a la que somos tan propensos los jóvenes, no osan acercarse, ni siquiera vislumbrarse frente a mi Generala, Doña Soledad Coscorrones, eterna centinela, guardiana del rigor científico; con usted he cumplido.*

*Mauricio, yo lo conocí cuando Ud. era el Doc., antes de que fuese Enrique. Pero hoy ha llegado a ser, para alegría mía y de ustedes un hombre hecho y derecho, con auto y oficina.*

*Vanesa, 'joven' espigada, de espíritu elevado, una mente brillante. Capaz de dejar atónito a las mayores luces de nuestro tiempo, porque cada palabra que sale de su boca es un rayo que atraviesa los oídos. Ahora bien, me siento en la obligación de compartir con ustedes este secreto, retirar una máscara: 'para ella la ciencia no lo es todo'. Hay quienes afirman haberla visto, moviéndose como pez en el agua, en el mundo de las*

*finanzas, del plazo fijo a los euros, de los euros a los dólares... imposible seguirla. Sin embargo, tengo plena confianza de que honrara sus deudas y que no declarará un default de merengues.*

*Marisa, modelo de entrega y estoicismo, jamás sus labios pronunciaron ni la más leve queja, tanto fue así que llegamos a creer que era muda, no completamente, claro, sino, que sufría algún tipo de hechizo que impedía que formulase el más mínimo lamento o al menos un suspiro. ¡Pobreeeee...!.Sí, nos conmovió hasta las lágrimas. Pero el Destino dio su sentencia inapelable y la bautizó como Nuevita. Pero no está muerto quien pelea!!*

*Martincho, como ustedes sabrán, hay personas que se adelantan a sus tiempos y sólo más tarde venimos a reconocerlos como iluminados. Martincho pertenece a esta clase, él es el homo sapiens c57, el próximo eslabón.*

*Y cómo olvidar a Guillón, el dulce Guillón. Es importante que no olvides y aún menos lo dudes. Ellos no han muerto en vano, se han sacrificados o... los sacrifique. No hubo dolor o... nada que lo indique. Carpe Diem -vive el día - ser feliz hoy, el mañana es incierto. Ups ...no en este caso pero bueno.'*

Ahora sí ya pueden ustedes juzgar y convertirse a su vez en sus más fervientes admiradores. Más allá de esta pequeña remembranza jocosa. No quiero que esta ocasión pase sin decir que me siento profundamente orgullosa de todos y cada uno de ustedes, de haber sido su compañera y amiga durante todo este tiempo, y agregar que estoy persuadida de que harán grandes aportes a la ciencia. He aquí que me reconozco como su deudora. Ya que han hecho posible con su colaboración y apoyo que hoy este presentando mi tesis.

A su vez quiero expresar mi reconocimiento a todos los integrantes del laboratorio de investigación de la Facultad de Ciencias Biomédicas: a Beatriz Settembrini, Juan Gallo, Guillermo Mazzolini y Marcelo Villar, por su interés, apoyo y consejo; a Mariana Sgroi, Karina Julián, Florencia Coronel, Federico Luengo, Jorge Mancini, Emiliano López, Catalina Atorrasagasti, Laura, Mariana Malvicini y Jorge Aquino, por compartir

el trabajo diario, permitiendo el enriquecimiento mutuo, con la alegría y el entusiasmo propios de la amistad.

Además quiero agradecer a todos los integrantes de la cátedra Medicina Molecular y Celular, especialmente hago mención a Alejandro Berra, Eduardo Sandés, Florencia Ferrer, Matías Portella y José Lama Cortez, por su cariño y confianza.

Asimismo quiero manifestar el debido reconocimiento a todas las personas que forman parte de esta querida facultad que me han acompañado durante todo este tiempo dando muestras reiteradas de su buena disposición y profesionalismo. A todos Uds. que con su trato han hecho amena esta vida académica. En especial a Lili Díaz y David Merlo.

Por último me he reservado estas líneas para agradecer a mi familia, por su permanente apoyo espiritual, sin el cual no es posible desarrollarse profesionalmente. Por su constante respaldo fundamentado en el amor sin condicionamientos, propio de los lazos indisolubles de la familia. Estas pocas líneas no bastan, ningún medio del cual se valga la comunicación formal son suficientes para expresar mi cariño y reconocimiento. Aun así, y de todas maneras quiero hacer público que: forman parte de este logro, y comparto con ellos “la alegría propia del trabajo realizado”.

Ellos han sido para mí una fuente inagotable de estímulo, confianza y cariño. Mi especial agradecimiento a mamá que supo despertar en mí la inquietud intelectual y el amor por el conocimiento. Por estar siempre presente en sus oraciones, especialmente cada vez que enviamos un paper, toda vez que renovaba la beca, que quería ir a un congreso, por suerte no llevo la cuenta sino estaría embargada de por vida! El resto dese por saludado, hago la excepción con Lolita que es la más chiquita, bueno no se quejen grandulones... está bien, los nombro: Tuti, Estebita... digo, Esteban y Maichu. Y en último término, a Joaquín, eximio cebador de mates y tereré, especialidad, esta última, recientemente adquirida.

Es mi deseo sumar a ellos, ya que es lo que dictan mis afectos a Clarita y a su familia quienes supieron hacerme sentir y formar parte de la suya. Por sus mimos, paciencia y alegría; a Vito, Pipi y Yamila.

Este agradecimiento se esta tornando largo pero aun me encuentro en la necesidad de agregar unas líneas. No quiero abusar de su paciencia sin embargo mis AMIGOS merecen una pagina aparte. A requisitoria de ellos, claro está. Todo sucedió cuando tuve la brillante idea de pedir su opinion. La respuesta neta y tajante fue: Y...**NOSOTROS!**"#\$%&. Por esto es que les suplico me permitan lo que sigue. Los exhorto a mantener su interés. Ya que conocerán a ilustres hombres y mujeres de Ciencias, de esta generosa patria nuestra.

Vero cuyo ingenio y gracia no tiene par. Es dura la tarea que me has impuesto, pero vamos a hacerle frente. El hecho de que sea bióloga y de estar a un paso de ser doctora se debe, cierto es, a que tus brillantes, exactos y completos resúmenes, tu palabra certera y tu latín maravilloso. Sí, todo te lo debo a vos, mi más sentido agradecimiento. Ya que sos aquella de quien se dice que vio la verdadera luz del conocimiento y tuvo la grandeza de espíritu y el valor de volver a la caverna y enseñárnosla. No nada es demasiado a la hora de elogiar tan excelsa alma. Quizás alguna vez abriste una caja de Petri en un momento equivocado, un detalle pero que es esto frente a la abundancia de aciertos.

A Pipi aquella que supo abandonar la densa selva chaqueña, donde se internaba solo para escudriñar a familias enteras de monos, que hacían y que dejaban de hacer, una Doña Rosa cualquiera. Por suerte descubrió que la discreción es una virtud y que todos tenemos el derecho a la intimidad, incluso los monos. Y esto es seguramente lo que la llevo a interesarse por la vida reposada de las plantas, placida existencia. En compensación a aquel espíritu aventurero se apasiona con la música, especialmente por el chelo.

A Carito, científica de elite, integrante del Laboratorio del Desierto, posición que solo pudo lograr luego de un exhaustivo entrenamiento en rock, folklore y otras danzas. A quienes dicen que no admite a entusiastas principiantes patas duras, pero yo doy fe de que eso es solo un infundio.

A Maru, maestra de alma, que supo claramente ilustrar en imagen especular, aquellos largos textos que no comprendíamos.

A Gerito, que sabe combinar sabiamente la filosofía y mitología, las exactas premisas de la biología. Quien reina en el dulce mundo de las abejas, larga vida al Rey!

A Juancito y Pablito quienes se aseguraron de mantenernos unidos en aquellas democráticas y divertidas peñas.

A Jimenita, que ingenua e involuntariamente supo hacerme reír.

A Fer que se sumo en los últimos años pero supo serme memorable como los demás...Quien me sometió a unas sesiones de los mas perturbadoras.

Por último a July, digna hija del Rey Salomón, por sus sabios juicios como por su riqueza, esta ciertamente es de tal magnitud, que admira y asombra a todo aquel que se atreva a avizorarla.

Bueno en fin a mis buenos amigos con quienes hemos compartido tantos momentos y ya largos años de una amistad profunda y sincera.

Esta tesis se pudo desarrollar gracias al apoyo económico de las siguientes instituciones,

*Universidad Austral*

*CONICET*

*Fundación FUSAVI*

*Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica*

*Fundación Roemmers*

*“ Todos los hombres desean por naturaleza saber. Así lo indica el amor a los sentidos, que son amados por sí mismos al margen de su utilidad; y el más amado de todos los sentidos es el sentido de la vista. En efecto, no sólo para obrar, sino también para el ocio, preferimos el sentido de la vista a todos los otros sentidos. Y el motivo es que el sentido de la vista es el que nos hace conocer más. ”*

*Aristóteles, Metafísica A, 980a*

## RESUMEN

El ojo está separado del medio ambiente y del medio interno por interfases que constituyen las barreras oculares. En esta tesis estudiamos los mecanismos de mantenimiento de las mismas, incluidas la barrera de la superficie ocular y las barreras hemato-retinales. Muchos procesos patológicos oculares se asocian a alteraciones de estas barreras. Aquí solo describimos sumariamente los principales descubrimientos realizados sobre el papel de ligandos y receptores acoplados a proteínas G (GPCR) en las mencionadas barreras.

Al estudiar el epitelio de la conjuntiva, que es el componente mayoritario de la superficie ocular, mostramos la presencia de los receptores canabinoides CB1 y CB2, que no habían sido previamente descritos. Detectamos ambos receptores en el epitelio de la conjuntiva murina y humana, tanto en biopsias como en una línea celular (IOBA-NHC). La funcionalidad de dichos receptores quedó en evidencia por medio de distintos ensayos en estos cultivos. La incubación de las células en presencia de canabinoides mostró la reducción de los niveles intracelulares de AMPc y un incremento en el número de células. Los experimentos con inhibidores específicos demostraron la participación de ambos receptores. La activación de las vías de estrés p-JNK y NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  pudo ser prevenida por la estimulación de los receptores canabinoides. Postulamos que los canabinoides en la conjuntiva podrían regular los procesos de proliferación, diferenciación e inflamación en la superficie ocular.

El epitelio pigmentario retinal (EPR) constituye la barrera hemato-retinal externa que es afectada durante el desprendimiento de la retina (DR). Se demostró que la adhesión entre retina neural y EPR dependía de la historia lumínica del animal y el momento del día. Estos fenómenos también regulan la supervivencia de las células del EPR desprendido. Pudimos reproducir estos fenómenos mediante melatonina, siendo esta la primera demostración de una acción de esta neurohormona sobre la adhesividad retina/EPR.

Una de las consecuencias del DR es la proliferación vitreoretinal (PVR). Utilizando un modelo experimental desarrollado en nuestro laboratorio demostramos la activación del sistema endotelinérgico en la retina durante la PVR. Tanto durante la primera fase de

modificación fenotípica de la glia, como durante la formación de las membranas fibrosas. Estos últimos resultados fueron verificados en membranas de PVR humanas. Por otra parte, en el modelo animal, descubrimos que el empleo de un antagonista de los receptores endotelinérgicos bloquea la transformación astrocitaria que inicia las lesiones PVR, reduce la activación de otras células gliales e impide la formación de membranas epirretinales.

Estudiamos la relación entre el eje endotelinérgico y la permeabilidad de la barrera hemato-retinal interna, que está afectada en las lesiones uveíticas. En el modelo de uveítis inducida por endotoxina (UIE), el bloqueo de los receptores endotelinérgicos redujo la permeabilidad de la barrera, la reacción astrocitaria y la activación de vías intracelulares de estrés (p-JNK, p-c-Jun y NF- $\kappa$ B).

## **ABSTRACT**

The eye is separated from the environment and the internal milieu by tissular and cellular specializations known as ocular barriers. In this thesis we have studied several mechanisms involved in the maintenance of these barriers, since several pathological processes of the eye involve their alteration or even their rupture. Here we summarize our main discoveries about the role of ligands and G-protein coupled receptors in the anterior surface barrier and the two hemo-retinal barriers.

At the conjunctival epithelium, a main component of the anterior surface barrier, we discovered the presence of cannabinoid receptors CB1 and CB2. They were detected both in human and mice conjunctival cells. Since they were also present in a human conjunctiva-derived cell line (IOBA-NHC) we used these cultures to demonstrate functional aspects of CB1 and CB2. Incubation in the presence of specific ligands showed a reduction of cAMP intracellular levels and an increase in cell numbers. Specific inhibitors further showed that both receptors were involved. TNF- $\alpha$ -induced activation of intracellular stress pathways (p-JNK, p-c-Jun and NF- $\kappa$ B) was prevented by specific stimulation of cannabinoid receptors. We postulated that conjunctival cannabinoids would regulate proliferation, differentiation and inflammation at the ocular surface.

The retinal pigment epithelium (RPE) forms the outer hemo-retinal barrier. This is seriously damaged after retinal detachments. We have shown that adhesion between neural retina depended on light history of the animal and time of day. These parameters were also involved in survival of detached RPE cells. Most importantly, we were able to show that these phenomena could be reproduced by melatonin, demonstrating that adhesion between neural retina and RPE is controlled by this neurohormone.

Proliferative vitreoretinopathy (PVR) can be a consequence of DRs. Using a mouse model previously developed in our laboratory, we showed that growth of PVR membranes is associated to hyperexpression of endothelinergic molecules. Increases of endothelin and its receptor ETR-B were evidenced during the initial phases of glial phenotypical modification and also during the appearance of fibrous membranes. The

latter were also shown in human PVR membranes. An antagonist of endothelinergic receptors blocked development of experimental PVR lesions.

Finally, we studied the relationship between the endothelinergic system and the permeability of the inner hemo-retinal barrier, affected in the course of uveitis. In the endotoxin-induced model of mouse uveitis we demonstrated that blockade of endothelinergic receptors reduced pathologic permeability of this barrier, glial reactivity and activation of intracellular stress pathways (p-JNK, p-c-Jun y NF- $\kappa$ B).

# INDICE

<b>1.</b>	<b>Introducción</b>	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b>Barreras oculares</b>	<b>18</b>
1.1.1	Barrera de la superficie ocular anterior	19
1.1.2	Barreras hemato-retinales	22
1.1.3	Pérdida de la barrera hemato-retinal	27
<b>1.2</b>	<b>Receptores acoplados a proteínas G</b>	<b>31</b>
1.2.1	Sistema endocanabinoide	32
1.2.2	Melatonina y dopamina en el reloj circadiano	36
1.2.3	Sistema endotelinérgico	39
<b>1.3</b>	<b>Objetivos generales de esta tesis</b>	<b>45</b>
<b>2.</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>47</b>
<b>2.1</b>	<b>Métodos generales</b>	<b>47</b>
2.1.1	Obtención de muestras	47
2.1.2	Caracterización inmunohistoquímica	47
2.1.3	Detección de proteínas por Western blot	49
2.1.4	RT-PCR	53
<b>2.2</b>	<b>Métodos para la superficie ocular</b>	<b>54</b>
2.2.1	Obtención de las muestras	54
2.2.2	Detección de los receptores canabinoides	55
2.2.3	Agonistas y antagonistas de los CB	56
2.2.4	Determinación de AMPc	56
2.2.5	Ensayos de viabilidad celular	57
2.2.6	Activación de las vías de señalización	58
<b>2.3</b>	<b>Métodos para el estudio del EPR</b>	<b>59</b>
2.3.1	Tramamiento de los animales	59
2.3.2	Desprendimiento de retina	59
2.3.3	Histoquímica de lectinas	61
<b>2.4</b>	<b>Métodos para el estudio de la PVR</b>	<b>62</b>
2.4.1	Modelos experimentales de PVR y DR	62
2.4.2	Muestras de membranas de PVR humanas	63
2.4.3	Evaluación cuantitativa de la PVR murina	63
2.4.4	Análisis de GFAP por Western Blot	63
<b>2.5</b>	<b>Métodos para el estudio de Uveítis</b>	<b>64</b>
2.5.1	Inducción de UIE y tratamiento farmacológico	64
2.5.2	Ensayos de permeabilidad de la BHR	64
<b>3.</b>	<b>Receptores canabinoides en el epitelio de la conjuntiva</b>	<b>65</b>
<b>3.1</b>	<b>Introducción y objetivos específicos</b>	<b>65</b>
<b>3.2</b>	<b>Resultados</b>	<b>68</b>
3.2.1	Superficie ocular del ratón	68
3.2.2	CB1 y CB2 en la conjuntiva humana	68
3.2.3	AMPc y ligandos canabinoides	69
3.2.4	Canabinoides y crecimiento de los cultivos	70
3.2.5	Canabinoides y marcadores de estrés	71

<b>3.3</b>	<b>Discusión</b>	<b>73</b>
3.3.1	CB1 y CB2 en el epitelio de la conjuntiva	73
3.3.2	Respuestas funcionales	74
3.3.3	Bloqueo de las cascadas de estrés por la ativación de CB1 y CB2	75
<b>4.</b>	<b>Melatonina y relaciones retina-EPR</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>Introducción y objetivos específicos</b>	<b>77</b>
<b>4.2</b>	<b>Resultados</b>	<b>80</b>
4.2.1	Separación Ex Vivo de la Retina y EPR	80
4.2.2	Efecto de la melatonina	81
4.2.3	Sobrevida de las células EPR in vitro	82
4.2.4	Desprendimiento retinal in vivo	83
4.2.5	Análisis de la matriz interfotorreceptora (IPM)	83
<b>4.3</b>	<b>Discusión</b>	<b>85</b>
4.3.1	EL EPR según los antecedentes lumínicos	85
4.3.2	La fase nocturna y la adaptación a la oscuridad son reproducidos por melatonina	87
4.3.3	Modificaciones de la matriz interfotorreceptora inducidas por las condiciones de luz y melatonina	88
<b>5.</b>	<b>El sistema endotelinérgico en la proliferacion vitreoretinal</b>	<b>89</b>
<b>5.1</b>	<b>Introducción y objetivos específicos</b>	<b>89</b>
<b>5.2</b>	<b>Resultados</b>	<b>92</b>
5.2.1	Curso de la PVR experimental	92
5.2.2	Muestras Humanas	93
5.2.3	Bloqueo de los receptores endotelinérgicos	94
5.2.4	ET-1 y ETR-B en la PVR y DR tempranos	96
<b>5.3</b>	<b>Discusión</b>	<b>98</b>
5.3.1	Moléculas endotelinérgicas y PVR	98
5.3.2	Modelo explicativo de la participación endotelinérgica en el plegamiento retinal y el crecimiento de las membranas	99
5.3.3	Fenotipos endotelinérgicos en las membranas epi- y subretinales	100
<b>6.</b>	<b>Sistema endotelinérgico y uveítis</b>	<b>102</b>
<b>6.1</b>	<b>Introducción y objetivos específicos</b>	<b>102</b>
<b>6.2</b>	<b>Resultados</b>	<b>105</b>
6.2.1	Características de la UIE	105
6.2.2	Efectos del tezosentan	106
<b>6.3</b>	<b>Discusión</b>	<b>108</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusiones generales</b>	<b>112</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>116</b>

# 1.Introducción

## 1.1 Barreras oculares

Las barreras oculares aparecen a nivel de las interfases tisulares o aéreas que delimitan distintos dominios o compartimientos funcionales del ojo. Fisiológicamente, se reconoce la existencia de una barrera cuando no existe libre difusión de solutos entre un compartimiento y el otro. Esta restricción a los intercambios es particularmente pronunciada en el sistema nervioso central y en el ojo. Aunque el concepto de barreras hemato-encefálicas se originó en la primera década del siglo XX, la existencia de barreras hemato-oculares sólo se clarificó en la segunda mitad de dicho siglo (Cunha-Vaz, 1978; Cunha-Vaz, 2004).

La localización anatómica de las barreras hemato-oculares fue descrita inicialmente mediante la detección electronmicroscópica de la plata depositada en esas barreras después de su ingestión crónica (Wislocki and Ladman, 1955). En el ojo, la plata se acumula principalmente en las membranas basales de los procesos ciliares y en la membrana basal de Bruch, entre el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la capa coriocapilar de la coroides. En menor cantidad, también se encuentran depósitos de plata en los capilares de la retina. En 1965 se demostró que la histamina aumentaba marcadamente la permeabilidad vascular de varios tejidos oculares excepto los de la retina (Ashton and Cunha-Vaz, 1965). Otros experimentos demostraron la impermeabilidad de los vasos retinianos a la fluoresceína (Bellhorn, 1980).

La permeabilidad de las barreras hemato-oculares se analizó más detalladamente mediante la inyección intravenosa de fragmentos activos de peroxidasa de rábano de distinto tamaño molecular (Smith and Rudt, 1975). En la barrera hemato-ciliar, las partículas de peroxidasa quedan detenidas por las uniones ocluyentes de las células epiteliales no pigmentadas del cuerpo ciliar (CENP). En la barrera hemato-retinal externa, las partículas son igualmente detenidas por las uniones ocluyentes del EPR. En ambos casos, las partículas de peroxidasa se acumulan, como lo hacía la plata, en las correspondientes membranas basales. La peroxidasa tampoco atraviesa la pared de los

vasos intraretinales (barrera hemato-retinal interna), ya que también es detenida por las uniones ocluyentes del endotelio.

Unos años después se reconoció que los epitelios de la superficie ocular también actúan como barreras que mantienen la homeostasis de fluido y solutos entre el medio interno ocular y la película fluida lagrimal que recubre la superficie (Huang et al., 1990). Cabe mencionar que las superficies libres de la capa escleral están revestidas por los epitelios conjuntival y córnea. Ambos epitelios contribuyen al mantenimiento de la película lagrimal y, mediante las uniones entre sus células basales, regulan el intercambio de solutos con el medio interno del ojo. Así, las lesiones del epitelio de la superficie ocular anterior multiplican el ingreso de fluoresceína hacia la cámara anterior del ojo en unas 50 veces o más (Fujihara et al., 2001).

Las barreras superficiales y las hemato-retinales son los puntos críticos que regulan el acceso de xenobióticos a los tejidos oculares. Los primeros restringen la absorción de drogas desde los fluidos lacrimales hacia la cámara anterior, mientras que las barreras hemato-retinales restringen la entrada de drogas desde la circulación sistémica hacia el segmento posterior. Sí bien existen barreras que controlan la composición del humor acuoso, estas no fueron estudiadas en esta Tesis.

## **1.1.1 Barrera de la superficie ocular anterior**

### **1.1.1.1 Estructura anatómica**

La túnica fibrosa forma una cápsula exterior protectora, que rodea totalmente los demás componentes del globo ocular. La túnica fibrosa se divide en una parte anterior denominada córnea y una posterior denominada esclerótica, unidas por una zona de transición, el limbo esclerocorneal. La esclerótica posee como principales funciones la protección y estructura, mientras que la córnea es importante para las funciones ópticas. A su vez, las superficies libres del globo ocular están revestidas por los epitelios de la córnea, el limbo y la conjuntiva. El epitelio conjuntival se extiende desde el limbo hasta la unión mucocutánea de las márgenes palpebrales, donde se une con la epidermis queratinizada. La unión mucocutánea es inmediatamente posterior a los conductos de las glándulas de Meibomio (Liu et al., 2007). Topográficamente, el epitelio de la

conjuntiva puede ser dividido en tres regiones: bulbar, que es contigua a la zona limbocorneal y cubre el globo ocular; palpebral, que recubre la parte interna del párpado, y fórnix, que se ubica en el fondo de saco limitado por las dos anteriores.

### **1.1.1.2 Epitelios de la superficie ocular**

Los epitelios de la superficie ocular cumplen múltiples funciones. Son responsables de la elaboración de la película lacrimal, que es importante para mantener una visión clara y también sirve como protección mecánica y antimicrobiana. Al igual que las células epiteliales de otras mucosas (respiratoria, intestinal) participan activamente en los procesos inflamatorios, tanto por expresión de moléculas de adhesión y coestimuladoras, como por la secreción de diferentes citoquinas (Hausmann and Rogler, 2008).

La conjuntiva está formada por un epitelio y un estroma. El epitelio conjuntival es estratificado con células caliciformes. Sus células más superficiales presentan uniones ocluyentes que le otorgan características de barrera. El estroma posee una extensa red sanguínea y linfática, y es uno de los integrantes del sistema linfático asociado a mucosas.

Los linajes celulares epiteliales de la superficie ocular comparten algunas características básicas con la epidermis. Todos presentan un fenotipo estratificado donde solo el estrato basal retiene la capacidad proliferativa. Además, en los tres epitelios, las células que inician su diferenciación expresan el par de citoqueratinas universal de epitelio estratificado K5 y K14. Durante las etapas finales de la diferenciación en la epidermis, las células adquieren las citoqueratinas K1 y K10 (Watsky et al., 1988). En la conjuntiva, K10 aparece en las capas basal y epibasal, y K19 se expresa en las células suprabasales y apicales. En las células más diferenciadas predomina el par K13/K4, a diferencia de la córnea donde predominan el K3/K12 (Rosellini et al., 2007; Wolosin et al., 2004).

Mientras que la córnea posee un único fenotipo, la conjuntiva es un mosaico integrado por dos linajes celulares: las células del epitelio estratificado, similares a las corneales, y las células caliciformes, que secretan mucinas.

El epitelio conjuntival es como un mosaico, con las células caliciformes esparcidas entre las estratificadas de revestimiento. Ambas probablemente derivan de un progenitor común. Estos progenitores se encuentran en todas las regiones del epitelio conjuntival, aunque parecen ser más numerosos en la región del fórnix y en la unión mucocutánea (Chen et al., 2003b; Revoltella et al., 2007).

### **1.1.1.3 Película lacrimal**

Las mucinas constituyen un grupo de unas 20 glucoproteínas de alto peso molecular con secuencias repetidas ricas en serina y treonina que sirven como sitios para la o-glucosilación. Las mucinas pueden ser secretadas o asociadas a las membranas. Ambas se encuentran en los epitelios asociados a las mucosas. Las mucinas secretadas son producidas por las células caliciformes, mientras que las asociadas a membranas son componentes del glucocálix epitelial (Gipson, 2004). Los epitelios estratificados de la superficie ocular expresan mucinas del tipo MUC1, 4 y 16 (Hilkens et al., 1992). Las mucinas asociadas a membranas constituyen un componente esencial de las barreras contra virus y microorganismos (Stonebraker et al., 2004). En el humano, MUC1 y 16 están presentes tanto en la córnea como en la conjuntiva, mientras que MUC4 se expresa selectivamente en la conjuntiva (Hori et al., 2004). Las células caliciformes son glándulas unicelulares intercaladas entre las células del epitelio estratificado y son fácilmente reconocidas por las vesículas que acumulan en su cara apical. Sus marcadores específicos son la citoqueratina 7 y la mucina MUC5AC. Son más numerosas en la conjuntiva palpebral que en la conjuntiva bulbar. Las mucinas que producen son esenciales para mantener la estabilidad de la película lacrimal y la homeostasis de la superficie ocular (Shatos et al., 2003).

En la superficie ocular las mucinas se ubican en la película lacrimal adyacente y en el glucocálix de la superficie apical de las células. Pueden retener una gran cantidad de agua debido a su carácter hidrofílico, y previenen así la desecación de la superficie ocular. También funcionan como lubricantes para el pestañeo, ayudan a formar una superficie lisa refractiva y proporcionan una barrera que impide la penetración de patógenos (Hori et al., 2004).

Además de las células caliciformes, otras glándulas contribuyen con su secreción para conformar la película lacrimal: glándulas lacrimales principales y accesorias, y glándulas de Meibomio. Cada una aporta componentes específicos. Los lípidos derivan primariamente de las glándulas de Meibomio, el fluido acuoso deriva de las glándulas lacrimales y las mucinas derivan principalmente de las células caliciformes. Los frecuentes pestañeos ayudan a que las lágrimas cubran toda la superficie ocular y a su drenaje en el sistema nasolacrimal.

## **1.1.2 Barreras hemato-retinales**

Existen dos barreras hemato-retinales (BHR). La externa, localizada a nivel del epitelio pigmentario retinal (EPR), regula el intercambio entre los vasos de la coriocapilaris y el espacio interfotorreceptor. La interna, localizada en el endotelio de los vasos sanguíneos intrarretinales, controla los intercambios entre la circulación y las células de las distintas capas de la retina. Para comprender la función de cada una de estas barreras es necesario explicar previamente la circulación sanguínea en la retina.

### **1.1.2.1 Circulación en la retina**

La retina presenta una doble circulación, los vasos retinales irrigan la región interna de la retina, mientras que la región externa es avascular y está supeditada a la circulación coroidea (Figura 1.1). La circulación interna de la retina depende de ramificaciones de la arteria central de la retina, mientras que la circulación de la coroides depende de las arterias ciliares posteriores. Estas últimas también irrigan la cabeza del nervio óptico. Tanto la arteria central de la retina como las arterias ciliares son ramas de la arteria oftálmica, rama de la carótida interna. Cada sistema posee estructura y propiedades funcionales características.

Los vasos ciliares posteriores cortos irrigan la mitad posterior del globo ocular y originan la circulación coroidea. Se denomina coriocapilaris al lecho capilar más interno de la coroides, adosado a la membrana de Bruch. El endotelio de estos capilares solo presenta fenestras en la cara adosada a la membrana de Bruch, es decir, la más próxima al EPR. La coriocapilaris es responsable de la nutrición retinal, desde el EPR hasta la capa nuclear interna (CNI). Esta región externa de la retina, que en los primates incluye

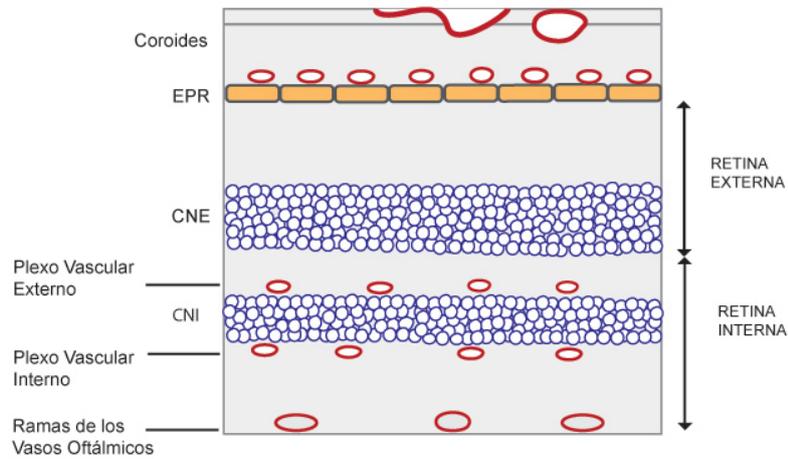


Figura 1.1. Nutrición dual de la retina. El esquema muestra todo el espesor de la retina y la coroides. La retina externa depende de la difusión de nutrientes y oxígeno desde la coriocapilaris. La nutrición de la región interna de la retina depende de los vasos oftálmicos, que dentro de la retina se subdividen en los plexos capilares internos y externos. CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna.

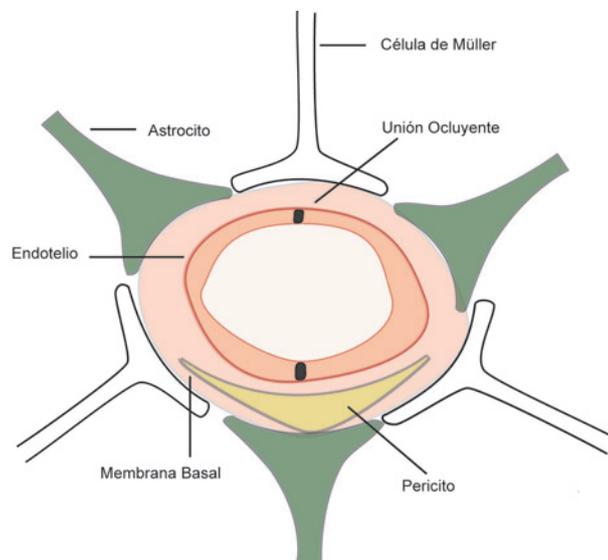


Figura 1.2. Esquema de la barrera hemato-retinal interna que muestra el endotelio vascular y las uniones ocluyentes que sellan el espacio intercelular. La membrana basal rodea el endotelio e incluye a los pericitos. Las prolongaciones de los astrocitos y las células de Müller rodean a los vasos.

la fovea, es avascular. Su nutrición está asegurada por un gran flujo sanguíneo coriocapilar (aproximadamente 1400 ml/100 g por minuto), con poca extracción de oxígeno (< 1 vol %). La magnitud de este flujo sanguíneo es posible gracias al diámetro de los capilares corioideos (por lo menos 10 µm) y su distribución en circuitos paralelos, que reduce la resistencia del circuito (An and Wang, 2008; Aristodemou and Stanford, 2006).

La arteria central ingresa a la retina junto con el nervio óptico, y se divide en 4 a 6 ramas. Estas ramas primarias originan a su vez ramas secundarias que ingresan a las capas más internas de la retina en forma perpendicular. En el hombre y los primates, los vasos forman tres lechos capilares paralelos a la superficie de la retina. Un lecho capilar a nivel de la capa de fibras del nervio óptico (NO) y la capa de células ganglionares (CCG), y los dos plexos interno y externo, que siguen los bordes interno y externo de la CNI. Las células endoteliales, selladas por uniones ocluyentes, y los pericitos intramurales se encuentran rodeados por una membrana basal (Figura 1.2). La circulación retinal interna se asemeja a la circulación cerebral, el flujo sanguíneo es menor que en la coriocapilaris, la extracción de oxígeno es muy alta y, el endotelio no es fenestrado.

### **1.1.2.2 Barrera hemato-retinal externa**

El EPR forma la capa más externa de la retina y se extiende desde la periferia de la papila del nervio óptico hasta la ora serrata, donde se continúa con el epitelio ciliar pigmentado. Tiene una única capa de células cúbicas, unidas entre sí por uniones ocluyentes y comunicantes. Las uniones ocluyentes entre las células del EPR constituyen la barrera hemato-retinal externa (BHRE), dado que el endotelio de la coriocapilaris es fenestrado. Las mismas uniones ocluyentes definen además el dominio baso-lateral y el dominio apical de las células EPR. El primero está en contacto con la membrana basal de Bruch que, a su vez, está adosada a la cara interna de la coriocapilaris. Por su parte, el dominio apical se encuentra en contacto con el espacio interfotorreceptor, que contiene una matriz rica en glucosaminoglucanos, glucoproteínas y glucoconjugados. Esta matriz interfotorreceptora (interphotoreceptor matrix, IMP) sirve de puente entre los segmentos externos de los fotorreceptores y el EPR (Hollyfield et al., 1989).

El dominio apical posee microvellosidades, de hasta 7  $\mu\text{m}$  de largo, que se extienden entre los segmentos externos de los fotorreceptores. Las microvellosidades, que poseen actividad fagocitaria, participan en la renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores. El fagosoma progresa hacia el interior del citoplasma, degradando progresivamente su contenido (Strauss, 2005).

Recientemente se demostró que el EPR podría controlar la organización espacial de la retina. Al cocultivar neuronas sobre células del EPR se logró la adhesión de los fotorreceptores por su superficie apical y su mejor desarrollo, incluso con mayor síntesis de rodopsina. Al realizar el ensayo en sentido contrario, con el EPR sobre las neuronas, el primero desplazaba los fotorreceptores del sustrato, posicionándose por debajo de los mismos (German et al., 2008).

El EPR mejora las condiciones ópticas de la capa fotorreceptora por medio de la presencia de gránulos de melanina, o melanosomas, que absorben la luz. Los melanosomas son abundantes en las cepas de ratones pigmentados. Las cepas albinas presentan melanosomas no pigmentados o premelanosomas (Schraermeyer and Heimann, 1999). Sus células poseen numerosas mitocondrias, que reflejan el alto metabolismo de este epitelio (Marmorstein, 2001).

### **1.1.2.3 Barrera hemato-retinal interna**

Esta barrera depende de las uniones ocluyentes entre las células endoteliales de los capilares intrarretinianos. Al igual que en el cerebro, la barrera hemato-retinal interna (BHRI) se caracteriza por una estrecha relación con los astrocitos y las células de Müller (Figura 1.2). Inicialmente se consideraba que los astrocitos formaban parte física de la barrera, pero los estudios de Reese y Karnovsky (Reese and Karnovsky, 1967) demostraron que las moléculas de peroxidasa de rábano picante se acumulan a nivel de las uniones ocluyentes de las células endoteliales. En el experimento inverso, donde la peroxidasa era inyectada en el parénquima, la macromolécula difundía hasta la superficie abluminal del endotelio, confirmando que los astrocitos no contribuyen físicamente a la barrera (Brightman and Reese, 1969).

Las uniones ocluyentes actúan como barrera física ya que, al anular la vía paracelular, sólo permiten el pasaje transcelular. Únicamente las pequeñas moléculas gaseosas como

O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, y otras pequeñas moléculas lipofílicas, pueden difundir libremente a través de las membranas celulares. La presencia de las uniones ocluyentes impide el pasaje de casi todas las moléculas mayores que 400 Da, que representan más del 98% de las moléculas pequeñas (Pardridge, 2005).

Las células endoteliales cerebrales y retinales difieren de las ubicadas en otros órganos. Morfológicamente, las uniones ocluyentes del endotelio neural son más parecidas a las epiteliales que a las de otros endotelios. Poseen una estructura de mayor complejidad, que parece ocluir con mayor eficacia el espacio intercelular (Wolburg and Lippoldt, 2002). Además, las uniones ocluyentes neurales son muy sensibles a los factores ambientales (Kniesel and Wolburg, 2000). El endotelio neural también restringe el transporte transcelular, como lo refleja el menor número de vesículas pinocitóticas (Rubin and Staddon, 1999). Otro mecanismo importante para la función de barrera, es la presencia de ciertos transportadores, entre los que se destacan la glucoproteína-P y las proteínas de multirresistencia a drogas, que restringen el ingreso de diversas sustancias (Kusuhara and Sugiyama, 2001). Por su parte, los transportadores de glucosa, GLUT-1 y GLUT-4; los transportadores de aminoácidos y otros transportadores selectivos, aseguran el ingreso de las moléculas necesarias para la función neural (Begley and Brightman, 2003).

Este fenotipo endotelial particular del sistema nervioso central (SNC) es inducido por los astrocitos (Gardner et al., 1997; Janzer and Raff, 1987), y en menor grado por los pericitos, macrófagos perivasculares y neuronas (Abbott et al., 2006; Bauer and Bauer, 2000). Durante el desarrollo embrionario, la aparición de propiedades endoteliales de barrera se correlaciona con la formación de asociaciones del endotelio con astrocitos y pericitos (Choi and Kim, 2008). A la inversa, las alteraciones de estas células perivasculares inducidas por enfermedades como diabetes y uveítis se traducen en reducciones de las propiedades de barrera (Pournaras et al., 2008).

Los astrocitos pueden inducir la expresión de las proteínas que conforman las uniones ocluyentes y de las moléculas transportadoras, aún en células endoteliales que no pertenecen al SNC (Hurst and Fritz, 1996; Kuchler-Bopp et al., 1999). Los factores de origen astrocitario que pueden inducir propiedades de barrera endotelial incluyen entre otros el factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ), el factor neurotrófico derivado de las

células gliales (GDNF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), la angiopoetina-1 (Ang-1) (Lee et al., 2003). En la retina, tanto los astrocitos como las células de Müller liberan GDNF y neurturina, que promueven las funciones de barrera del endotelio (Igarashi et al., 2000).

Por el contrario, ciertos factores derivados de la microglia disminuyen las propiedades de barrera. Uno de los más importantes es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que actúa directamente sobre las uniones ocluyentes, o indirectamente estimulando la producción de endotelina-1 e interleuquina-1 $\beta$  en los astrocitos (Didier et al., 2003).

#### **1.1.2.4 Uniones ocluyentes y propiedades de barrera**

Las uniones ocluyentes (zonula occludens) sellan el espacio intercelular. Están formadas por la acumulación de proteínas integrales de la membrana que se distribuyen en bandas. A nivel de esas bandas es donde se acercan las membranas de las dos células, cerrando así el espacio entre las mismas. A mayor número de bandas, mayor será la eficiencia del sellamiento intercelular.

Las principales proteínas integrales de estas uniones son las claudinas y las ocludinas. Por su cara citoplasmática, las uniones ocluyentes se asocian a una serie de proteínas, entre las cuales se encuentran las ZO-1, -2 y -3, por medio de las cuales se conectan con el citoesqueleto (Turksen and Troy, 2004).

Las claudinas son proteínas de 22-27 kDa. Tienen cuatro dominios transmembranosos hidrofóbicos y dos asas extracelulares. El asa de mayor longitud establece interacciones con las proteínas de la célula vecina; de ella dependerían el sellamiento paracelular y la permeabilidad selectiva a los iones. El asa más corta podría estrechar el espacio paracelular y aumentar la adhesión entre las dos membranas. Actualmente se conocen dos grupos de claudinas, las clásicas (1-10, 14, 15, 17, 19) y las no-clásicas (11-13, 16, 18, 20-24) (Krause et al., 2008). La cola citoplasmática difiere en las distintas claudinas, pero todas poseen sitios de fosforilación y una secuencia de unión PDZ. En la encefalomiелitis autinmune experimental, se observa pérdida de la claudina-3 en las vénulas de las zonas afectadas (Wolburg et al., 2003). En situaciones de hipoxia se reducen los niveles de claudina-5 (Koto et al., 2007).

Si bien las ocludinas forman parte de las uniones ocluyentes, no son esenciales para su estructura y solo participarían en los mecanismos de transducción de señales de las células endoteliales (Saitou et al., 2000). Recientemente se demostró que las ocludinas contribuyen críticamente a mantener la integridad de la barrera hemato-retinal (Campbell et al., 2006).

Las proteínas ZO (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) se asocian a la cara citoplasmática de las uniones ocluyentes. Estas proteínas poseen un dominio PDZ-1 que interactúa con las regiones citoplasmática de las claudinas. La región carboxiterminal de la ZO-1 se une a la actina, permitiendo la asociación con los microfilamentos del citoesqueleto. ZO-2 interacciona con las ocludinas y también con las proteínas de las uniones adherentes. Tanto los niveles de ZO-1 como los de las ocludinas se reducen en la retinopatía diabética (Leal et al., 2007).

### **1.1.3 Pérdida de la barrera hemato-retinal**

En resumen, las funciones principales de las barreras hemato-retinales incluyen el control del ingreso a la retina de las moléculas y células provenientes de la sangre, así como la preservación de la homeostasis iónica e inmunológica en el microambiente retinal. La ruptura de la barrera, acompañada por el ingreso de células blancas de la sangre, es un fenómeno común a varias enfermedades de la retina (Erickson et al., 2007). A su vez, la ruptura de la barrera puede exacerbar las lesiones retinales por el edema y la acumulación de leucocitos. Estos provocan daño tisular por las proteasas y radicales superóxido que producen, así como por la liberación de diversas citoquinas que aceleran los procesos inflamatorios. En los pacientes diabéticos, la liberación de molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), TNF- $\alpha$  y factor quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1), y la posterior interacción leucocito-endotelio contribuyen a la pérdida de la barrera (Leal et al., 2007).

Entre las diversas lesiones que son acompañadas por ruptura de la barrera hemato-retinal solo describiremos el desprendimiento de retina, la proliferación vitreoretinal (PVR) y la uveítis, ya que son las que hemos abordado experimentalmente.

### **1.1.3.1 Desprendimiento de retina**

Un desprendimiento de retina se define como una ruptura entre la capa de fotorreceptores y el EPR, generalmente acompañado por la acumulación de líquido en el espacio neoformado. El desprendimiento de retina regmatógeno suele aparecer como evento espontáneo y generalmente es atribuido a alteraciones del vítreo posterior. Típicamente ocurre en personas de 40-70 años. También aparece en ciertas enfermedades genéticas, como el síndrome de Stickler (Go et al., 2003).

Un desprendimiento de retina puede producir serios defectos de la función visual que dependen, en primer lugar, del tiempo transcurrido entre el comienzo del desprendimiento y la readhesión quirúrgica (Diederer et al., 2007). Aunque ésta suele ser anatómicamente exitosa, el ojo afectado rara vez recupera la agudeza visual pre-desprendimiento. Este defecto remanente se atribuye a las lesiones sufridas por la retina hipóxica, que afectan a los fotorreceptores y a las células de Müller (Lewis et al., 1999; Mervin et al., 1999). Muy poco es lo que se sabe actualmente del efecto de estos desprendimientos sobre el EPR.

En segundo lugar, el desprendimiento de retina determina complejas alteraciones y remodelaciones de las células retinales que, además de influir sobre la recuperación funcional (Fisher and Lewis, 2003; Fisher et al., 2005), contribuyen al desencadenamiento de la proliferación vitreoretinal (PVR) (Canto Soler et al., 2002). La desorganización inicial de los fotorreceptores separados del EPR se asocia con cambios reactivos de las neuronas de la retina interna, la glia y el EPR (Bringmann et al., 2006; Geller et al., 2001; Uhlmann et al., 2003).

El desprendimiento de retina también determina una respuesta inflamatoria local, con activación de la microglia local e infiltración de macrófagos en el espacio subretinal. A esto se suman aumentos en la expresión retinal de factores pro-inflamatorios como la ciclooxigenasa, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y MCP-1 (Lewis et al., 2005).

### **1.1.3.2 Proliferación vitreoretinal**

Actualmente, la proliferación vitreoretinal (PVR) aparece en 5-10% de todas las cirugías por desprendimiento regmatógeno (Chan et al., 2008). La PVR consiste en la

formación de membranas contráctiles sobre ambas superficies de la retina y dentro del vítreo (Wiedemann and Weller, 1988). La formación y contracción gradual de las membranas distorsiona aún más la arquitectura normal de la retina y produce desprendimiento traccional, de difícil reparación y que puede llevar a la fibrosis total (Sheridan et al., 2001). Membranas parecidas, aunque no idénticas, se forman en otras enfermedades oculares como retinopatía diabética proliferativa, trauma del segmento posterior del ojo o la inflamación crónica intraocular (Cardillo et al., 1997; Gau et al., 1999; Mitra and Mieler, 1999; Roldan-Pallares et al., 2005). La PVR es además una importante complicación de las cirugías de translocación retinal, ensayadas en la degeneración macular, donde aparece en aproximadamente el 20% de los casos (Charteris et al., 2002).

Las membranas epi- y subretinales tienen dos componentes principales: células provenientes del EPR y de la glia (Asaria and Charteris, 2006). Mediante el desarrollo de un modelo experimental en ratón, nuestro laboratorio pudo demostrar que las células del EPR sólo se encuentran en las membranas subretinales, mientras que las epiretinales son de origen glial (Canto Soler et al., 2002). La formación de la matriz depende en gran medida de la transformación de estas células en miofibroblastos (Canto Soler et al., 2002; Walshe et al., 1992).

### **1.1.3.3 Uveítis**

La uveítis es una causa importante de daño ocular y ceguera en el mundo. Sus manifestaciones características son: edema, alta presión intraocular y finalmente la destrucción de los tejidos y ceguera. Está asociada a numerosas enfermedades, incluidas Behcet, espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil, síndrome de Reiter y enfermedad intestinal inflamatoria. También se asocia al SIDA (Mattapallil et al., 2008). Es regulada por mecanismos inmunológicos endógenos, factores ambientales y genéticos (Read, 2006).

La barrera hemato-retinal desempeña un importante papel en la patogenia de la uveítis. A diferencia de otras condiciones, en la uveítis la ruptura de la barrera es acompañada por pérdida del estado de privilegio inmunológico del ojo (Caspi, 2006). Por lo tanto, no solo interesa el ingreso de moléculas de distinto tamaño que normalmente no llegan al

ojo, sino también la extravasación de células. El paso inicial de este fenómeno es la adhesión de las células al endotelio de la pared vascular, mediado por moléculas de adhesión que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1 y PECAM-1) (Greenwood et al., 2002; Greenwood et al., 1995). El pasaje de linfocitos a través de los microvasos cerebrales requiere además, la activación de proteínas G heterotriméricas, y la toxina pertussis reduce más del 80% la migración de los linfocitos a través de los endotelios centrales, sin afectar los mecanismos de adhesión (Adamson et al., 2002).

En esta tesis utilizamos la uveítis inducida por endotoxina (UIE), un modelo bien caracterizado de la uveítis clínica (Cousins et al., 1984). La endotoxina es un lipopolisacárido (LPS) perteneciente a la cubierta de las bacterias Gram negativas, que provocan una importante respuesta inmune. Una dosis intraperitoneal única de LPS induce una respuesta inflamatoria aguda del tracto uveal, con ruptura de las barreras hemáticas en solo 3 horas. Los cambios clínicos e histológicos son máximos a las 24 horas, y se resuelven en 2-7 días, según la dosis de endotoxina y la cepa del animal. Al igual que en las formas clínicas humanas, la UIE induce mayor adhesión de leucocitos a los microvasos, ruptura de la BHR, filtración hacia los tejidos oculares, injuria y muerte de células retinales. Estos fenómenos dependen de diversas citoquinas, tales como IL-1, -2, -4 y -6; TNF- $\alpha$  y el factor de crecimiento tumoral (TGF)- $\beta$ . También intervienen prostaglandinas E2, MCP-1, radicales derivados de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) (Marie et al., 1999; Ruiz-Moreno et al., 1992).

El endotelio maduro del SNC es capaz de limitar la respuesta inflamatoria (Hickey, 2001), pero esta propiedad desaparece en las enfermedades inflamatorias (Petty and Lo, 2002). Ciertas células residentes del ojo también tienen un rol activo, y contribuyen a la activación de las células T que logran atravesar el endotelio de la retina. Estas células incluyen astrocitos, células de Müller, células dendríticas y células del EPR, ya que todas son capaces de expresar moléculas MHC de clase II (Sun et al., 2003; Zhang et al., 1997). Los astrocitos de la retina desempeñan un papel activo en la inflamación intraocular (Hu et al., 2000; Jiang et al., 2008; Roberge et al., 1988).

## 1.2 Receptores acoplados a proteínas G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), también denominados receptores con 7 dominios transmembranosos (7TM) constituyen una de las familias más grandes de receptores. Se estima que el genoma humano contiene 800 secuencias correspondientes a receptores de esta familia, aunque solo unas 300 han sido funcionalmente caracterizadas (Fredriksson et al., 2003).

La resistencia eléctrica de las láminas endoteliales se duplica cuando son cultivadas en medio condicionado por astrocitos, uno de cuyos efectos es el aumento del AMPc en el citoplasma endotelial (Raub, 1996; Rubin et al., 1991). AMPc estabiliza las uniones ocluyentes, disminuye la permeabilidad y aumenta la complejidad de los complejos de unión en forma rápida y reversible (Gonzalez-Mariscal et al., 2008; Ishizaki et al., 2003). En los endotelios cerebrales, AMPc aumenta la expresión de claudina-5, incrementando su exposición en los bordes de la célula y promueve una transición de su fosforilación de Ser a Thr vía PKA (Ishizaki et al., 2003). Por el contrario, el deterioro de las propiedades de barrera endotelial es acompañado por cambios en la fosforilación de las proteínas de las uniones ocluyentes (occludina, claudina-5 y ZO-1) y activación de cPKC $\alpha$ , aPKC $\zeta$  y Rho/ROCK (Gonzalez-Mariscal et al., 2008; Persidsky et al., 2000).

El pasaje de linfocitos a través de los microvasos cerebrales requiere no solo la adhesión entre linfocito y endotelio, sino también la activación de proteínas G heterotriméricas. La toxina pertussis reduce más del 80% la migración de los linfocitos a través de los endotelios centrales, sin afectar los mecanismos de adhesión (Adamson et al., 2002). La regulación de la barrera dependiente de proteína G ha sido atribuida a los receptores de quimioquinas (Engelhardt, 2006).

Por otra parte, AMPc inhibe la migración de las células EPR (Hackett et al., 1986). Estas células constituyen una fuente de ET-1 para la retina, y el aumento de su liberación inducido por TNF- $\alpha$  parece ser importante para la ruptura de la barrera hemoretinal externa (Narayan et al., 2003).

## 1.2.1 Sistema endocanabinoide

El sistema endocanabinoide consiste en cannabinoides endógenos (endocannabinoides), receptores de los cannabinoides, y enzimas que sintetizan y degradan los endocannabinoides. Los endocannabinoides mejor conocidos son la anandamida (AEA) y el 2-araquidonoil glicerol (2-AG), sintetizados por hidrólisis de precursores lipídicos ubicados en las membranas celulares. Estos ligandos actúan por medio de receptores de membranas de la familia de los GPCR, CB1 y CB2, que juegan un importante papel en numerosos procesos incluidos la regulación metabólica, dolor, ansiedad, crecimiento de los huesos y en las funciones inmunes.

### 1.2.1.1 Descubrimiento y características generales

Los cannabinoides se han utilizado como droga recreacional y también como terapia para una variedad de desórdenes. La resina secretada por *Cannabis Sativa* contiene más de 60 componentes activos, donde el principal es el  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Mechoulam and Gaoni, 1965). Casi todos los efectos centrales parecen ser mediados por el receptor CB1 (Devane et al., 1988), que fue inicialmente clonado de la corteza cerebral de ratas (Matsuda et al., 1990) y luego, de cerebro y testículo humano (Gerard et al., 1991), y de cerebro de ratón (Chakrabarti et al., 1995). Una variante por corte y empalme para CB1 fue aislada del pulmón humano y designado como CB1A (Shire et al., 1995).

El segundo receptor de los cannabinoides, CB2, fue clonado de células humanas leucémicas promielocíticas (HL-60) (Munro et al., 1993). Este receptor también está acoplado a proteína G sensible a PTX. Posee 68% de homología en la secuencia aminoacídica con respecto a CB1 dentro de los dominios transmembrana y solo el 44% de homología en la secuencia total de la proteína. Ambos receptores también podrían asociarse con proteínas Gs, pero solo cuando hay poca disponibilidad de proteínas Gi/o por activación de otros receptores (Mackie and Stella, 2006).

La activación de los receptores CB1 produce una señalización intracelular típica de proteínas Gi/o, es decir inhibición de la enzima adenilato ciclasa con la subsiguiente disminución de AMPc, la desactivación de la proteína quinasa A (PKA) y la estimulación de la vía de las quinasas de proteína activadas por mitógenos MAPK

(Derkinderen et al., 2003). También modifica la actividad de canales de calcio y potasio, que modulan la liberación de neurotransmisores y disminuyen la excitabilidad celular (Felder et al., 1995; Fowler et al., 2005; Hohmann and Suplita, 2006; Pertwee, 2000; Porter and Felder, 2001). En los astrocitos, la estimulación de CB1 induce la hidrólisis de esfingomielina con producción de ceramidas, un proceso independiente de la activación de las proteínas Gi/o (Sanchez et al., 2001).

Los receptores CB2 también producen la activación de proteínas Gi/o, pero no modifican los canales de calcio ni de potasio (Felder et al., 1995; McFarland and Barker, 2004).

CB1 se ubica en el CNS en corteza cerebral, cerebelo, hipocampo, amígdala, los ganglios basales y neuronas aferentes periféricas (Herkenham et al., 1990; Hohmann and Herkenham, 1998). También se encuentra en tejidos periféricos: bazo y timo (Galiegue et al., 1995), vejiga (Pertwee and Fernando, 1996), conducto deferente (Pertwee et al., 1996), terminales nerviosas simpáticas (Ishac et al., 1996), células del musculo liso (Filipeanu et al., 1997) y, en menor medida glándula adrenal, hígado, corazón, útero, ovario y leucocitos (Demuth and Molleman, 2006; Galiegue et al., 1995).

CB2 también se expresa en tejidos periféricos, en la zona marginal del bazo (Munro et al., 1993; Schatz et al., 1997), timo y células del sistema inmune (Galiegue et al., 1995; Munro et al., 1993). Más recientemente se lo ha detectado en el cerebro (Gong et al., 2006), páncreas endocrino (Juan-Pico et al., 2006) y hueso (Ofek et al., 2006).

### **1.2.1.2 Endocannabinoides**

El primer endocanabinoide descubierto fue araquidonoiletanolamida o anandamida (AEA) (Devane et al., 1992), que in vitro posee muchos efectos semejantes a los del  $\Delta^9$ -THC (Felder et al., 1993; Fride and Mechoulam, 1993). AEA es producida por una gran variedad de tipos celulares, en CNS es sintetizado por las neuronas, astrocitos y microglia, mientras que en la periferia es sintetizado en bazo, corazón y piel (Felder et al., 1996).

En 1995 se descubrió otra familia de endocannabinoides, representada por el 2-araquidonilglicerol (2-AG) (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Este endocanabinoide es producido por la vía fosfolipasa C/diacilglicerol lipasa (Prescott and Majerus, 1983), y se encuentra en intestino (Mechoulam et al., 1995) y cerebro, en mayor cantidad que AEA (Stella et al., 1997).

Más recientemente se identificaron el noladin éter, agonista de los receptores CB1 (Hanus et al., 2001) y el O-araquidonil-etanolamina (virodamina), antagonista de los mismos receptores CB1. Notablemente, virodamina actúa como un agonista total de los receptores CB2 (Porter et al., 2002).

AEA y 2-AG no son acumulados en vesículas, ya que son liberados en función de los estímulos que gatillan su síntesis (Habayeb et al., 2002). La producción de AEA depende de estímulos que aumentan los niveles intracelulares de calcio y requiere una fosfodiesterasa, del tipo fosfolipasa D (PLD) (Cadas et al., 1997; Di Marzo et al., 1994). En algunos casos, sin embargo, la AEA puede ser generada por una vía dependiente de fosfolipasa C (PLC) (Liu et al., 2006) o también a través del sistema enzimático  $\alpha/\beta$ -hidrolasa (Simon and Cravatt, 2006). La síntesis de 2-AG ocurre principalmente vía hidrólisis del fosfatidilinositol por la PLC y la lipasa diacilglicerol, aunque en ciertos tejidos la hidrólisis es llevada a cabo por la enzima fosfolipasa A1 y liso-fosfolipasa C (Farooqui et al., 1986; Mackie and Stella, 2006).

El mecanismo celular para detener la actividad de los endocannabinoides liberados, se basa en la utilización de transportadores que reintroducen a los cannabinoides dentro de las células, donde son hidrolizados. Las hidrolasas, por el contrario, son específicas. La amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) degrada a los cannabinoides de la familia AEA, mientras que las ciclooxigenasas y lipooxigenasas degradan a los integrantes de la familia 2-AG (Basavarajappa, 2007; McFarland and Barker, 2004).

### **1.2.1.3 Efectos de los cannabinoides**

La activación de los CB1 cerebrales se asocia con un amplio rango de comportamientos, alteraciones en las funciones cognitivas, percepción del dolor, adicción a las drogas, euforia, propiedades anticonvulsivas, consolidación de la memoria, regulación de la temperatura corporal, sueño y apetito (Abood and Martin, 1992). Por otra parte, se han

descripto efectos neuroprotectores posiblemente mediados por la activación ERK 1/2 y la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Marsicano et al., 2003). También podría controlar la diferenciación de las células progenitoras neurales, el crecimiento de las neuritas y la formación de sinapsis funcionales (Mackie and Stella, 2006). En situaciones de neuroinflamación, los endocannabinoides cerebrales pueden activar los receptores canabinoides de los leucocitos que han atravesado la barrera hemato-cerebral, regulando el curso del proceso inflamatorio (Richardson et al., 1998).

Los receptores CB2 han sido principalmente asociados a la regulación del sistema inmune. Modulan la migración de las células inmunes, inhiben la presentación de antígenos por los macrófagos y el cebado de las células T helper. Sus agonistas reducen la liberación de citoquinas e incrementan la tasa de proliferación de las células inmunes (Carrier et al., 2004; Klegeris et al., 2003). En concentraciones altas inducen la apoptosis de las células inmunes (Pertwee, 2005). CB2 también ha sido detectado en las células madres del SNC (Mackie and Stella, 2006).

Los endocannabinoides también han sido asociados al control crecimiento tumoral (Sarfaraz et al., 2006). En ciertos tumores, como glioblastomas, cáncer colorectal y adenoma hipofisario, la sobreexpresión de AEA y/o 2-AG reduce la tasa de proliferación e invasividad celular (Ligresti et al., 2003; Petersen et al., 2005).

Los canabinoides han demostrado tener efectos positivos sobre el sistema cardiovascular, como un rol protector en la progresión de la aterosclerosis y en la isquemia cerebral y miocardio (Mendizabal and Adler-Graschinsky, 2007).

Ambos receptores se encuentran en el aparato digestivo y participan activamente en la inflamación intestinal. CB1 se expresa principalmente en los plexos mientérico y submucoso del aparato digestivo, donde reduce el peristaltismo y la contracción gastrointestinal. Por su parte, CB2 ejerce un efecto inmunomodulador sobre el epitelio intestinal y células inmunes asociadas (Marquez et al., 2008). En una línea celular epitelial colónica, los canabinoides modulan la liberación de IL-8 por interacción con la vía NF- $\kappa$ B (Mormina et al., 2006). Llamativamente, en animales con inflamación de colon tratados con un bloqueante de los transportadores de endocannabinoides, se

observaron en la mucosa altos niveles de AEA concomitantes con la disminución de la inflamación (D'Argenio et al., 2006).

## **1.2.2 Melatonina y dopamina en el reloj circadiano**

El reloj circadiano de la retina regula una gran variedad de funciones, entre ellas: el desprendimiento y fagocitosis de los discos del segmento externo, la liberación de melatonina, la síntesis de dopamina, la amplitud de la onda b del electroretinograma, el pH extracelular, la sensibilidad visual y la presión intraocular. Además, influye sobre la susceptibilidad de los fotorreceptores a la injuria luminosa, la supervivencia de los fotorreceptores en distintos modelos de degeneración de la retina, e incluso la magnitud del error de refracción en modelos de miopía en primates (Ruan et al., 2006).

Los ritmos circadianos endógenos son generados por circuitos retroalimentados de transcripción-traducción que incluyen un conjunto definido de “genes reloj” expresados en ciertas neuronas que actúan como marcapasos. Los componentes genéticos esenciales del reloj en los mamíferos son Period (Per) 1 y 2, Cryptochrome (Cry) 1 y 2, Clock y Bmal1 (Reppert and Weaver, 2002). Los genes reloj se expresan de manera coordinada en neuronas de las capas de células ganglionares y nuclear interna de la retina (Ruan et al., 2006). Estas neuronas pueden funcionar como reloj autónomo capaz de generar ritmos independientemente del reloj maestro en el núcleo supraquiasmático (Garbarino-Pico et al., 2004). Aunque los fotorreceptores expresan todos los genes reloj, no parecen hacerlo con la coordinación suficiente para constituir un reloj (Ruan et al., 2006). Sin embargo, se encuentran oscilaciones rítmicas de arilalkilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT) después de lesiones de la retina interna (Sakamoto et al., 2006) y los fotorreceptores de rata aislados en cultivo pueden sintetizar melatonina de manera rítmica durante por lo menos 5 días (Tosini et al., 2007). Ambos estudios apoyan la presencia de un marcapasos circadiano autónomo en los fotorreceptores.

Como efectores del reloj circadiano, la melatonina y la dopamina desempeñan papeles opuestos en la adaptación de la retina. Ambos son liberados en forma rítmica, la melatonina por los fotorreceptores y la dopamina por una subpoblación de células amacrinas (Doyle et al., 2002). La dopamina funciona como una señal humoral para la luz, mientras que la melatonina actúa como molécula de adaptación a la oscuridad. La

melatonina es liberada en la oscuridad y la dopamina durante el día (Iuvone et al., 2005).

En las aves, el reloj circadiano de los fotorreceptores genera un ritmo de la adenilil ciclasa dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina que explica las variaciones temporales de los niveles de AMPc en los fotorreceptores (Chaurasia et al., 2006). Este segundo mensajero controla a su vez la transcripción del gen de la arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT), enzima clave en la síntesis la melatonina. AMPc activa la transcripción por medio del factor CREB, que se une a los elementos de respuesta al AMPc presentes en el promotor de AA-NAT (Baler et al., 1997; Iuvone et al., 1999). Los niveles del ARNm de AA-NAT varían en forma circadiana, y esta oscilación persiste en condiciones de oscuridad constante (Sakamoto and Ishida, 1998). El ascenso comienza en la transición del día hacia la noche y el pico máximo ocurre en las últimas horas de la noche. Las variaciones del ARNm son seguidas por cambios en la actividad de AA-NAT y luego en los niveles de melatonina (Sakamoto and Ishida, 1998).

Los ritmos de luz-oscuridad se acoplan al reloj por dos mecanismos. La luz puede inactivar la proteína AA-NAT por la vía del proteasoma. Por otra parte, la despolarización de los fotorreceptores en la oscuridad provoca un influjo de  $Ca^{2+}$  que a su vez activa la adenilato ciclasa y aumenta AMPc (Tosini and Fukuhara, 2003).

La dopamina es producida en forma rítmica por una subpoblación de neuronas amacrinas que funcionan como marcapasos circadianos. La ritmicidad no requiere ni la presencia ni la secreción rítmica de melatonina (Doyle et al., 2002). La dopamina influye sobre prácticamente todos los procesos circadianos de los fotorreceptores, probablemente en forma cooperativa con otros procesos dependientes del reloj y la iluminación (Pozdeyev et al., 2008).

Los sistemas melatolinérgicos y dopaminérgicos presentan una fuerte interregulación entre sí, de modo que la melatonina inhibe la síntesis de dopamina (Dubocovich, 1983) y, a su vez la dopamina inhibe la síntesis de melatonina (Nguyen-Legros et al., 1996; Tosini and Dirden, 2000).

### **1.2.2.1 Receptores de melatonina**

En los mamíferos se han clonado dos receptores de melatonina, MT1 y MT2, que pertenecen a la familia de los GPCR. En la retina de rata, MT1 se expresa en la capa nuclear interna (células horizontales y amacrinas), en la capa plexiforme interna y en el EPR (Fujieda et al., 1999). En retinas humanas, MT1 presenta una distribución aún más amplia, que incluye los segmentos internos de bastones y los conos, células amacrinas y células ganglionares (Savaskan et al., 2002; Scher et al., 2002). La expresión en los fotorreceptores es de gran interés, ya que podría estar asociada a la regulación de la fototransducción y/o al recambio de los discos del segmento externo (Besharse and Dunis, 1983).

MT2 ha sido recientemente localizado en la retina humana, en células ganglionares y bipolares, así como en los segmentos internos de los fotorreceptores. También se encontró en las prolongaciones de las plexiformes externa e interna (Savaskan et al., 2007).

### **1.2.2.2 Receptores de dopamina**

Se conocen 5 subtipos de receptores dopaminérgicos, D1, D2, D3, D4 y D5. D1 y D5 son miembros de la familia tipo D1, mientras que D2, D3 y D4 son miembros de la familia tipo D2. Los subtipos D1 están acoplados a  $G_{\alpha s}$ , que activa la adenilil ciclasa. Por el contrario, los D2 se acoplan a  $G_{\alpha i}$ , que inhibe a dicha enzima.

Las fases de liberación de dopamina en la retina interna son moduladas por los receptores D1 (Ruan et al., 2008). La dopamina inhibe la síntesis de melatonina y regula fosforilación de proteínas de los fotorreceptores vía receptores D4 (Pozdeyev et al., 2008). El receptor D4 se expresa en todas las capas de la retina, pero solo en los fotorreceptores se observa un ritmo con aumento nocturno (Klitten et al., 2008). En las células horizontales se encuentran receptores D1/D5 que controlan la respuesta a estímulos fotópicos (Pflug et al., 2008).

### **1.2.2.3 Melatonina como neuroprotector**

En situaciones de estrés, la melatonina es capaz de proteger a las neuronas de la muerte por apoptosis (Mayo et al., 1998). La administración de melatonina en el período

postnatal protege a los fotorreceptores de los ratones rds/rds, que mueren por apoptosis (Liang et al., 2001). También protege a las neuronas retinales y al EPR de la apoptosis inducida por isquemia (Osborne et al., 1998).

Bajo condiciones de hipoxia, la melatonina mantiene a la barrera hemato-encefálica por supresión de diferentes factores que aumentan su permeabilidad, como VEGF y NO (Kaur and Ling, 2008).

Los mecanismos melatoninérgicos que influyen sobre la apoptosis son varios: la eliminación de radicales libres del oxígeno (Turjanski et al., 1998), el aumento en la actividad de antioxidantes intrínsecos, la expresión de los genes anti-apoptóticos (Luchetti et al., 2008) y otros. Recientemente, se ha descubierto que el efecto antioxidante de melatonina puede ser explicado por su unión e inhibición de la enzima quinona reductasa 2 (QR2) (Jockers et al., 2008).

Sin embargo, por su efecto sobre la sensibilidad de los fotorreceptores, la melatonina aumenta el daño inducido por luz (Sugawara et al., 1998; Wiechmann and O'Steen, 1992).

### **1.2.3 Sistema endotelinérgico**

La existencia de una molécula derivada del endotelio vascular con marcado efecto vasoconstrictor fue demostrada en 1985 (Hickey et al., 1985). Dos años más tarde se confirmó su naturaleza peptídica y se le asignó un peso molecular de aproximadamente 3000 daltons (O'Brien et al., 1987). Recién en 1988 Yanagisawa y col., lograron purificar un péptido de 21 aminoácidos, que denominaron endotelina (Yanagisawa et al., 1988). Mediante clonación y secuenciación también identificaron el ADNc de la prepro-endotelina, que demostraba la existencia de un procesamiento proteolítico previo a la aparición del péptido maduro. Muy pronto se puso en evidencia que, además de vasoconstricción, la endotelina (ET o Edn), poseía un amplio rango de efectos, entre ellos: proliferación del músculo liso vascular (Komuro et al., 1988) y despolarización de neuronas de la médula espinal (Yoshizawa et al., 1989). La exploración del genoma permitió descubrir tres genes correspondientes a tres diferentes prepro-endotelinas y a la caracterización de las acciones farmacológicas de los tres péptidos maduros (Figura

1.3), la endotelina-1 (ET-1) ya conocida, y las recién descubiertas ET-2 y ET-3 (Inoue et al., 1989a; Yanagisawa and Masaki, 1989).

En humanos, ET-1 es el vasoconstrictor más potente conocido, con una potencia 100 veces mayor que la noradrenalina. Su EC50 de 2-0.6 nM es un orden de magnitud menor que las EC50 de angiotensina II o neuropéptido Y para producir una contracción comparable (Goraca, 2002).

### **1.2.3.1 Receptores endotelinérgicos**

En 1990 dos grupos lograron clonar dos receptores diferentes para las endotelinas, ETR-A y ETR-B, pertenecientes a la familia GPCR (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990). ETR-A y ETR-B son homólogos en un 63% de su secuencia y se asocian a distintas isoformas de proteínas G. Posteriormente, por medio de varios ensayos de radiomarcaje y farmacológicos se descubrió otro receptor, llamado ETR-C, que solamente ha sido clonado en anfibios (Masaki et al., 1994).

En los vasos, ETR-A es expresado primariamente por las células musculares arteriales, donde controla la vasoconstricción dependiente de endotelina. Por el contrario, ETR-B se encuentra principalmente en células endoteliales, donde induce liberación de óxido nítrico (NO) y prostaciclina. Es decir que, en los vasos, ETR-B produce vasodilatación un efecto opuesto al de ETR-A. La interacción entre los distintos componentes del sistema endotelinérgico vascular conduce a un sistema altamente controlado de vasoconstricción/vasodilatación, que desempeña un papel importante en la regulación del tono vascular y la presión arterial (Schiffrin et al., 1997).

Los receptores muestran diferentes constantes de afinidad por las isoformas de ET. ETR-A se une a las mismas con el siguiente orden de afinidades:  $ET1 \geq ET2 \gg ET3$ . Por el contrario, ETR-B muestra una respuesta homogénea para cualquiera de dichas isoformas (Davenport and Maguire, 2006).

#### **1.2.3.1.1 Receptor endotelinérgico A**

La unión de ET-1 a los ETR-A puede activar diversas vías asociadas a proteínas G. En las células hipofisarias, por ejemplo, actúa por lo menos sobre 4 tipos de proteína G: Gq $\alpha$  activa PLC, que determina un aumento de IP3 y permite el influjo de Ca<sup>2+</sup> desde el

retículo endoplásmico hacia el citosol. La activación de proteínas  $G_i/o\beta\gamma$  abre los canales GIRK, con la consiguiente hiperpolarización de la membrana, que bloquea el influjo de  $Ca^{2+}$  a través de canales regulados por voltaje. También pueden estar acoplados a  $G_z\alpha$ , que inhibe la adenilato ciclasa, reduciendo la concentración de AMPc. Además, la  $G_z\beta\gamma$  interfiere directamente con la adhesión de las vesículas secretoras a la membrana, bloqueando los fenómenos de exocitosis (Bertram et al., 2006). Algunos estudios recientes sugieren que estas diferentes vías podrían estar asociadas a variantes de ETR-A producidas por empalme alternativo de sus transcritos primarios (Hatae et al., 2007).

ETR-A también participa en la estimulación del crecimiento celular. Durante el desarrollo embrionario, ETR-A es expresado por el ectomesénquima derivado de las crestas neurales, mientras que su ligando ET-1 es expresado por el epitelio de los arcos branquiales y el eje mesodérmico de los mismos. La ausencia de ETR-A o ET-1 determina numerosos defectos craneofaciales. La señalización por vía ETR-A es necesaria para la expresión de diversos factores de transcripción que controlan este aspecto del desarrollo (Clouthier et al., 2000). La activación de ETR-A puede llevar a la hipertrofia de los miocitos en cultivo, y se considera que esta vía es necesaria para la hipertrofia cardíaca dependiente de hipertensión arterial (Sugden, 2003).

Se sabe que las dosis bajas de ET-1 protegen a los fibroblastos contra la apoptosis inducida por privación de suero, un proceso dependiente de c-Myc. Esta forma de supervivencia parece ser mediada por ETR-A y no parece estar ligada a la activación de la proliferación inducida por ET-1. La supervivencia inducida por endotelina depende sin embargo de la activación de las vías de las MAP quinasas (Shichiri et al., 1998).

Existen evidencias de la sobre-expresión de ETR-A en ciertos tipos tumorales, como los de ovario y próstata. La activación de estos receptores influye sobre diversas funciones promotoras del crecimiento tumoral, como el escape de la apoptosis, la transición epitelio-mesenquimal y la mayor motilidad e invasividad (Bagnato et al., 2005).

#### **1.2.3.1.2 Receptor endotelinérgico B**

El complejo ET-1/ETR-B es rápidamente internalizado y transportado a los lisosomas para su degradación, es decir que este receptor reduce los niveles extracelulares de ET-1

(Bremnes et al., 2000; Oksche et al., 2000). El endotelio de los vasos hepáticos, renales, y especialmente pulmonares (Dupuis et al., 1996; Johnstrom et al., 2005), contribuye a reducir los niveles circulantes de ET-1 (Luscher and Barton, 2000). Al mantener bajos niveles tisulares de ET-1, la clarificación dependiente de ETR-B inclinaría la balanza vascular hacia la vasodilatación y también reduciría riesgos de toxicidad miocárdica (Brunner et al., 2006; Johnstrom et al., 2005).

La actividad de este receptor también es importante para la regulación de los niveles de transcripción de la endotelina. En cultivos de células endoteliales, ETR-B transmite las señales que controlan la síntesis de ET-1, por modulación de la estabilidad del ARNm y de su transcripción (Farhat et al., 2008; Peled et al., 2006).

En las células endoteliales, ETR-B también funciona como mitógeno y factor de supervivencia autócrino (Shichiri et al., 1997). La deficiencia de ETR-B durante el desarrollo conduce a la aganglioneosis congénita del intestino, asociada a un trastorno en la migración de las células de la cresta neural (Nagy and Goldstein, 2006). En el SNC, las deficiencias de ETR-B durante el desarrollo se asocian con aumento de la apoptosis en el dentado del hipocampo (Ehrenreich et al., 2000). Después de lesiones en el SNC, el bloqueo farmacológico de los ETR-B de los astrocitos modula la formación de la cicatriz glial y posiblemente contribuya a la formación de un sustrato más permisivo para la supervivencia y regeneración neuronal (Rogers et al., 2003b).

Aunque muchas funciones parecen depender selectivamente de la estimulación de uno u otro receptor, también se conocen procesos biológicos que requieren la presencia de ambos receptores. Por ejemplo, la proliferación de los miofibroblastos de pulmón depende de la activación de ETR-A y ETR-B (Prefontaine et al., 2008).

### **1.2.3.2 Endotelinas**

Las endotelinas son péptidos de 21 aminoácidos producidos por un amplio rango de células. Su estructura es única entre los péptidos vasoactivos de los mamíferos, ya que contienen dos puentes disulfuros (Figura 1.3). Es de especial interés el puente formado entre las cisteínas 1 y 15, que reduce la susceptibilidad del extremo N-terminal a la degradación por las aminopeptidasas (Kuc et al., 2006).

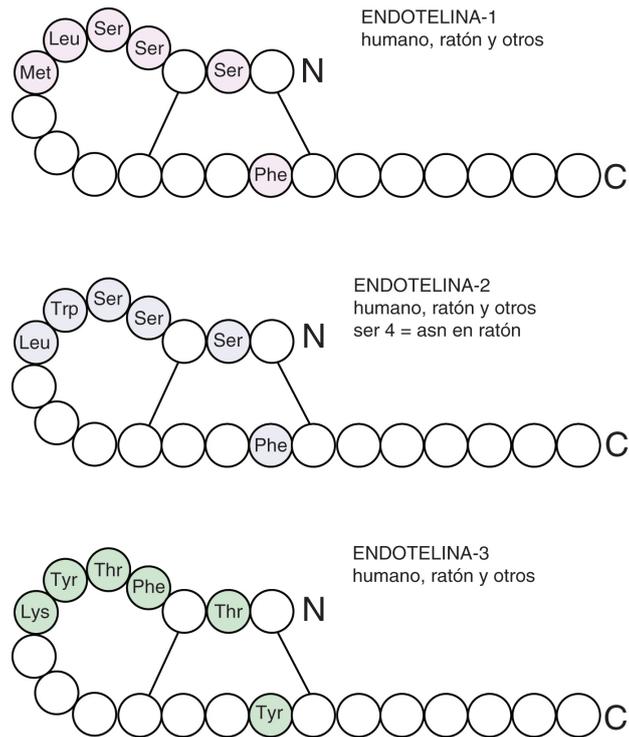


Figura 1.3. Isoformas ET-1, ET-2 y ET-3. Se muestra la estructura de las endotelinas, presentan una longitud de 21 aminoácidos y dos puentes disulfuros. Se encuentran remarcados los aminoácidos en que difieren las distintas isoformas.

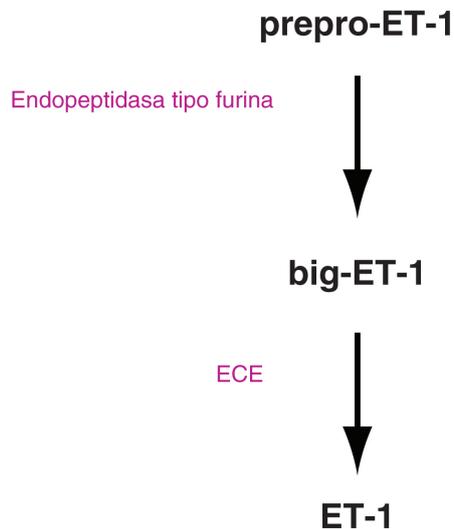


Figura 1.4. Procesamiento de las endotelinas. Las endotelinas se sintetizan como un precursor y por lo tanto debe sufrir unos pasos secuenciales de clivaje para su maduración. La forma inicial es la prepro-endotelina que es clivada por la enzima endopeptidasa furina. El producto es la big-endotelina es a su vez clivado por la enzima convertidoras de endotelinas (ECE) para producir finalmente la endotelina.

La ET-1 es producida por células vasculares endoteliales y musculares, pero también por otros numerosos tipos celulares, como neuronas y astrocitos del SNC, células del endometrio, hepatocitos, células mesangiales del riñón, células de Sertoli y células epiteliales de las vías aéreas (Levin, 1995). En consecuencia posee una amplia variedad de funciones fisiológicas (Kedzierski and Yanagisawa, 2001).

La vida media del ARNm es de aproximadamente 15 a 20 minutos (Inoue et al., 1989b) y la vida media del péptido ET-1 en plasma es aproximadamente de 4 a 7 minutos. Esto permite que las células vasculares puedan ajustar rápidamente la producción de ET-1 a los requerimientos de la regulación del tono vasomotor. Generalmente no hay acumulación de ET-1 en vesículas o gránulos de secreción regulada. Sin embargo, ha sido detectada en gránulos secretorios de ciertos endotelios (Harrison et al., 1995; Raffai et al., 2005). Por el contrario, diversos estímulos como la hipoxia o la isquemia inducen la transcripción del ARNm, y la síntesis y secreción del péptido en pocos minutos (Goraca, 2002).

#### **1.2.3.2.1 Isoformas ET-2 y ET-3**

ET-2 es producida predominantemente en el riñón e intestino, en pequeñas cantidades en miocardio, células del epitelio del intestino, ovario, placenta y útero. ET-2 no tiene una única función fisiológica, participaría en la alveolización del pulmón, termoregulación, ovulación, homeostasis y enfermedades inflamatorias del intestino (Barton and Yanagisawa, 2008).

ET-3 circula en el plasma, es producida por el endotelio, neuronas del cerebro, células epiteliales del riñón y células epiteliales del intestino. Media la liberación de distintos vasodilatadores como óxido nítrico y prostaciclina. En el cerebro, ET-3 podría regular la proliferación y diferenciación de neuronas y astrocitos (Levin, 1995).

#### **1.2.3.3 Regulación de la síntesis de las endotelinas**

La producción de ET-1 es controlada a nivel transcripcional y traduccional (Figura 1.4). A nivel post-traduccional la producción depende de la actividad de las enzimas convertidoras ECE (Brunner et al., 2006).

En las células endoteliales, la síntesis puede ser inducida por estimulación mecánica, iones calcio, angiotensina II, vasopresina, endotoxina y también por una gran variedad de citoquinas (IL-1, IL-1 $\beta$  e IL-6) y de factores de crecimiento (fibroblástico, epidérmico, tipo insulina) (Brunner et al., 2006). Entre las sustancias que pueden inhibir la transcripción del gen de ET-1 se encuentran el óxido nítrico, GMPc, prostaciclina y otros.

Las endotelinas maduras derivan de un precursor más largo, la prepro-endotelina, de 203-212 aminoácidos según las especies. En el hombre, el gen de la prepro-endotelina se encuentra en el cromosoma 6 y está conformado por 5 exones y 4 intrones. La secuencia del péptido maduro está codificada en el segundo exón (Russell and Davenport, 1999).

La prepro-endotelina es clivada por la endopeptidasa furina. Se origina así la Big-endothelin de 38 aminoácidos. El péptido maduro es sintetizado por hidrólisis Trp21-Val22 catalizada por diversas enzimas convertidoras de endotelina (ECEs). La más importante es ECE-1, que en humanos presenta cuatro isoformas distintas (ECE-1 a-d) derivadas todas del mismo gen por acción de promotores alternativos (Davenport and Maguire, 2006).

### **1.3 Objetivos generales de esta tesis**

En esta tesis se analiza algunos de los mecanismos moleculares que contribuyen a la integridad de las barreras oculares, en particular aquellos dependientes de receptores asociados a proteínas G. A saber:

- a. La identificación de los receptores canabinoides en la superficie ocular y el estudio de su papel en los procesos inflamatorios.
- b. Las propiedades del EPR, localización de la barrera hemato-retinal externa, que determinan su adhesión a la retina y que están asociadas al ritmo circadiano mediante mecanismos dependientes de melatonina y dopamina.
- c. El papel de los receptores endotelinérgicos durante la proliferación vitreoretinal subsiguiente al desprendimiento de retina.
- d. La pérdida de la barrera hemato-retinal interna en la uveítis experimental y su restablecimiento mediante el bloqueo de receptores endotelinérgicos.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Métodos generales**

#### **2.1.1 Obtención de muestras**

Como modelo experimental utilizamos ratones albinos de la cepa Balb/c o pigmentados C57BL/6, machos de 5-8 semanas. Los animales fueron mantenidos en nuestras instalaciones con los estándares del “ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research”. Sometidos a un ciclo de luz/oscuridad estándar de 12 horas por etapa, con niveles máximos de 60 lux.

Siempre que usamos muestras humanas, se obtuvieron según la Declaración de Helsinki y (52nd WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000, <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>) y de acuerdo con la normativa aprobada por el comité de investigación de la Universidad Austral. Todos firmaron los consentimientos informados.

#### **2.1.2 Caracterización inmunohistoquímica**

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 córnea, 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 0.1 M.

Las piezas destinadas a cortes por criostato fueron preservadas en soluciones de sacarosa de concentración creciente, mediante pasajes de 1 hs o toda la noche, hasta alcanzar una concentración final de sacarosa al 20 % (Barthel and Raymond, 1990). El material fue inmerso en un medio de inclusión (Cryoplast, Biopack Cat. N°120405) y congelado en acetona enfriada con nitrógeno líquido. Los cortes (14-16  $\mu\text{m}$ ) se realizaron con un criostato Microm (HM 500 OM), montados en portaobjetos gelatinizados y secados a temperatura ambiente (TA).

Cuando se realizaron preparaciones de retina enteras, al realizar la disección se descartó el segmento anterior del ojo y luego la retina fue separada de las tunicas oculares (esclerótica y coroides), y eliminamos los remanentes del vítreo que se mantienen adheridos a la retina por microdisección con pinzas. Las muestras se mantuvieron en sacarosa al 5%.

### **2.1.2.1 Procedimientos**

Los tejidos fueron procesados para detectar la unión de anticuerpos mediante 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 con pasajes de alcoholes de concentraciones crecientes (70%-100%), seguidos por aclaramiento en xilol y posterior rehidratación en PBS.
- b. Al material destinado a la detección inmunoenzimática, se le 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 adelante) fueron detectados con anticuerpos secundarios acoplados a biotina. A su vez, estos fueron tratados con 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 et al., 1995).
- d. Los anticuerpos unidos 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).
- e. Las secciones y retinas enteras fueron montadas, en Bálsamo de Canadá, en los casos en que el revelado fue con DAB; o con DABCO, si la técnica desarrollada fue 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). Las secciones ópticas obtenidas con este microscopio son tomadas en el eje Z cada 0,5  $\mu\text{m}$  y procesadas con el programa Confocal Assistant (BioRad, Hemel Hempstead, UK).

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

### **2.1.2.2 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. Después de que se secaron los cortes, se realizó unos lavados en PBS.
- b. Cubrimos completamente los portaobjetos con Rojo Neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) al 0,2 % en agua destilada por 5 minutos.
- c. Luego se lavo con agua corriente y se deshidratan en alcoholes, se aclara en xilol y se monta con Bálsamo de Canadá.

### **2.1.3 Detección de proteínas por Western blot**

Los animales son sacrificados y se lleva a cabo la enucleación de los ojos. La disección se realizó en solución salina estéril, se descartó el segmento anterior, y del segmento posterior se separan la esclera y coroides, manteniendo únicamente las retinas. Para obtener los homogenatos, 3 retinas fueron homogenizadas en 100  $\mu\text{l}$  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).

Sembramos 30  $\mu\text{g}$  de proteínas por calle y se separó mediante SDS-PAGE, luego se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (100 v, 90 min). Después de la incubación ON con los anticuerpos primarios específicos, se incubó la membrana con anticuerpos IgG biotinilados anti-huésped (1:1000, disuelto en PBST), más tarde con Extravidin-

Peroxidasa (1:10000, disuelto en PBST, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y revelados con kit quimioluminiscente (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). La densidad óptica de las bandas fue estimada utilizando el programa Image J, NIH.

## 2.1.3.1 Anticuerpos primarios

### 2.1.3.1.1 Marcadores endotelinérgicos

ANTICUERPO	HUESPED	ORIGEN	DILUCION
ET-1	Conejo (policlonal)	Bachem California, Torrance, CA	1:1000
ETR-A	Conejo (policlonal)	Alomone Labs, Israel	1:200
ETR-B	Conejo (policlonal)	Alomone Labs, Israel	1:200

### 2.1.3.1.2 Marcadores receptores cannabinoides

ANTICUERPO	HUESPED	ORIGEN	DILUCION
CB1-CAY	Conejo (policlonal)	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI (Cat. N°101500)	1:500
CB1-ABR	Conejo (policlonal)	Affinity BioReagents, Golden, CO (Cat. N°PA1-15297)	1:500
CB1-N	Conejo (policlonal)	Sinha D, Bonner TI, Bhat NR, Matsuda.	1:1500
CB1-C	Conejo (policlonal)	Sinha D, Bonner TI, Bhat NR, Matsuda.	1:500
CB2-CAY	Conejo (policlonal)	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI (Cat. N°101550)	1:500
CB2-ABR	Conejo (policlonal)	Affinity BioReagents, Golden, CO (Cat. N°PA1-746 <sup>a</sup> )	1:1000

### 2.1.3.1.3 Marcadores de tipos celulares específicos

ANTICUERPO	HUESPED	ORIGEN	MOLÉCULA DETECTADA
<b>GFAP</b>	Conejo policlonal (pGFAP) y ratón (monoclonal (mGFAP))	BioGenex, San Ramon, CA	Proteína glial fibrilar ácida
<b>GFAP-CY3</b>	Conejo (policlonal)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	Proteína glial fibrilar ácida
<b>SMA</b>	Ratón (monoclonal)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	Actina de músculo liso
<b>SMA-CY3</b>	Ratón (monoclonal)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO	Actina de músculo liso
<b>GS</b>	Conejo (policlonal)	Generosamente donado por Marmorstein, Cole Eye Research Institute, Cleveland	Glutamino Sintasa
<b>CRALBP</b>	Mouse monoclonal	Dr. J.C. Saari, University of Washington, Seattle, WA	Cellular binding protein retinaldehyde
<b>OPSINA</b>	Sheep polyclonal	Dr. D.S. Papermaster, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT	

### 2.1.3.1.4 Anticuerpos de señalización celular

ANTICUERPO	HUESPED	ORIGEN	MOLÉCULA DETECTADA
<b>SAPK/JNK</b>	Conejo (policlonal)	Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA	Protein quinasa activada por estrés/Jun quinasa amino terminal.
<b>p-JNK</b>	Conejo (policlonal)	Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA	Fosfo-Protein quinasa activada por estrés/Jun quinasa amino terminal.
<b>p-p38</b>	Conejo (policlonal)	Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA	Quinasa fosfo-p38 (MAPK)
<b>Phospho c-jun</b>	Conejo (policlonal)	Cell signaling Technology Inc., Beverly, MA	Factor de transcripción fosfo c-jun
<b>NF-kB (p65)</b>	Conejo (policlonal)	Santa Cruz Laboratories, CA	Factor nuclear <i>kappa</i> B

## 2.1.4 RT-PCR

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, manteniendo únicamente la retina. Juntamos 6 retinas por tratamiento (30 mg peso húmedo) y se homogeneizan (Homogenizador Sigma, Z359971-1EA) y procesan mediante un kit para aislamiento de ARN en tejidos ricos en lípidos (RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, Qiagen, Cat. N° 74804). La concentración de ARN total obtenida se midió con un espectrofotómetro (Amersham Biosciences, Gene quant pro), también evaluamos la contaminación de proteínas y ADN por la relación de la absorbancia (260/230 y 260/280, respectivamente). Además, evaluamos la calidad del ARN corriéndolo en un gel de agarosa al 1%, donde se observa la proporción de las bandas de los ARN ribosomales.

Para obtener el cDNA utilizamos la enzima retrotranscriptasa Superscript (Invitrogen, Cat.N°11904-018) 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,). Todos estos procedimientos se realizaron bajo condiciones de ARNasa libres.

Realizamos la amplificación por PCR con la enzima platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen, Cat.N°10366-030) usando primers específicos (ver Tabla). La amplificación del ARNm de GAPDH fue utilizado como control interno.

### 2.1.4.1 Reacciones de PCR

Se utilizó el siguiente protocolo, con diferentes temperaturas de annealings (TA) según lo determinado experimentalmente para cada par de primers.

- 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.

### 2.1.4.2 Primers utilizados en las reacciones de PCR

ARN detectado	Primers (sense/antisense, 5'-3')	Amplicon	TA
<b>PreproET-1</b>	AGCTGGTGGAAAGGAAGGAAACTACG GACAGTGCAGAAAGGTGAGGTAGACT	728	60°C
<b>ETR-B</b>	GGCTAGTGTGTTTTTCAGAGGCTTG CAGAACCACAGAGACCACCCAAAT	822	58°C
<b>CB1</b>	GATGTCTTTGGGAAGATGAACAAGC ACGTGTCTGTGGACACAGACATGG	309	60°C
<b>CB2</b>	TTTCCCACTGATCCCAATG AGTTGATGAGGCACAGCATG	337	52°C
<b>GAPDH</b>	TTCATTGACCTCAACTACATG GTGGCAGTGATGGCATGGAC	443	58°C

### 2.1.4.3 Análisis cuantitativo de imágenes

Los geles teñidos con bromuro de etidio fueron fotografiados con 2UV transiluminador (Amersham, Bio Doc-it imaging system). Las imágenes digitalizadas se semi-cuantificaron utilizando el software Scion Image β4.02 Win (Scion Corp., Frederick, MD) donde se estimó la densidad óptica.

## 2.2 Métodos para la superficie ocular

### 2.2.1 Obtención de las muestras

#### 2.2.1.1 Muestras humanas de conjuntiva

Tres pacientes que estaban programados a ser sometidos a una cirugía ocular de estrabismo y no presentaban lesiones ni en la conjuntiva ni en la córnea, fueron nuestros donantes de las muestras de conjuntiva. Una pequeña incisión de la región conjuntival fue obtenida y fue fijada en paraformaldehído al 4%.

Además se obtuvieron muestras por impresión citológica de 6 voluntarios sanos. Se anestesió los ojos con (1% propacaine, Alcon, Argentina), se aplicaron dos pedacitos de papel ester de celulosa (Millipore, 22  $\mu\text{m}$ ) en la región inferior de la conjuntiva tarsal y bulbar en cada ojo. Los papeles fueron aplicados por aproximadamente 10 segundos y se ejerció una suave presión con una pinza, e inmediatamente después se fijaron en alcohol etílico al 70% (Tseng, 1985).

### **2.2.1.2 Cultivos celulares**

Se utilizó la línea celular derivada de la conjuntiva humana IOBA-NHC (Diebold et al., 2003), cultivadas en placas de cultivos de plástico. El medio de proliferación consiste en D-MEM/F-12 (GIBCO 11330-032, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) con 10% de suero fetal bovino (Notocor, Córdoba, Argentina), 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de gentamicina (Biol, Argentina) y 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anfotericina (Richet, Argentina). Después de que los cultivos celulares alcanzaron la confluencia fueron cultivados durante 24 horas en medio de mantenimiento, que es el mismo medio de cultivo pero con menor cantidad de suero fetal bovino (1.5%).

## **2.2.2 Detección de los receptores cannabinoides**

### **2.2.2.1 Detección inmunohistoquímica**

La técnica de inmunohistoquímica se realizó según lo descrito en la sección de métodos generales 1.1.2, salvo que las criosecciones de las muestras de conjuntiva eran de 7  $\mu\text{m}$ . Se usaron muestras de glándulas salivales como control positivo (Prestifilippo et al., 2006).

### **2.2.2.2 Detección por Western blots**

Para determinar por western blot la presencia de los receptores cannabinoides utilizamos los cultivos celulares de IOBA-NHC (crecidos en multipocillos de 35 mm, hasta confluencia, 3 pocillos por extracto). Las células fueron lavadas en medio de cultivo D-MEM/F-12 fresco sin suplementos y homogenizadas en el buffer de extracción. Seguimos las indicaciones detalladas en la sección general 1.1.3, a excepción de que sembramos 15  $\mu\text{g}$  de proteínas por calle, la transferencia se realizó a 100 v por 75 min.

### 2.2.2.3 Detección por RT-PCR clásica

Se utilizaron células IOBA-NHC (crecidos en multipocillos de 35 mm, hasta confluencia, 3 pocillos por extracto) fueron lavadas en medio de cultivo D-MEM/F-12 fresco sin suplementos. La extracción del ARN, la síntesis del ADNc y la amplificación por PCR se realizó siguiendo el protocolo general 1.1.4.

### 2.2.3 Agonistas y antagonistas de los CB

DROGA	ORIGEN	DOSIS	FUNCION
<b>AEA</b>	Sigma-Aldrich Chemical Co, St Louis, MO	$10^{-6}$ M	Agonista
<b>CP55,940</b> (-)-cis-3-[2-Hidroxi 4-(1,1-dimetileptil) fenil]- trans-4-(3-hidroxipropil) ciclohexanol	Tocris, Ellisville, MO	$10^{-6}$ M	Agonista
<b>AM251</b> ([N-(piperidin-1-yl)-1- (2,4-diclorofenil)- 5-(4-clorofenil)-4-etil-1H- pirazole-3-arboxamida]	Tocris, Ellisville, MO	$10 \times 10^{-6}$ M	Antagonista de CB1
<b>AM630</b> (6-Iodo-2-metil-1-[2- (4-morfolinil)etil-1H-indol-3- il](4-metoxifenil) metanone	Tocris, Ellisville, MO	$10 \times 10^{-6}$ M	Antagonista de CB2

### 2.2.4 Determinación de AMPc

La evaluación del nivel de AMP cíclico intracelular se realizó en extractos de células IOBA-NHC crecidas hasta confluencia sobre multipocillos de 24 mm. Utilizamos radioinmunoensayo (RIA) para determinarlos. Estos experimentos los realizamos en colaboración con el laboratorio de la Dra. Valeria Rettori. Se utilizó un anticuerpo contra AMPc amablemente cedido por el Dr. A. F. Parlow (National Hormone & Peptide Program, Harbor-UCLA Medical Center). La sensibilidad del ensayo fue de

0.061 pmol/ml, con un coeficiente de variación intra e interensayo de 8.1% y 10.5%, respectivamente (Prestifilippo et al., 2006).

Las monocapas de las células crecidas hasta confluencia fueron lavadas en medio DMEM/F12 sin suplementos, e incubadas con  $0.1-10 \times 10^{-6}$  M forskolina (FRSK) y  $0.5 \times 10^{-3}$  M isobutil-1-metilxantina (IBMX, ambos de Sigma-Aldrich Chemical Co, St Louis, MO), para lograr incrementar el contenido de AMPc. Las drogas fueron diluidas en el mismo medio e incubadas por 15 minutos.

Los experimentos con los ligandos de los CB fueron realizados con  $0.5 \times 10^{-6}$  FRSK ya que esta fue la mínima concentración que indujo un aumento significativo del AMPc intracelular. Se incubó con los agonistas canabinoides, antagonistas o la combinación (ver mas adelante) por 30 minutos. El medio fue descartado y la extracción se realizó con etanol inmediatamente después. Cada punto experimental incluyo de 4 a 6 pocillos. Se realizaron los ensayos tres veces. Los resultados se expresaron como pmoles de AMPc por pocillo  $\pm$  DE (desvío estándar). Las comparaciones estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism version 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com))

## 2.2.5 Ensayos de viabilidad celular

Para determinar el número de células utilizamos el ensayo de clivaje de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil tetrazolium bromido (MTT) (Mosmann, 1983), que está basado en la habilidad de las células viables, pero no las muertas de convertir el reactivo MTT en el producto coloreado formazan. Por lo cual, se mide la densidad óptica (DO) del formazan generado *in vitro* el cual es proporcional al número de células viables en cultivo. Sembramos alícuotas (100  $\mu$ l) de suspensiones celulares de IOBA-NHC en medio proliferativo en multipocillo de 96. Testeamos la linealidad en la formación de formazan sembrando distintas densidades de células por pocillos ( $10$  a  $50 \times 10^3$ ). Finalmente, realizamos los experimentos del efecto de los canabinoides con una densidad celular inicial de  $50 \times 10^3$  por pocillo.

Luego del tiempo de incubación, el medio fue eliminado y reemplazado con 0.5 mg/ml de MTT (V13154, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) disuelto en buffer fosfato estéril.

Las células fueron incubadas por 4 horas a 37°C y luego adicionamos 150 µl de alcohol isopropil alcohol/ 0.04N de HCl 0.04N para solubilizar el producto formazan. Alícuotas de 200 µl fueron transferidas y medimos la conversión de MTT (A550–A690) en un lector de microplacas (Benchamark, BioRad).

Cada experimento se realizó tres veces y cada punto experimental con 4 a 6 pocillos. Adicionamos distintas concentraciones de CP55,940 ( $0.01-10 \times 10^{-6}$  M) al momento de sembrar las células. Los inhibidores específicos para CB1 y CB2, AM251 y AM630 respectivamente, fueron adicionados a las suspensiones celulares 20 minutos antes de sembrarlas. Los cultivos fueron crecidos por 1, 2 o 3 días antes de medir la conversión de MTT.

### **2.2.6 Activación de las vías de señalización**

La fosforilación de JNK fue evaluada por la comparación de inmunoreactividad de p-JNK y JNK por western blot. Las células crecidas hasta confluencia fueron lavadas en medio sin suplementos. Las monocapas fueron incubadas en presencia de 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (G5241, Promega, Madison, WI) (Kitano et al., 2007), durante 15, 30, 60 o 240 minutos, en un medio libre de SFB.

Para evaluar los efectos de la estimulación de los receptores de los cannabinoides incubamos con CP55,940 ( $0.01-10 \times 10^{-6}$  M) 10 minutos antes de agregar el TNF- $\alpha$ . Tomamos los extractos celulares 60 minutos después de agregar la citoquina.

También evaluamos la localización subcelular de p-JNK, p-p38 y NF- $\kappa$ B después de la estimulación por 30 o 60 minutos con TNF- $\alpha$ , con o sin la adición previa de CP55,940 ( $0.01-10 \times 10^{-6}$  M). Al final del experimento las monocapas fueron fijadas con paraformaldehído al 2% en buffer fosfato. Los experimentos se realizaron 3 veces, por duplicado para cada anticuerpo.

## **2.3 Métodos para el estudio del EPR**

### **2.3.1 Tratamiento de los animales**

Al comienzo de los experimentos, los ratones BALB/c fueron mantenidos en un modulo de oscuridad total por 1 hora hasta 7 días. Durante estos períodos de total oscuridad, la alimentación y la limpieza de las cajas se realizó bajo luz roja lejana.

Además, un grupo de animales fue sometido a un ciclo de luz invertido (12 horas de luz/12 horas de oscuridad).

Los procedimientos quirúrgicos fueron realizados bajo anestesia de hidrato de cloral (400 mg/kg, intraperitoneal) y una aplicación de una gota de 0.25% proparacaina (diluida Anestalcon; Laboratorios Alcon, Buenos Aires, Argentina).

Los animales recibieron un tratamiento con melatonina (0.05 mg/kg; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) o sulpiride (50 mg/kg; Armstrong-Syncro, Buenos Aires, Argentina) que es un antagonista de los receptores D2 de la dopamina. Ambos fueron administrados vía subcutánea, los animales control recibieron un volumen similar de solución salina.

### **2.3.2 Desprendimiento de retina**

#### **2.3.2.1 Desprendimiento ex vivo**

Los tratamientos farmacológicos, la enucleación y la separación fueron realizadas bajo luz roja lejana y condiciones asépticas. La temperatura del cuarto de cirugía fue ajustada a 28°C, debido a que la temperatura puede modificar la adhesión de la retina neural con el EPR (Endo et al., 1988). Después de la enucleación, la córnea, lentes y el vítreo fueron removidos, como la incisión se realizó por detrás del limbo y se removió el nervio óptico, el EPR se puede desprender de la retina neural sin necesidad de manipulaciones adicionales.

La disección y la separación fueron realizadas en distintas soluciones: Ringer/lactato (Fidex, Buenos Aires, Argentina), solución salina balanceada de Hanks (HBSS) que contiene 136.9 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub> (6H<sub>2</sub>O),

0.41 mM MgSO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), 4.17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5.55 mM glucosa; o una solución HBSS libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (CMF-HBSS) que contiene 139.06 mM NaCl, 5.37 mM KCl, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O), 4.17 mM NaHCO<sub>3</sub> y 5.55 mM glucosa. La copa que contiene el EPR-coroides-esclera fueron inmersas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 25 mM HEPES y L-glutamina (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA).

### **2.3.2.2 Cultivos in vitro del EPR desprendido**

Pequeños discos de la región posterior del ojo compuesta por EPR-coroides-esclera fueron obtenidos con un sacabocados fabricado con una aguja de 25G, de borde afilado pero sin bisel. Los discos fueron incubados en medio de cultivo en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, durante distintos periodos de tiempo entre 0 a 24 hs.

### **2.3.2.3 Desprendimientos retinales in vivo**

Los animales recibieron una inyección subcutánea de melatonina o solución salina al mediodía, e inmediatamente transferidos al módulo de oscuridad. A las 13 horas fueron anestesiados, se dilataron las pupilas con 5% fenilefrina y 0.5% tropicamida (Fotorretin;

Laboratorios Poen, Buenos Aires, Argentina), y los ojos fueron cubiertos con una gota de 0.25% carbómero (carboxipolimetileno; Latlas, Atlas, Buenos Aires, Argentina). Los procedimientos fueron realizados bajo luz roja, excepto el desprendimiento mismo, que requiere observación del fondo de ojo. Para el DR se efectuó una inyección subretinal con una aguja 30 G insertada por detrás del limbo, en el cuadrante dorsal. El fluido, una solución 1:1 de ácido hialurónico (Hyasol; Bausch & Lomb, Buenos Aires, Argentina) y

CMF-HBSS, fue lentamente inyectado hasta observar un DR que cubría el cuadrante dorsal. La operadora que realizó los DR desconocía los tratamientos previos. Los ratones fueron eutanizados con hidrato de cloral y los ojos fueron enucleados 15 minutos después del DR. Los ojos fueron disecados en solución CMF-HBSS y las muestras fueron inmediatamente transferidos al medio de cultivo.

### **2.3.2.4 Prueba de exclusión de colorante**

Las muestras fueron incubadas en 0.1 µg/mL del colorante ioduro de propidio (IP; Sigma-Aldrich) en medio de cultivo. Después de 15 minutos, fueron lavados 4 veces en medio de cultivo fresco y luego fijados en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato durante 30 minutos. Las muestras fueron montadas en glicerol y examinadas bajo luz UV para evaluar los núcleos celulares con IP fluorescentes (Fluorescence Filter Block, TRITC, excitación 540/25, dichroic mirror 565, barrier filter 605/55; Nikon, Tokyo, Japan), y la autofluorescencia citoplasmática (Fluorescence Filter Block, UV-2 A, excitation 330/380, dichroic mirror 400, barrier filter 420; Nikon) lo cual permitió observar la continuidad de la lamina epitelial.

La incorporación de IP en los núcleos fue cuantificada en toda la copa del ojo. Los núcleos (mononucleadas y binucleadas) fueron cuantificadas en 16 campos microscópicos (64,000 µm<sup>2</sup>) cubriendo todos los cuadrantes. Seis retinas de diferentes animales se utilizaron para cada punto experimental. Se realizó un estudio ANOVA de dos vías con un post test de Bonferroni (GraphPad Prism, version 4.00 for Windows; GraphPad Software, San Diego CA).

### **2.3.3 Histoquímica de lectinas**

Los ratones fueron sujetos a diferentes condiciones de iluminación o tratamientos con melatonina. Fueron fijados por perfusión vía transcardíaca con 4% de paraformaldehído en 0.1 M, pH 7.3 de buffer fosfato. Los ojos fueron enucleados y se prosiguió las condiciones generales para obtener las criosecciones descrito en la sección 1.1.2.

Se utilizaron las lectinas Wheat germ agglutinin (WGA) y PNA para marcar la matriz interfotoreceptora. El WGA detecta la superficie de las membranas de las microvellosidades del EPR y las matrices asociadas a los conos y bastones, en cambio PNA tiñe específicamente las vainas de los conos (Johnson et al., 1986; Mieziowska et al., 1991). Las criosecciones fueron incubadas a 37°C con Texas Red-conjugated WGA (1/15; Sigma-Aldrich) o fluorescein-5 isothiocyanate-conjugated PNA (1/10; Sigma-Aldrich) por 30 minutos. La examinación se realizó inmediatamente después de la incubación bajo microscopio e imágenes confocales.

## **2.4 Métodos para el estudio de la PVR**

### **2.4.1 Modelos experimentales de PVR y DR**

Los ratones C57BL/6 fueron anestesiados con hidrato de cloral (400 mg/kg, intraperitoneal) y recibieron una gota de 0.5% propacarina (Alcon, Buenos Aires, Argentina) como anestesia local. Además, se les aplicó una gota de 5% fenilefrina y 1% tropicamida (Poen, Buenos Aires, Argentina) para que se dilate el iris y los ojos fueron cubiertos con una gota de 0.25% carbómero (carboxipolimetileno) (Latlas; Atlas, Buenos Aires, Argentina).

Las lesiones del tipo de PVR se indujeron con una inyección intravítrea de 3  $\mu$ l de dispasa (0.2 o 0.3 U/ $\mu$ l, Sigma-Aldrich, St. Louis MO) (Canto Soler et al., 2002). Realizamos fondos de ojos en los animales anestesiados y con el iris dilatado.

Los DR se realizaron con ácido hialurónico (Hyasol; Bausch y Lomb, Buenos Aires, Argentina), inyectando lentamente con una jeringa 30-gauge, insertada por detrás del limbo hasta que el desprendimiento cubrió el cuadrante dorsal. Siempre, los DR se realizaron a partir de las 20 hs. Los animales fueron sacrificados una semana después.

Los animales fueron anestesiados profundamente y perfundidos como se describe en la sección general 1.1.2.

#### **2.4.1.1 Tratamiento farmacológico**

Los ratones fueron separados al azar en dos grupos una hora después del DR o de recibir la inyección de dispasa (0.3 U/ $\mu$ l). Uno de los grupos recibió el tratamiento con tezosentan (10 mg/kg, vía subcutánea, Actelion Pharmaceuticals, Zurich, Switzerland), un antagonista dual de los receptores (Clozel et al., 1999), y el otro grupo, solución salina. Las inyecciones se repitieron diariamente y los animales fueron sacrificados al cabo de una semana. Las retinas fueron fijadas y preparadas para inmunohistoquímica o disecadas en fresco para analizar por western blot.

## **2.4.2 Muestras de membranas de PVR humanas**

Se obtuvieron muestras ( $n = 54$ , 40 epiretinales y 14 subretinal) de pacientes que sometidos a una cirugía por PVR. Las membranas de PVR fueron adheridas a un filtro Millipore estéril (Millipore, Billerica, MA) y sumergidas en un medio de fijación compuesto de paraformaldehído y ácido pícrico en buffer fosfato.

## **2.4.3 Evaluación cuantitativa de la PVR murina**

Los ojos fueron seccionados de manera seriada. Cada tres secciones (24 a 26 secciones por ojo) fueron incubados con un suero anti-GFAP policlonal y se desarrollo el procedimiento inmunoenzimático. Para comparar la severidad de las lesiones inducidas por dispa, cada sección fue evaluada por un observador ciego quien determino la presencia o ausencia de pliegues retinales, membranas epi y subretinales. Se aplicó un sistema de puntaje donde: la presencia de pliegues sumaba un punto, presencia de membrana epiretinal, 1 punto (o 2 puntos si la membrana era mas grande que la mitad de la retina) y presencia de membrana subretinal, 1 punto. El total del puntaje por cada ojo fue dividido en el número de secciones cuantificadas dando como resultado final un puntaje promedio que refleja la presencia y extensión de las lesiones de cada ojo. Las comparaciones estadísticas fueron hechas con un estudio de la varianza de dos vías, con un post test de Bonferroni (GraphPad Prism version 4.00 para Windows; GraphPad Software, San Diego, CA).

## **2.4.4 Análisis de GFAP por Western Blot**

La técnica de Western blot fue similar a la aplicada en el punto 1.1.3. Se realizaron ciertas modificaciones: se sembraron 30  $\mu\text{g}$  de proteína en cada calle, y la detección se realizó con suero 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). La densidad óptica de las bandas fue estimada utilizando el programa Scion Image  $\beta$ 4.02 Win (Scion Corp., Frederick, MD) y la comparación estadística fue hecha con un t-test no paramétrico, Mann Whitney test, utilizando el programa Graphpad Prism.

## **2.5 Métodos para el estudio de Uveítis**

### **2.5.1 Inducción de UIE y tratamiento farmacológico**

Ratones Balb/c (5-8 semanas) recibieron una única inyección peritoneal de 5 mg/Kg lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella typhimurium* (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO). A las 24 hs fueron sacrificados.

Los ratones fueron separados en cuatro grupos: Salina, LPS, LPS-T y Tez-S. Los grupos de animales que pertenecían a LPS-T o Tez-S recibieron dos dosis de tezosentan (10 mg/kg, vía subcutánea, Actelion Pharmaceuticals, Zurich, Switzerland), un antagonista de los dos receptores endotelinérgico (Clozel et al., 1999), y los otros grupos, solución salina. Los animales fueron sacrificados una hora más tarde de la segunda inyección con tezosentan. Las retinas fueron fijadas y preparadas para inmunohistoquímica o disecadas en fresco. Ver esquema de protocolo en la sección 5.

### **2.5.2 Ensayos de permeabilidad de la BHR**

Los animales fueron anestesiados profundamente con hidrato de cloral (400 mg/kg, intraperitoneal) y se se inyectó una solución al 2% (45 mg/kg) de azul de Evans (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) en el plexo retro-orbital. 20 minutos después de la inyección, los animales fueron sacrificados y los ojos enucleados rápidamente. Las retinas fueron disecadas con la metodología habitual. La retina entera fue montada sobre un portaobjetos y fotografiada rápidamente con un microscopio de fluorescencia.

## **3. Receptores canabinoides en el epitelio de la conjuntiva**

### **3.1 Introducción y objetivos específicos**

En los últimos años, numerosas publicaciones sobre los receptores canabinoides CB1 y CB2 demostraron su amplia localización tisular y gran variedad de roles como moduladores en procesos fisiológicos y patológicos. Sin embargo, todavía es insuficiente el conocimiento sobre su acción a nivel de epitelios y mucosas. Entre las células epiteliales se ha demostrado la presencia de ambos receptores en distintos linajes, entre los cuales se incluyen las células de próstata PC-3 (Sanchez et al., 2003), células epiteliales bronquiales humanas (Gkoumassi et al., 2007), queratinocitos de la piel (Maccarrone et al., 2003) y células de la glándula salival (Prestifilippo et al., 2006). En estos linajes epiteliales los canabinoides se han asociado con funciones defensivas, anti-inflamatorias e inmunomoduladoras (Wright et al., 2005).

La existencia del sistema endocanabinoide en los tejidos oculares ha sido bien documentada. La mayoría de los tejidos oculares humanos, córnea, iris, cuerpo ciliar, retina y coroides, expresan 2-AG, PEA y AEA (Chen et al., 2005). En la retina de rata existen altos niveles de 2-AG y PEA, semejantes a los encontrados en el cerebro (Straiker et al., 1999a). Se ha demostrado que actúan sobre los canales de  $Ca^{2+}$  de las células bipolares, donde podrían regular la transmisión sináptica glutamatérgica (Straiker et al., 1999a). Además, la estimulación con AEA inhibe la liberación de dopamina (Schlicker et al., 1996).

La presencia de CB1 en la retina neural se ha demostrado en distintas especies, tales como mono rhesus, ratón, rata, pollo, pececillo dorado y salamandra (Straiker et al., 1999a). CB1 se expresa principalmente en las células horizontales y en las bipolares de los bastones, lo que indicaría un rol de los canabinoides en la visión escotópica. En cambio la enzima FAAH, que controla la degradación de AEA, presenta una distribución más extensa. La inmunoreactividad más intensa se observa en las células

ganglionares, en menor medida en células horizontales, amacrinas y en la capa plexiforme interna (CPI). Además, aparece inmunoreactividad CB1 de aspecto puntiforme en la capa plexiforme externa (CPE) y en la CPI (Straiker et al., 1999a; Yazulla et al., 1999). CB2 también se encuentra en la retina de rata y ratón. Su ARNm se observa en las células ganglionares, la capa nuclear interna (CNI) y en los segmentos internos de los fotorreceptores (Lu et al., 2000). La estimulación de los receptores canabinoides, principalmente CB1 es neuroprotectora en la uveítis experimental (Chen et al., 2005). De manera similar, en ratas diabéticas los canabinoides logran disminuir la neuroinflamación. Previenen la pérdida de la barrera hemato-retinal y la muerte neuronal, aparentemente, por disminución de la producción de radicales libres y citoquinas proinflamatorias (El-Remessy et al., 2006).

En tejidos humanos, CB1 se encuentra en el epitelio ciliar, el epitelio y endotelio de la córnea, en la red trabecular y el canal de Schlemm, en músculo ciliar y en los vasos del cuerpo ciliar (Straiker et al., 1999b). En la red trabecular, la activación de CB1 y CB2 se asocia con cambios en el flujo del humor acuoso y la presión intraocular (He and Song, 2007; McIntosh et al., 2007; Zhong et al., 2005).

Aunque cada receptor canabinoide presenta ligandos específicos, ambos receptores comparten ciertas propiedades bioquímicas y farmacológicas (Felder et al., 1995). La inhibición de la adenilato ciclasa (AC) es una respuesta muy bien caracterizada en cerebro y células neuronales que expresan CB1. Esto también ocurre en los linfocitos humanos y bazo de ratón que expresan CB2 (Howlett et al., 2002). Además, pueden activar las MAP quinasas y la vía de sobrevivencia Akt/PKB. Los efectos de los canabinoides varían según el fenotipo celular (Guzman, 2005). En los esplenocitos disminuyen la expresión nuclear de los factores de transcripción c-fos y c-Jun (Faubert and Kaminski, 2000), mientras que en las células CHO activan la quinasa c-jun terminal (JNK) y la quinasa p38 (Rueda et al., 2000). En el hipocampo, los ligandos canabinoides también activan la MAPK p38, pero no JNK (Derkinderen et al., 2001).

Hasta el momento no existe información específica sobre la conjuntiva, por lo cual el estudio del sistema endocanabinoide en el epitelio de la superficie ocular constituye el objetivo central de esta sección. La preservación de la barrera de la superficie ocular requiere un complejo control de la proliferación celular y de los mecanismos

inflamatorios, los cuales podrían ser regulados por el sistema endocanabinoide. En este sentido se exploró la presencia y ciertas propiedades de los receptores canabinoides en las células de epitelio conjuntival humano y murino.

Los objetivos específicos fueron:

- a. Determinar la presencia de los receptores canabinoides CB1 y CB2 en el epitelio de la conjuntiva normal murina, en biopsias humanas y en una línea normal celular derivada de la conjuntiva humana IOBA-NHC.
- b. Determinar la capacidad funcional de los receptores CB1 y CB2 en las células IOBA-NHC por medio de cambios en los niveles de AMPc y proliferación celular.
- c. Evaluar la participación de CB1 y CB2 en la activación de distintas moléculas de estrés luego de la estimulación de las células IOBA-NHC con la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$ .

## **3.2 Resultados**

### **3.2.1 Superficie ocular del ratón**

Se detectó inmunorreactividad CB1 y CB2 en todo el epitelio conjuntival (Figura 3.1, A y B). La inmunorreactividad CB1 fue máxima en el fórnix, donde la capa más externa del epitelio aparecía más intensamente teñida que las capas basales (Figura 3.1, A y C). La diferencia entre los estratos desapareció en las regiones donde el epitelio de la conjuntiva era más delgado.

El patrón de inmunorreactividad CB2 mostró una fuerte inmunotinción en casi todas las capas del epitelio de la conjuntiva (Figura 3.1, B y D), con los máximos niveles en el fórnix y en la conjuntiva bulbar. Todos los anticuerpos contra CB1 y CB2 exhibieron el mismo patrón de tinción.

### **3.2.2 CB1 y CB2 en la conjuntiva humana**

#### **3.2.2.1 Inmunohistoquímica en biopsias e improntas**

Los antisueros contra CB1 y CB2 tiñeron intensamente el epitelio conjuntival en criosecciones de muestras humanas. La inmunoreactividad CB1 y CB2 aparecieron en todas las capas del epitelio, incluidas las células caliciformes. Además, el antisuero contra CB2 inmunotizó los vasos sanguíneos y algunas escasas células ubicadas en el estroma (Figura 3.2, A-C).

Las improntas conjuntivales mostraron las típicas células de forma poligonal con algunas células caliciformes. Todas las células epiteliales exfoliadas fueron también intensamente teñidas por los anticuerpos CB1 y CB2 (Figura 3.2, D y E), generalmente con un patrón finamente granular. No se encontraron diferencias entre las muestras bulbares y tarsales.

#### **3.2.2.2 Inmunohistoquímica en células IOBA-NHC**

También se encontró intensa inmunorreactividad CB1 y CB2 en las monocapas de células IOBA-NHC. Estas células poligonales, con grandes núcleos, mostraron fuerte inmunoreactividad citoplasmática, generalmente con un patrón puntiforme muy fino,

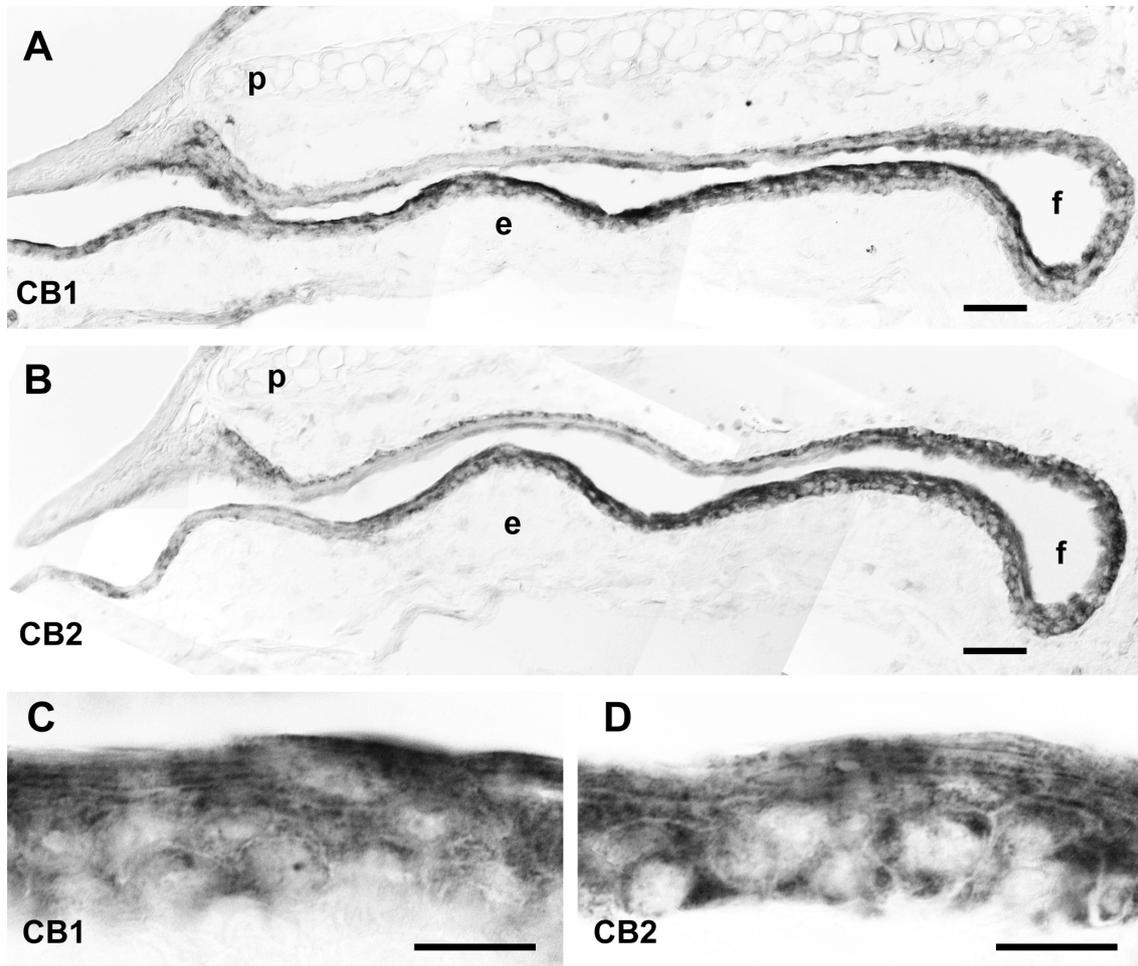


Figura 3.1. Detección de CB1 y CB2 mediante procedimiento inmunoenzimático. A: Este fotomontaje a bajo aumento del saco conjuntival dorsal muestra la inmunoreacción de CB1. La marca es más intensa en la región del fórnix (f) y en la región bulbar, donde aparece en todas las capas epiteliales. La marca es menor en la conjuntiva tarsal, pero nótese el acúmulo de células inmunomarcadas en la zona transicional con la epidermis palpebral (p). e, esclera. B: Un corte consecutivo muestra una distribución semejante de CB2, cuya inmunoreactividad es más intensa en el fórnix, la conjuntiva bulbar y el margen palpebral. C: A mayor aumento, el epitelio del fórnix muestra inmunoreactividad de CB1 en todas sus capas, que es más intensa en las células superficiales. D: La inmunoreactividad de CB2 fornical presenta un patrón similar, con la tinción más intensa en las capas superiores. Calibración, A y B, 100  $\mu$ m; C y D, 25  $\mu$ m.

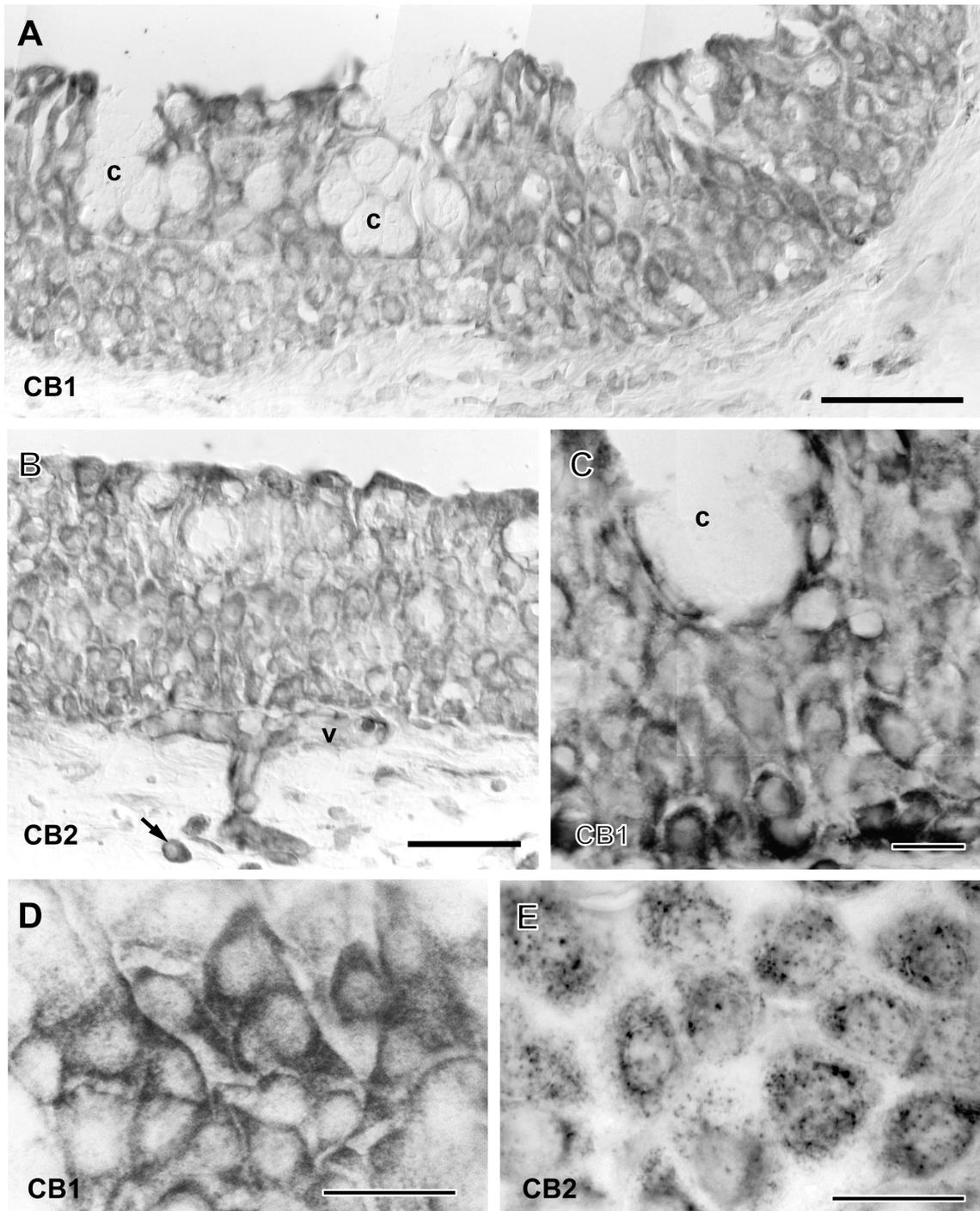


Figura 3.2. Receptores canabinoides CB1 y CB2 en conjuntiva humana. A: Este fotomontaje muestra inmunoreactividad CB1 en todas las capas epiteliales. c, células caliciformes. B: La inmunorreactividad CB2 muestra una distribución semejante en el epitelio, pero también aparece en el endotelio vascular (v) y en células en el estroma (flecha). C: A mayor magnificación se observa una célula caliciforme, con fuerte inmunoreactividad citoplasmática alrededor de la gota de secreción mucosa. Las células epiteliales vecinas a la célula caliciforme también presentan intensa inmunoreactividad. D: En esta muestra obtenida por exfoliación conjuntival se observa intensa inmunoreactividad CB1 en todas las células desprendidas. E: En las células exfoliadas también aparece intensa inmunorreactividad CB2. Calibración, A y B, 50  $\mu$ m; C-E, 25  $\mu$ m.

que probablemente refleja la presencia de los receptores en vesículas citoplasmática y dominios de la membrana (Figura 3.3, A y B). En los Western blots de los extractos de células IOBA-NHC (n = 3) aparecieron las bandas correspondientes a CB1 y CB2a, con un peso molecular de 60 kDa y 45 kDa, respectivamente (Figura 3.3, C).

### **3.2.2.3 Transcriptos de CB1 y CB2**

Para evaluar la expresión de los ARNm de CB1 y CB2 en células IOBA-NHC, se aisló y analizó por RT-PCR clásica el ARN total de estas células. Se detectó los amplicones correspondientes a los ARNm de CB1 y CB2 con una longitud de 309 bp y 337 bp, respectivamente. Ambas secuencias fueron detectadas en cuatro extractos diferentes de ARN de células IOBA-NHC (Figura 3.3, D). No se observaron amplicones en los controles negativos, donde el paso de transcripción reversa fue omitido.

### **3.2.3 AMPc y ligandos canabinoides**

La regulación de los niveles intracelulares de AMPc, así como otras respuestas funcionales de los ligandos canabinoides, fue estudiada en cultivos de células IOBA-NHC. La inhibición de la fosfodiesterasa por el IBMX ( $0.5 \times 10^{-3}$  M) no indujo cambios en los niveles intracelulares de AMPc en las células IOBA-NHC. Solo se observó un aumento cuando la adenilato ciclasa fue simultáneamente activada con FRSK (Figura 3.4, A). Los aumentos de AMPc fueron significativos en presencia de  $0.5 \times 10^{-6}$  M FRSK.

La adición del canabinoide AEA ( $10^{-6}$  M) redujo significativamente los niveles intracelulares de AMPc en presencia de  $0.5 \times 10^{-3}$  M IBMX y  $0.5 \times 10^{-6}$  M FRSK (Figura 3.4, B). Estas fueron las condiciones utilizadas en los siguientes experimentos.

Los antagonistas específicos de CB1 y CB2, AM251 ( $10 \times 10^{-6}$  M) y AM630 ( $10 \times 10^{-6}$  M), revirtieron la reducción de AMPc producida por AEA (Figura 3.4, C). Se infiere entonces que ambos receptores CB1 y CB2 participan en la regulación de los niveles de AMPc. Bajo las mismas condiciones de estimulación de la adenilato ciclasa, la incubación con el canabinomimético selectivo CP55,940 ( $10^{-6}$  M) también redujo los niveles intracelulares de AMPc (Figura 3.4, D). Como este compuesto no se une a los receptores de tipo vanilloide, estos resultados confirman que la disminución observada en los niveles de AMPc dependió de los receptores canabinoides. También en este caso,

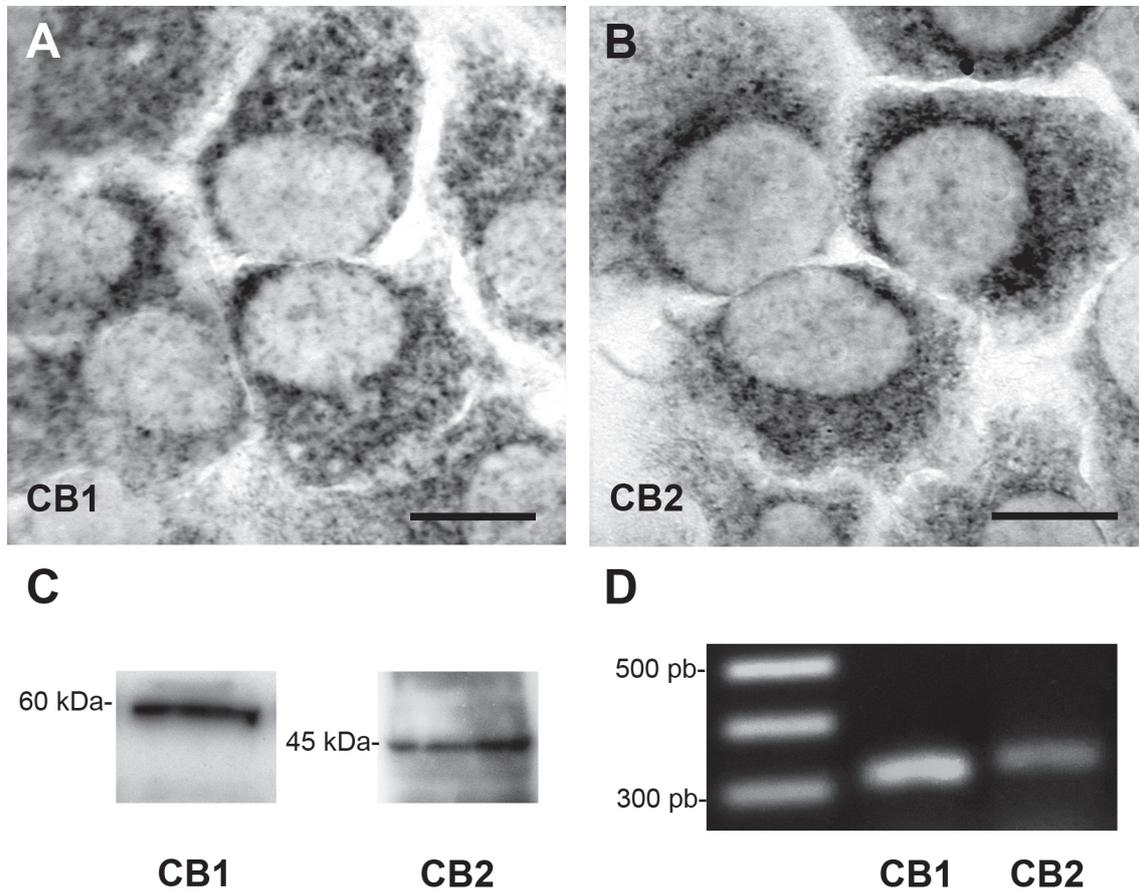


Figura 3.3. Detección de los receptores canabinoides CB1 y CB2 en monocapas IOBA-NHC. A: En una monocapa confluyente, todas las células exhiben inmunoreactividad CB1. La marca muestra un patrón granular. B: Estas monocapas también presentan inmunorreactividad CB2 con un patrón granular similar al anterior. Calibración, 10  $\mu$ m. C: Estos inmunoblots de las proteínas CB1 y CB2 en extractos de células IOBA-NHC muestran una única banda positiva (PM 60 kDa y 45 kDa, respectivamente) para cada receptor. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. D: RT-PCR de los ARNm correspondientes a CB1 y CB2 en extractos de células IOBA-NHC. Las calles del gel, que representa 4 experimentos independientes, muestran primero los estándares de peso molecular (500-300 pb) y luego los amplicones de CB1 y CB2 (309 y 337 pb, respectivamente) obtenidos después de 35 ciclos de PCR.

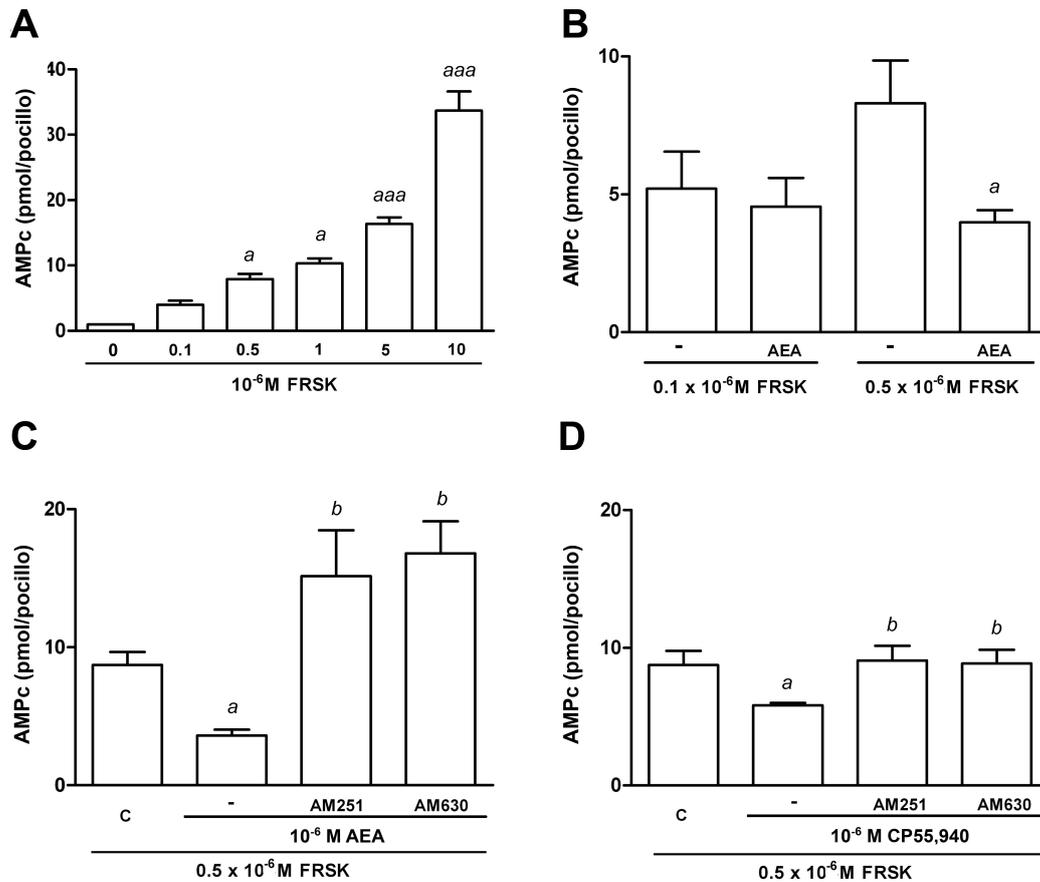


Figura 3.4. Concentraciones de AMPc intracelular en monocapas de células IOBA-NHC en presencia del inhibidor de la fosfodiesterasa (IBMX,  $0.5 \times 10^{-3}$  M), expresadas como pmol/pocillo  $\pm$  DE. Cada punto representa el promedio de 4-6 pocillos de tres experimentos independientes. A: Para incrementar los niveles intracelulares de AMPc se ensayaron distintas concentraciones (0 a  $10 \times 10^{-6}$  M) de forskolina (FRSK), activador de la adenilato ciclasa (AC). El ANOVA de una vía seguido por prueba de comparación múltiple de Tukey, demuestra un incremento significativo para las concentraciones mayores a  $0.5 \times 10^{-6}$  M (a, comparaciones con los valores del control sin FRSK; a,  $P < 0.05$ , aaa,  $P < 0.001$ ). B: La concentración de AMPc se reduce en presencia de AEA ( $1 \times 10^{-6}$  M). La reducción es estadísticamente significativa solo en cultivos tratados con  $0.5 \times 10^{-6}$  M FRSK (prueba t; a,  $P < 0.05$ ). Dicha concentración se utilizó en los siguientes experimentos. C: Los antagonistas específicos CB1 y CB2, AM251 ( $10 \times 10^{-6}$  M) y AM630 ( $10 \times 10^{-6}$  M) revirtieron la disminución de AMPc inducida por  $1 \times 10^{-6}$  M AEA. c, control sin AEA. La prueba de t demuestra diferencias significativas. a, comparaciones con el control; b, comparaciones con AEA; a o b,  $P < 0.05$ . D: El canabimimético selectivo CP55,940 ( $10^{-6}$  M) también disminuye en forma significativa los niveles de AMPc intracelulares. c, control sin CP55,940. El efecto del canabinoide no se observa en presencia de AM251 ( $10 \times 10^{-6}$  M) o AM630 ( $10 \times 10^{-6}$  M) (prueba de t; a, comparaciones con los valores control; b, comparaciones sin CP55,940; a o b,  $P < 0.05$ ).

los antagonistas específicos para CB1 y CB2 revertir los efectos de CP55,940. No se encontraron efectos aditivos de AM251 y AM630.

### **3.2.4 Canabinoides y crecimiento de los cultivos**

A fin de determinar la concentración celular óptimo, se evaluó la producción de formazán en función del número de células sembradas por pocillo, en el rango  $10-50 \times 10^3$  ( $n = 5$  pocillos por punto experimental) (Figura 3.5, A). Los coeficientes de regresión lineal ( $r^2$ ) obtenidos para 1, 2 y 3 días in vitro (div) fueron 0.87, 0.89 y 0.90, respectivamente. De este modo, la concentración utilizada en adelante fue  $20 \times 10^3$  células/pocillo. Se evaluaron los efectos de ligandos canabinoides con incubaciones de 1, 2 y 3 días. Ensayamos concentraciones crecientes de CP55,940 (0.01- a  $10 \times 10^{-6}$  M,  $n = 4$  pocillos por cada punto experimental, 3 experimentos diferentes).

Los cultivos incubados en presencia de CP55,940 produjeron mayor cantidad de formazán que los no tratados (Figura 3.5, B). Después de 1 div, se encontraron incrementos significativos con las concentraciones menores de CP55,940 ( $0.01$  y  $0.10 \times 10^{-6}$  M), mientras que las concentraciones mayores no tuvieron efectos detectables sobre el número de células. Esta tendencia se intensificó después de 2 y 3 div, cuando se detectaron aumentos en el número de células para concentraciones de  $0.01$  a  $1.00 \times 10^{-6}$  M CP55,940. El mayor incremento se obtuvo con  $0.10 \times 10^{-6}$  M CP55,940. Por el contrario, después de la incubación con  $10 \times 10^{-6}$  M CP55,940 el número de células fue semejante al observado en los cultivos sin activación canabinoidea.

Los antagonistas específicos de CB1 y CB2, AM251 y AM630, fueron evaluados a dos concentraciones diferentes,  $0.1-$  y  $1 \times 10^{-6}$  M ( $n = 4$  pocillos por cada punto experimental, 3 experimentos diferentes). En los cultivos celulares sin CP55,940, ambos antagonistas disminuyeron parcialmente el número de células después de 1 div, aunque el descenso solo fue estadísticamente significativo en los cultivos tratados con  $1 \times 10^{-6}$  M AM630 (Figura 3.6). El efecto directo de los antagonistas de CB1 y CB2 fue mayor a los 2 y 3 div, cuando tanto las concentraciones altas como las bajas de AM251 y AM630 redujeron significativamente el crecimiento de los cultivos.

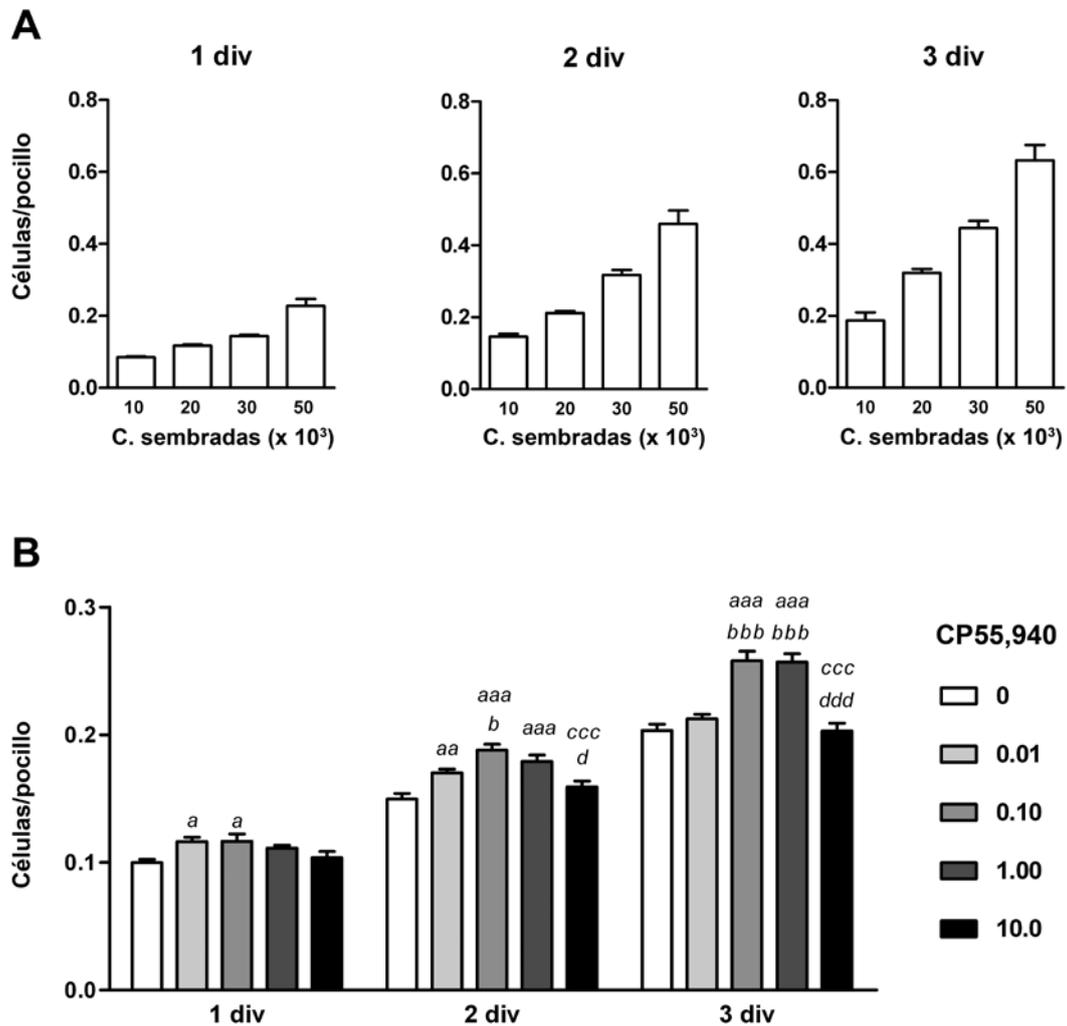


Figura 3.5. Detección con formazán del crecimiento celular después de 1, 2 y 3 días in vitro (div) en medio de proliferación. A: Se observa correlación lineal entre la producción de formazán y el número de células sembradas ( $n = 5$  pocillos por punto experimental;  $r_2$ , 0.87, 0.89 y 0.90 para 1, 2 y 3 div respectivamente). B: Ensayamos concentraciones crecientes de CP55,940 (0.01- a  $10 \times 10^{-6}$  M, barras grises más intensas) sobre el crecimiento celular ( $20 \times 10^3$  células/pocillo;  $n = 4$  pocillos por punto experimental, 3 experimentos diferentes). El ANOVA de dos vías, con un post-test de Bonferroni muestra diferencias significativas. a, diferencia con el control; b, c, d, diferencias con 0.01-, 0.10- y  $1.0 \times 10^{-6}$  M de CP55,940, respectivamente. a,  $P < 0.05$ , aa,  $P < 0.01$ , aaa,  $P < 0.001$ . Similares valores se aplican a los otros símbolos. Se observan aumentos en el número celular, que son mayores a los 2 y 3 días. No aparecen cambios con respecto al control a concentraciones de  $10^{-6}$  M.

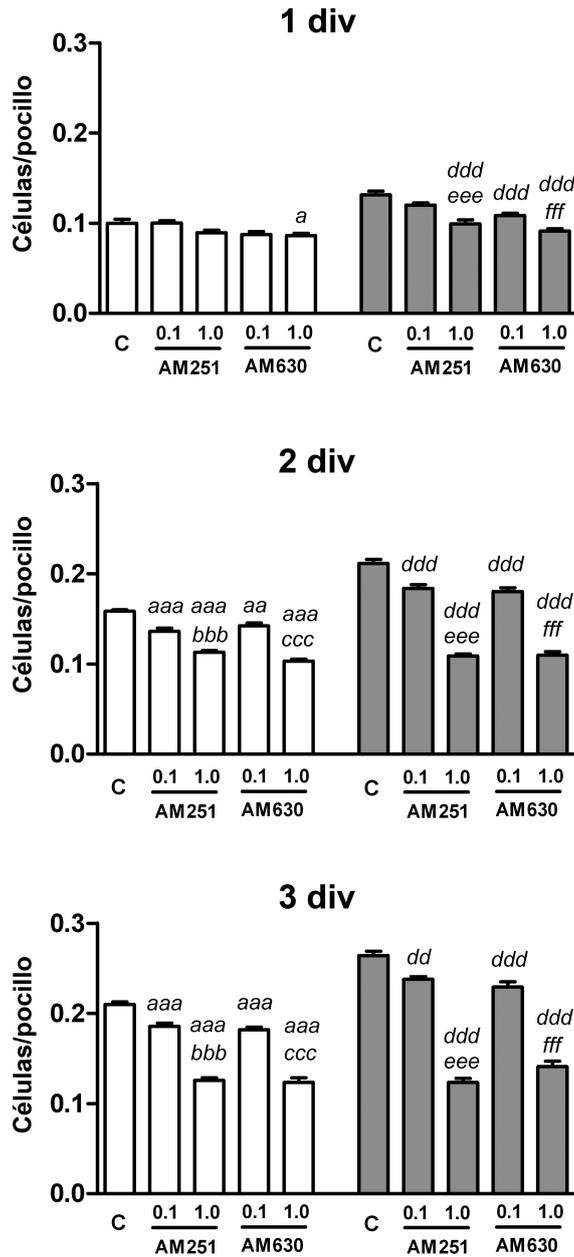


Figura 3.6. Efecto de los antagonistas de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 sobre el crecimiento celular en células IOBA-NHC en medio de proliferación. Se comparan (columnas blancas y grises, respectivamente) cultivos sin tratamiento y otros tratados con  $0.1 \times 10^{-6}$  M CP55,940 ( $n = 4$  pocillos por punto experimental, 3 experimentos diferentes). Se muestran comparaciones estadísticas seleccionadas (ANOVA de una vía, seguido del test de Tukey de múltiples comparaciones). a, diferencias con el control; b y c, diferencias entre concentraciones de AM251 y AM630 en los experimentos sin cannabinoides exógenos. En los cultivos incubados con CP55,940: d, diferencia con el control; e y f, diferencias entre concentraciones de AM251 y AM630, respectivamente. a,  $P < 0.05$ , aa,  $P < 0.01$ , aaa,  $P < 0.001$ . Se aplicaron similares valores para otros símbolos. En ausencia de CP55,940 la concentración más alta de AM630 muestra descenso significativo con respecto a los controles con 1 div. Después de 2 y 3 div ambos antagonistas reducen el crecimiento celular. En los cultivos tratados con CP55,940, ambos antagonistas revierten completamente los incrementos inducidos en el número celular. La magnitud del efecto aumenta a los 2 y 3 div.

Asimismo, ambos antagonistas redujeron el aumento del número de células producido por CP55,940 ( $0.1 \times 10^{-6}$  M). En los cultivos de 1 día, las concentraciones mayores de AM251 y AM630 ( $1 \times 10^{-6}$  M) revirtieron completamente el efecto estimulante de CP55,940. En las concentraciones menores, equimolares a la concentración de CP55,940, estos antagonistas solo lograron una reversión parcial. En cultivos de 2 y 3 días, las concentraciones más altas de los antagonistas redujeron el crecimiento de los cultivos a los niveles observados en ausencia de CP55,940. Las concentraciones menores también disminuyeron significativamente el número de células (Figura 3.6).

### **3.2.5 Canabinoides y marcadores de estrés**

Se estudio el efecto de los canabimiméticos sobre la activación de JNK y el NF- $\kappa$ B (p65) inducida por TNF- $\alpha$ , ya que esta citoquina esta incrementada en los fluidos lacrimales y en el epitelio conjuntival de pacientes que sufren algunas condiciones inflamatorias (Luo et al., 2004; Pflugfelder et al., 1999). Se evaluó por medio de Western blot las dos isoformas de JNK, p54 y p46 como así también las correspondientes moléculas fosforiladas, p-p54 y p-p46. En cultivos confluentes y no estimulados de células IOBA-NHC, las formas fosforiladas no superaron el límite de detección (Figura 3.7, A). Estas aparecieron después de la estimulación con TNF- $\alpha$ , p-p46 a los 15 minutos y p-p54 a los 30 minutos. Ambas formas fosforiladas permanecieron elevadas por 1 hora o más. Después de 4 horas, p-p46 había disminuido y p-p54 ya no pudo ser detectada. Durante este período de tiempo no se detectaron cambios en los niveles de las isoformas no fosforiladas (Figura 3.7, A). La adición de CP55,940, 10 minutos antes del estímulo con TNF- $\alpha$ , redujo notablemente los niveles de p-JNKs inducidos por esta citoquina. La reducción de p-JNK fue dosis-dependiente, desde la disminución observada con la concentración más baja de CP55,940 ( $0.01 \times 10^{-6}$  M) a la anulación total con concentraciones 1 o  $10 \times 10^{-6}$  M de CP55,940 (Figura 3.7, B).

Del mismo modo, no se detectó p-JNK por medio de inmunohistoquímica en las monocapas controles. La inmunoreactividad p-JNK se hizo manifiesta después de 30 minutos de incubación con TNF- $\alpha$ . Disminuyó después de incubaciones más largas y no se encontró en el núcleo de las células. La inmunoreactividad de p-JNK inducida por la

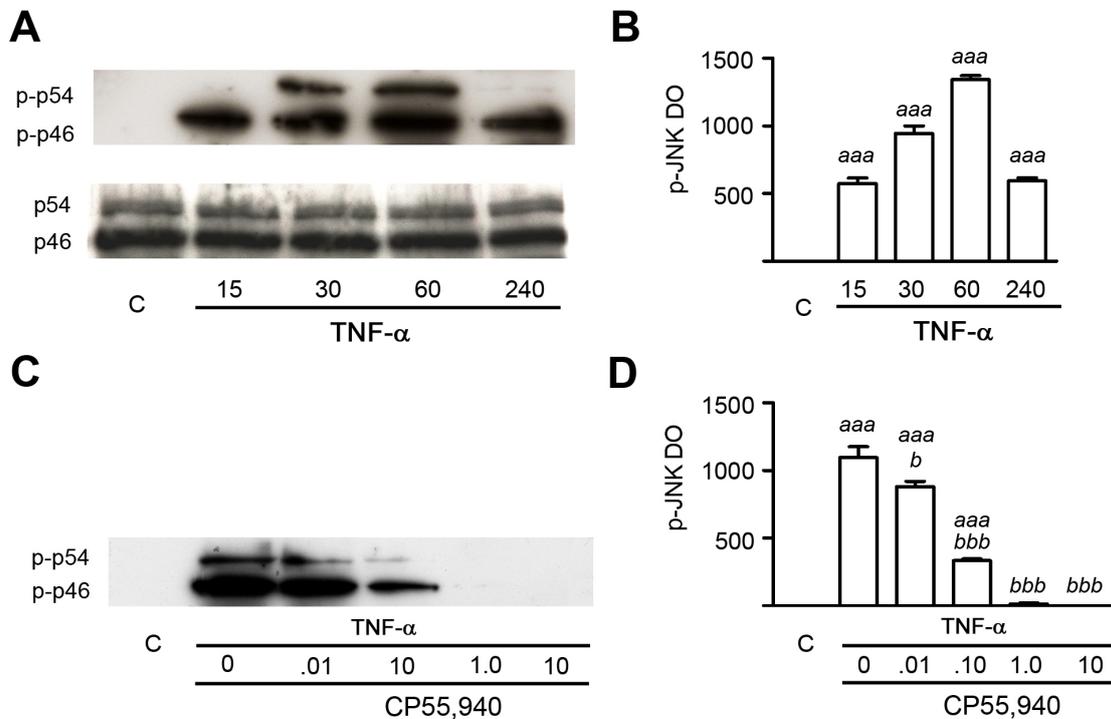


Figura 3.7. Efectos de CP55,940 sobre la activación de JNK inducida por TNF- $\alpha$  en células IOBA-NHC. A: Inmunoblots que muestran la concentración de p-JNK. No aparecen isoformas fosforiladas p-JNK en los cultivos no estimulados ( $t = 0$ ), a los 15 minutos aparece p-p46, y a los 30 minutos p-p54. La máxima activación de ambas isoformas ocurre entre 30 y 60 minutos, y su desaparición es casi total después de 240 minutos. No se detectan cambios de las isoformas no fosforiladas (p54 y p46) durante este período. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. B: Gráfico de barras que representan media  $\pm$  DE de la suma p-p46 y p-p54 para cada periodo de tiempo. Los cambios con respecto a  $t = 0$  son estadísticamente significativos (ANOVA de una vía, seguida del test de Tukey de comparaciones múltiples; aaa,  $P < 0.001$ ). C: Inmunoblots que muestran los efectos de la activación por TNF- $\alpha$  en cultivos tratados con CP55,940. Se observa reducción o desaparición del efecto en forma dependiente de la concentración ( $0.01$ - $10 \times 10^{-6}$  M). c, control sin CP55,940 ni TNF- $\alpha$ . D: Gráfico de barras que muestra la suma de las densidades ópticas de ambas isoformas ( $n = 3$  experimentos; medias  $\pm$  DE). Las comparaciones estadísticas (ANOVA de una vía, seguida del test de Tukey de comparaciones múltiples) muestran diferencias significativas con respecto a los controles, sin TNF- $\alpha$  (aaa,  $P < 0.001$ ), y TNF- $\alpha$  sin CP55,940 (b,  $P < 0.05$ , bbb,  $P < 0.001$ ).

incubación con TNF- $\alpha$  durante 30 minutos desapareció cuando CP55,940 fue adicionado 10 minutos antes que la citoquina (Figura 3.8, A).

En condiciones basales, las células IOBA-NHC mostraron intensa inmunoreactividad p-p38 que no fue modificada por el tratamiento con TNF- $\alpha$ .

En idénticas condiciones, la inmunorreactividad NF- $\kappa$ B, detectada con antisuero contra la proteína p65, se observó exclusivamente en el citoplasma. Solo se detectó inmunotinción nuclear después de 30 minutos de incubación con TNF- $\alpha$ . La translocación nuclear no ocurrió cuando los cultivos fueron preincubados con CP55,940 antes de estimular con TNF- $\alpha$  (Figura 3.8, B).

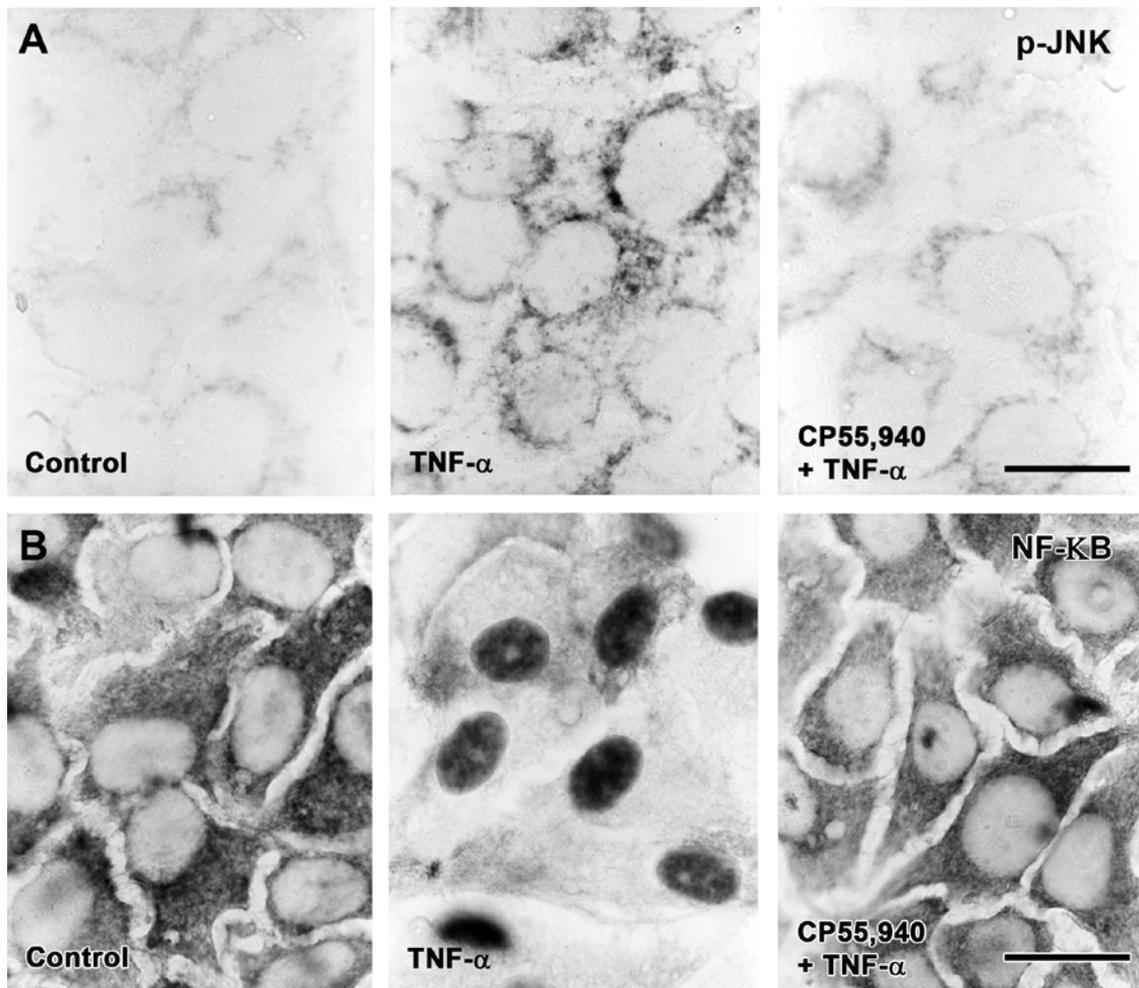


Figura 3.8. Inmunoreactividad de JNK activada (p-JNK) y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B en cultivos de células IOBA-NHC en tres condiciones experimentales: controles sin tratamiento (columna izquierda), TNF- $\alpha$  (columna central) y TNF- $\alpha$  + CP55,940 (columna derecha). A: Bajo condiciones control, las células presentan poca o ninguna marca p-JNK. Esta aumenta notablemente después de 30 min con TNF- $\alpha$ , pero se mantiene en condiciones basales cuando los cultivos son estimulados con CP55,940. B: Los cultivos en condiciones basales muestran NF- $\kappa$ B citoplasmática, mientras que después de la estimulación con TNF- $\alpha$  aparece en el núcleo celular. CP55,940 previene la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B. Calibración para todas las figuras, 25  $\mu$ m.

## 3.3 Discusión

Los hallazgos descritos en este capítulo proporcionan información sobre las funciones del sistema endocanabinoide en la superficie ocular, que no habían sido previamente descrita. En el epitelio conjuntival humano y murino se detectaron los receptores canabinoides, CB1 y CB2, mediante antisueros contra diferentes epítopes de cada receptor. Asimismo, amplificamos por RT-PCR los transcritos de los receptores en una línea celular derivada de la conjuntiva humana. Más importante aún, se halló una asociación de estos receptores con la activación de cascadas de señalización relacionadas con los procesos inflamatorios y con la proliferación de las células del epitelio conjuntival.

### 3.3.1 CB1 y CB2 en el epitelio de la conjuntiva

En los ratones, el epitelio conjuntival mostró inmunoreactividad para ambos receptores canabinoides en toda la extensión de su superficie. La mayor inmunoreactividad se observó en la región del fórnix y la menor en la conjuntiva palpebral. En cada región, la marca era más intensa en las células más externas, es decir el compartimiento epitelial no proliferativo. Aunque con menor intensidad, también se encontró intensa marca CB1 y CB2 en el compartimiento progenitor del epitelio conjuntival, compuesto por las capas basal y suprabasal (Zajicek et al., 1995). Además, una baja inmunoreactividad en la conjuntiva palpebral, donde se encontrarían, en la rata, abundantes células troncales del epitelio conjuntival (Chen et al., 2003a). Esta diferencia en los niveles de inmunoreactividad en los distintos compartimientos epiteliales podría sugerir una relación con los procesos de proliferación y diferenciación del epitelio.

En las muestras humanas, se encontró inmunoreactividad CB1 y CB2 en las células de revestimiento y en las células caliciformes del epitelio conjuntival. Es probable que los canabinoides participen en la regulación de la secreción de las células caliciformes. En este sentido, cabe destacar que hemos demostrado la inhibición de la secreción salival en la rata por acción de los endocanabinoides (Prestifilippo et al., 2006). En el epitelio respiratorio expuesto a una infección viral,  $\Delta^9$ -THC reduce los niveles del ARNm de la mucina5AC y la metaplasia mucosa (Buchweitz et al., 2007).

### 3.3.2 Respuestas funcionales de CB1 y CB2

Los agonistas de los receptores canabinoides redujeron los niveles de AMPc evidenciando que estos receptores están asociados con la adenilato ciclasa en las células conjuntivales. Dado que la reducción fue similar para AEA y para CP55,940 se puede asumir que el efecto depende de los receptores canabinoides, ya que CP55,940 los activa específicamente sin influir sobre los receptores vanilloides. El efecto de los antagonistas específicos AM251 y AM630 confirmó esta hipótesis. El control de la cascada de la AC podría estar directamente envuelto en la proliferación (Stork and Schmitt, 2002) y en las respuestas anti-inflamatorias (Herring and Kaminski, 1999).

El rol de los endo- y exocannabinoides en la proliferación ha sido principalmente estudiado en células cancerígenas. Se han publicado resultados dispares con respecto a este ítem, según la naturaleza de las células blanco y de su estado proliferativo o de diferenciación. La evidencia disponible hasta el momento indica que la inhibición del crecimiento es mayor en las células cancerosas que en las no cancerosas (Guzman, 2005; Ligresti et al., 2006). De todas maneras, no sorprendería que la inhibición de la proliferación celular fuese un efecto farmacológico, dado que es común observar este fenómeno después de administrar altas dosis de exocannabinoides. En contraposición, en células tumorales (Hart et al., 2004) y células B normales humanas (Derocq et al., 1995), la estimulación con los cannabinoides a concentraciones nanomolares induce un estado proliferativo. Aquí se demostró en la línea celular derivada de conjuntiva humana IOBA-NHC que los efectos de los cannabinoides sobre la proliferación celular dependen críticamente de la concentración de los agonistas, ya que el efecto desaparece a concentraciones altas de CP55,940 ( $10 \times 10^{-6}$  M).

Llamativamente, la incubación con los antagonistas AM251 y AM630 incrementó los niveles de AMPc más allá de los valores control. De manera similar, estas drogas disminuyeron el crecimiento por debajo del nivel control. Aunque la activación de los receptores usualmente es un fenómeno dependiente de la unión del ligando, varios GPCRs, incluyendo CB1 y CB2, muestran una actividad constitutiva significativa. Esto podría explicar el efecto tipo agonista inverso de AM251 y AM630 (Pertwee, 2006).

Los GPCRs activos son endocitados desde la membrana plasmática y a menudo exhiben una localización intracelular (Milligan, 2003). La distribución granular de la inmunorreactividad CB1 y CB2 probablemente refleja una localización vesicular, que podría corresponder a activación constitutiva de estos receptores, ya por sus características funcionales o por estimulación autócrina. Esta actividad sostenida del sistema endocanabinoide podría explicar la fuerte expresión basal de p-p38 en las células IOBA-NHC.

### **3.3.3 Bloqueo de las cascadas de estrés por la activación de CB1 y CB2**

Los resultados descritos en este capítulo muestran que CP55,940 bloquea la activación de JNK y de NF-KB inducida por TNF- $\alpha$  en las células del epitelio conjuntival. Estos cambios implican un rol anti-inflamatorio de los ligandos canabinoides, y esto resulta de suma importancia, ya que podría contribuir al manejo de enfermedades inflamatorias de la superficie ocular. Se sabe que en los pacientes con queratoconjuntivitis asociada a ojo seco existe un importante aumento de TNF- $\alpha$  en el epitelio conjuntival (Solomon et al., 2001). Esta citoquina también aumenta rápidamente en las células epiteliales por efecto de endotoxina (Liang et al., 2006) o en el estrés hiperosmolar (Li et al., 2006).

Aunque p38 podría también estar involucrado en el fenómeno inflamatorio conjuntival (Luo et al., 2004), su expresión basal en las células IOBA-NHC era muy alta e impidió estudiar los efectos de TNF- $\alpha$ .

En condiciones basales solo se detectó inmunoreactividad NF-kB (p65) en el citoplasma de las células IOBA-NHC. Una distribución similar fue descrita en el epitelio conjuntival de ratones normales in vivo (Kase et al., 2004). La translocación nuclear de este factor de transcripción, que en nuestro modelo in vitro fue inducido por TNF- $\alpha$ , también se encuentra en casos de queratoconjuntivitis o después de raspado experimental (Kase et al., 2004). En consecuencia, la prevención de esta translocación por los canabinoides podría contribuir al control de las situaciones de inflamación. La atenuación de la respuesta a TNF- $\alpha$  por acción de los canabinoides ha sido demostrada en otros sistemas (Gkoumassi et al., 2007; Rajesh et al., 2007). Sin embargo, la

interacción entre los cannabinoides y los mecanismos inflamatorios es bastante compleja. Además de activar las cadenas de estrés, TNF- $\alpha$  también aumenta la producción de endocannabinoides, y en contraposición, la estimulación por los cannabinoides disminuye la secreción de TNF- $\alpha$  observada en numerosas condiciones inflamatorias (De Filippis et al., 2007). El efecto neto sería anti-inflamatorio, ya que el aumento del tono endocanabinoide, que por lo menos parcialmente actúa vía CB1 y CB2, disminuye el daño epitelial en la inflamación intestinal (Di Marzo and Izzo, 2006).

En resumen, estos resultados sugieren que los receptores cannabinoides del epitelio conjuntival desempeñan un papel importante en el mantenimiento de este epitelio. Se requieren nuevos estudios para determinar si solamente participan en el recambio epitelial normal o si su activación también participaría en la metaplasia epitelial, un hallazgo frecuente en las enfermedades de la conjuntiva. Por otra parte, su acción contraria a la de TNF- $\alpha$  indica que tendrían un importante papel en las enfermedades inflamatorias de la superficie ocular.

## 4. Melatonina y relaciones retina-EPR

### 4.1 Introducción y objetivos específicos

La separación artificial de la retina neural del epitelio pigmentario retinal (EPR) se realiza muchas veces con propósitos específicos, tales como remoción de una membrana subretinal, reaplicación de una retina desprendida y plegada, o para realizar una cirugía de desplazamiento macular (de Juan et al., 1998; Stanga et al., 2002). La recuperación de la función visual depende del reestablecimiento de asociaciones funcionales entre estas capas.

Aunque no existe ningún tipo de unión celular entre el EPR y los fotorreceptores (Steinberg and Wood, 1974; Strauss, 2005), hay una fuerte interdigitación anatómica entre los segmentos externos de los fotorreceptores y las microvellosidades del EPR, por lo cual las células epiteliales pueden permanecer unidas a la retina cuando se separan mecánicamente. La íntima relación entre estas células se asocia con la renovación de los discos de los fotorreceptores y su fagocitosis por el EPR. Este fenómeno se ha utilizado para evaluar la fuerza de adherencia de la retina neural y EPR (Endo et al., 1988; Nandrot et al., 2006). También las fuerzas friccionales que resultan de las interdigitaciones (Marmor, 2001) y la posible presencia de interacciones electrostáticas entre las membranas celulares (Ghazi and Green, 2002) reforzarían la adhesión. La adhesión retinal también depende del transporte vectorial de fluidos, ya que la dirección del movimiento tiende a empujar la retina contra el EPR (Fatt and Shantinath, 1971).

La matriz interfotorreceptora (IPM) puede actuar como un pegamento que une el EPR con la retina neural (Berman, 1969). La IPM está conformada por glucoconjugados poco solubles, muchos asociados a las membranas plasmáticas. Estos glucoconjugados están compuestos por una gran familia de proteoglucanos enriquecidos en condroitín sulfato, que se distribuyen de una manera heterogénea alrededor de los conos y bastones. Las enzimas que degradan carbohidratos debilitan la adhesión entre el EPR y la retina neural. La inhibición de la síntesis de proteoglucanos altera la estructura de la

matriz, especialmente la matriz asociada a los conos, y se producen desprendimientos retinales localizados in vivo (Hageman et al., 1995).

La matriz que recubre los conos tiene una composición bioquímica particular. Su componente mayoritario es el proteoglucano condritín 6 sulfato, que es reconocido específicamente por la lectina de maní (PNA). La matriz o vaina de los conos es insoluble en soluciones acuosas, lo que permite aislarla de manera intacta por disociación física (Johnson and Hageman, 1991). La IPM que envuelve los segmentos externos de los bastones no contiene condroitin 6 sulfato ni sitios de unión para PNA, pero puede ser detectada con lectina de germen de trigo (WGA).

Se conocen numerosos factores que pueden modificar la adhesión entre el EPR y la retina neural, como exposición a la luz (Owczarek et al., 1975), ambiente iónico, temperatura, metabolismo oxidativo, y presiones hidrostáticas y osmóticas (Marmor, 2001). En los conejos se observó que la separación retinal es facilitada por soluciones libres de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Fang et al., 2001; Faude et al., 2001), especialmente después de un breve período de adaptación a la oscuridad (Faude et al., 2001). Los factores metabólicos, entre ellos la anoxia, también pueden afectar la adhesión retinal (Kim et al., 1993).

La melatonina es sintetizada rítmicamente en la retina y actúa como un neuromodulador impartiendo información fotoperiódica a la retina (Cahill and Besharse, 1992; Fukuhara et al., 2004). Esta hormona está envuelta en la regulación de muchas funciones retinales como ya hemos descrito en la sección 1.3.2, pero su rol en el desprendimiento retinal no había sido previamente estudiado.

Previamente, en nuestro laboratorio se realizaron estudios con el propósito de obtener láminas de EPR con buena viabilidad. Los primeros ensayos, donde se obtuvieron los tejidos después de 1 h de adaptación a la oscuridad, permitieron obtener láminas de excelente aspecto morfológico. Sin embargo, la estructura epitelial se perdía después de unas pocas horas de cultivo. Por lo tanto, se utilizó la prueba de exclusión del colorante con yoduro de propidio (IP) para detectar daño submicroscópico anterior a la aparición de signos manifiestos de necrosis o apoptosis. De este modo, fue posible demostrar que la adhesión entre la retina y el EPR, que determina la viabilidad de estas últimas

después de un desprendimiento, depende de la hora del día y la duración de la adaptación a la oscuridad. Por otro lado, la administración de pequeñas dosis de melatonina reprodujo las condiciones de baja adherencia que facilitan el desprendimiento. Se observó que los tiempos y tratamientos que reducen el daño al EPR coinciden con las condiciones que reducen la unión de PNA a las vainas de los conos.

Los objetivos específicos fueron:

- a. Evaluar la exclusión de colorante en las células EPR obtenidas en distintos momentos del día y después de distintos periodos de adaptación a la oscuridad.
- b. Determinar si las condiciones de mejor supervivencia del EPR podían ser reproducidas por el tratamiento con melatonina.
- c. Correlacionar las condiciones de mejor supervivencia con cambios selectivos en la matriz interfotorreceptora.

## 4.2 Resultados

### 4.2.1 Separación Ex Vivo de la Retina y EPR

Luego de realizar la separación ex vivo del EPR (ver Capítulo 2), se evaluó la calidad del EPR por medio de autofluorescencia e inmunofluorescencia de ZO-1 (Zymed, South San Francisco, CA). En todas las condiciones se encontró una lámina epitelial continua. Las células del EPR exhibían su característica forma hexagonal delimitada por un delgado cinturón de inmunofluorescencia ZO-1. Sin embargo, la penetración intracelular de IP indicó que estas preparaciones tenían un daño en la membrana celular, ya que IP es excluido por las membranas indemnes. Los experimentos iniciales, que fueron efectuados en solución de Ringer, mostraron que era posible obtener láminas epiteliales viables cuando la enucleación se efectuaba al comienzo de la fase nocturna, después de 48 horas de oscuridad constante (Figura 4.1). Por el contrario, los EPRs separados durante la fase diurna incorporaban IP aún después de 7 días de oscuridad constante.

Por lo tanto, se realizó un estudio cuantitativo de la incorporación de IP en las células EPR (número de células IP+/unidad de área) después de tres diferentes periodos de adaptación a la oscuridad constante: 1, 24 y 48 horas, tomando las muestras en cuatro horarios diferentes: 6, 8, 13 y 20 hs. Los horarios elegidos correspondieron a la última hora de la fase nocturna, el comienzo y mitad de la fase diurna, y el comienzo de la fase nocturna. Además, se compararon, para todos los puntos, la disección en solución salina de Hanks (HBSS) y una solución similar libre de calcio y magnesio (CMF-HBSS).

Las muestras separadas en solución HBSS (Figura 4.2, A), con sólo 1 hora de oscuridad constante, mostraron alto número de células marcadas, independientemente de la hora del día. Después de 24 horas de oscuridad constante, se observó una gran reducción de células IP+ en los ratones enucleados a las 20 hs, 1 hora después de apagadas las luces. Después de 48 horas de oscuridad constante, se encontró una reducción similar a las 6 hs, 1 hora antes de prender las luces. Con este tiempo de adaptación, prácticamente no se observaron células IP+ a las 20 hs. Por el contrario, la incorporación de IP fue siempre muy alta en el EPR separado durante la fase diurna, independientemente del tiempo de adaptación a la oscuridad. El ANOVA de dos vías indicó un efecto

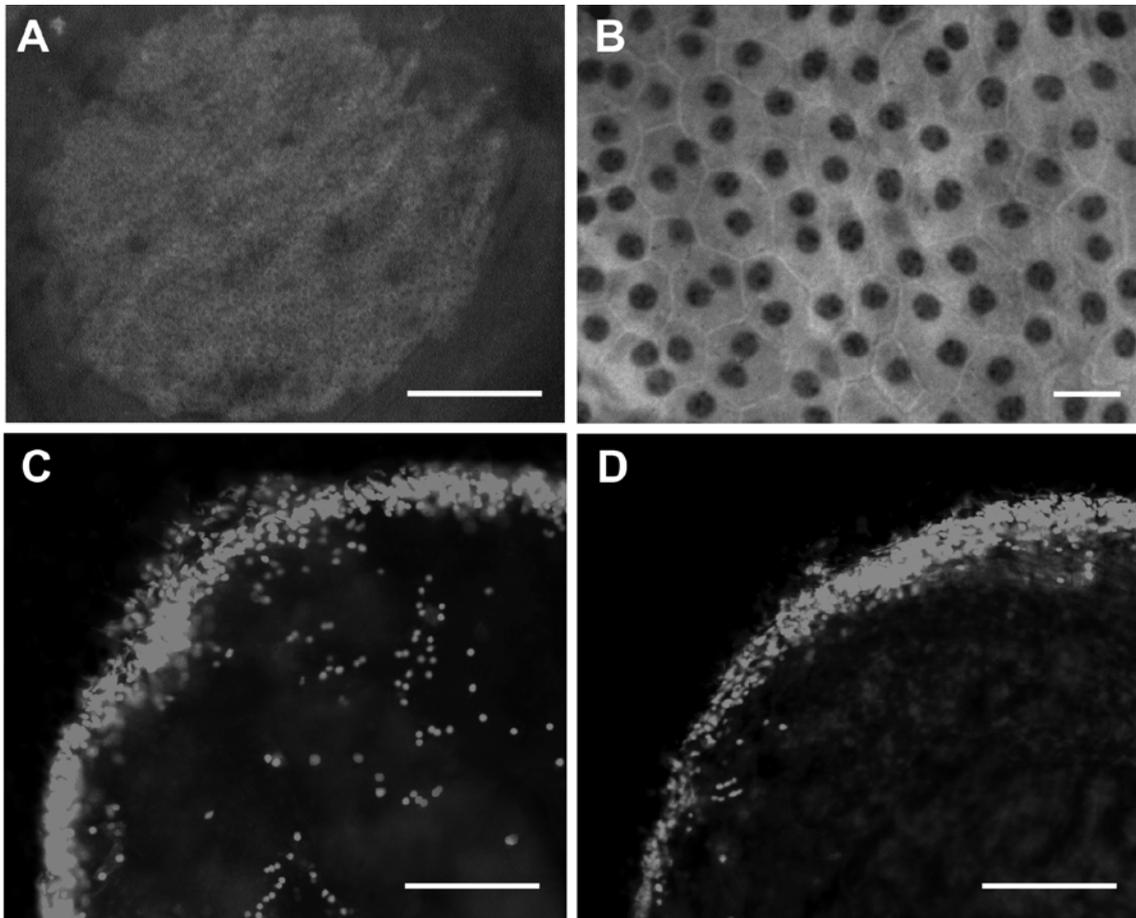


Figura 4.1. Discos de EPR preparados ex vivo. A: A baja magnificación, esta imagen autofluorescente muestra la continuidad de las láminas epiteliales. B: Disco teñido con violeta de cresilo y observado bajo el modo de transmisión en un microscopio confocal. Se muestra la total preservación de la forma celular y de los núcleos. Las células binucleadas son características del EPR. C y D: Discos de EPR teñidos con ioduro de propidio (IP) ex vivo obtenidos a las 19 hs después de 24 y 48 hs de adaptación a la luz, respectivamente. En ambos discos, los núcleos teñidos en la periferia reflejan la lesión por disección. En D no se observan núcleos fluorescentes en la lámina epitelial. Calibración, A, 200  $\mu\text{m}$ ; B, 15  $\mu\text{m}$ ; C y D, 100  $\mu\text{m}$ .

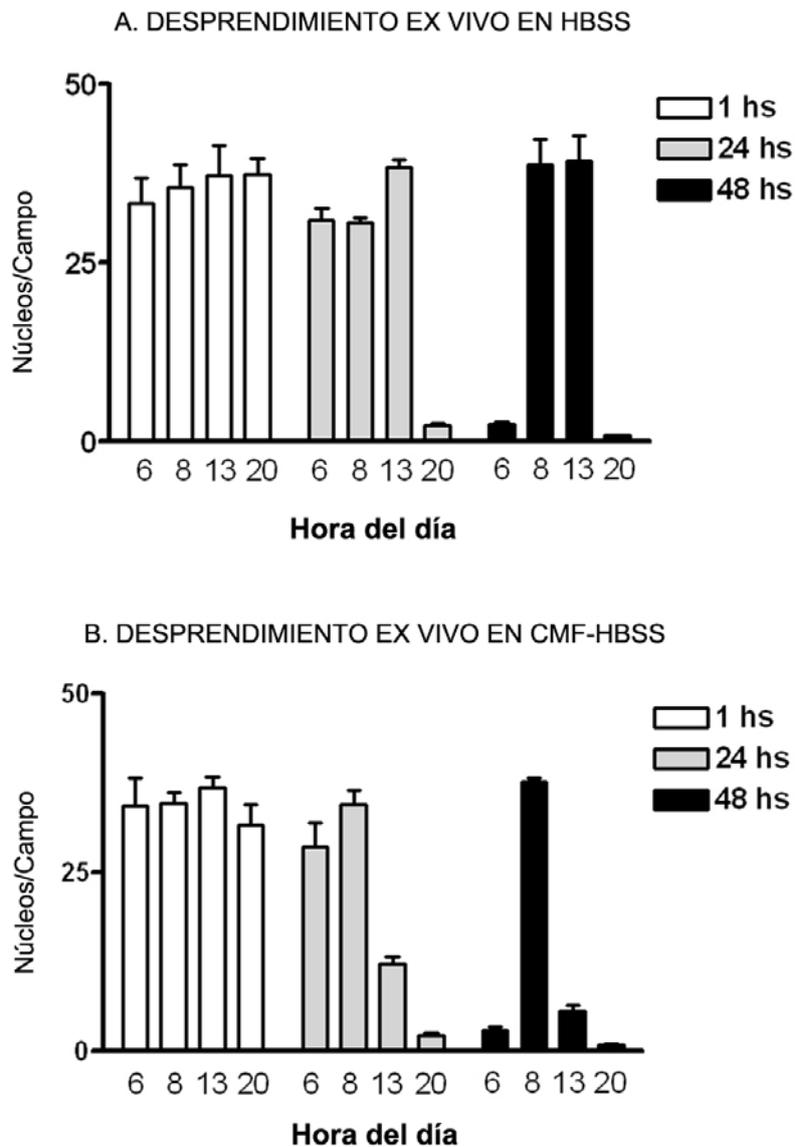


Figura 4.2. Evaluación cuantitativa de incorporación de IP en las células del EPR después del desprendimiento ex vivo. Las barras indican densidad de núcleos teñidos con IP (número de núcleos marcados con IP/campo óptico) en ratones sometidos a oscuridad constante por 1, 24 o 48 hs. Para cada periodo de oscuridad constante se estudiaron muestras desprendidas a las 6, 8, 13 o 20 hs. A: La separación ex vivo del EPR se realizó en solución HBSS. B: La separación del EPR se llevó a cabo en solución CMF-HBSS.

significativo ( $P < 0.0001$ ) con respecto a la duración de la oscuridad y al horario del día, con una interacción muy significativa entre ellos ( $P < 0.0001$ ). Las comparaciones del ANOVA de dos vías y el posttest de Bonferroni mostraron que no había diferencias significativas entre los diferentes tiempos del día para las muestras con una hora de oscuridad constante. Después de 24 horas de oscuridad constante, la disminución significativa correspondió a las 20 hs ( $P < 0.001$ ), mientras que después de 48 horas, se encontraron diferencias significativas a las 6 hs ( $P < 0.001$ ) y 20 hs ( $P < 0.001$ ).

Otros experimentos mostraron que la disminución en el daño del EPR después de 48 horas de adaptación a la oscuridad se podía observar desde las 18 hs. La diferencia entre los EPR separados durante las fases nocturna y diurna también se puso de manifiesto en ratones mantenidos bajo un ciclo invertido de luz por dos semanas antes del experimento.

Cuando el EPR fue separado en CMF-HBSS (Figura 4.2, B), el ANOVA de dos vías también señaló un efecto significativo ( $P < 0.0001$ ) de la duración de la oscuridad y hora del día, con una significativa interacción entre estos dos factores ( $P < 0.0001$ ). En estas condiciones, la separación después de 1 hora de oscuridad determinó valores elevados de células IP+ a cualquier hora del día, casi idénticos a los obtenidos en HBSS. Sin embargo, después de 24 horas de oscuridad constante, las células IP+ se redujeron significativamente tanto a las 13 hs ( $P < 0.001$ ) como a las 20 hs ( $P < 0.001$ ). Después de 48 horas de oscuridad, se encontraron valores bajos a las 6 hs ( $P < 0.001$ ), 13 hs ( $P < 0.001$ ) y 20 hs ( $P < 0.001$ ). La cantidad de células IP+ obtenidas en CMF-HBSS a las 13 hs fueron significativamente diferentes a las obtenidas con las mismas condiciones en HBSS después de 24 y 48 horas de oscuridad constante (ambas  $P < 0.001$ ).

#### **4.2.2 Efecto de la melatonina**

La melatonina es sintetizada en la retina de manera elevada durante la noche y reducida durante el día (Tosini and Fukuhara, 2003). De modo que su administración podría reproducir los efectos de la fase nocturna. El tratamiento con melatonina (0.05 mg/kg), en horas del mediodía, permitió obtener preparaciones con muy bajo número de células IP+ con solo una hora de adaptación a la oscuridad (Tabla 4.1). Los valores en los

ratones tratados con melatonina fueron significativamente más bajos que aquellos de los animales que solo recibieron salina ( $P < 0.001$ ). A la inversa, el número de células IP+ en los ratones tratados con melatonina fue prácticamente igual al obtenido en los EPR desprendidos a las 20 hs después 48 horas de oscuridad.

**Tabla 4.1. Células IP+ por campo microscópico en EPR desprendido ex vivo**

TRATAMIENTO	HBSS	CMF-HBSS
Salina, 1 hs oscuridad, 13 hs	$37.24 \pm 4.18$	$37.07 \pm 1.82$
Melatonina, 1 hs oscuridad, 13 hs	$0.86 \pm 0.14$	$1.11 \pm 0.08$
Sulpiride, 1 hs oscuridad, 13 hs	$9.77 \pm 0.99$	$9.74 \pm 0.79$
48 hs oscuridad, 20 hs	$0.85 \pm 0.07$	$0.89 \pm 0.11$

La administración de melatonina exógena puede inhibir la liberación de dopamina retinal (Doyle et al., 2002). Por lo tanto, también evaluamos el efecto del sulpiride, un antagonista selectivo D2R, sobre el número de células IP+ (Tabla 4.1). El número de células dañadas fue mayor que después de melatonina ( $P < 0.01$ ). Sin embargo, fue sustancialmente menor que el número de células IP+ en los ratones que solo recibieron solución salina y fueron enucleados a la misma hora del día ( $P < 0.001$ ). No se observaron diferencias significativas entre los especímenes separados en medio con y sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (HBSS vs CMF-HBSS).

### 4.2.3 Sobrevida de las células EPR in vitro

Para los experimentos in vitro, se obtuvieron pequeños discos de epitelio con un sacabocados 25 G (ver sección 2.3.2.2). Los discos fueron incubados durante 12 o 24 horas en medio de cultivo sin suero.

En los discos obtenidos a las 13 hs de animales sometidos a una sola hora de adaptación a la oscuridad, el patrón normal poligonal de ZO-1 desapareció durante las 3 primeras

horas de incubación (Figura 4.3, A). El mismo deterioro se observó en los especímenes extraídos al mediodía después de 24 a 48 horas de adaptación a la oscuridad. Por el contrario, los discos obtenidos a las 20 hs después 48 horas de adaptación a la oscuridad mantuvieron su patrón normal de ZO-1 durante 12 o 24 horas in vitro (Figura 4.3, B). Estos cultivos también mantuvieron la exclusión de colorante (no se muestran). Idénticos resultados con respecto a ZO-1 y exclusión de colorante se obtuvieron en discos obtenidos a las 13 hs, 1 hora después de la inyección de melatonina (Figura 4.3, C).

#### **4.2.4 Desprendimiento retinal in vivo**

Las retinas de los animales controles y tratados con melatonina fueron desprendidas por medio de una inyección subretinal de ácido hialurónico. Aunque la investigadora que realizó las inyecciones desconocía el tratamiento previo pudo identificar a los animales tratados con melatonina por presentar menor resistencia a la inyección subretinal (19 identificaciones positivas en 25 animales totales). Quince minutos más tarde, cuando los animales fueron enucleados, en los ratones tratados con melatonina, el EPR se separó de la retina neural en forma casi espontánea.

El EPR de los animales que recibieron solución salina mostró una gran cantidad de células IP+ en toda la extensión de la lámina epitelial (Figura 4.4, A). Por el contrario, después del tratamiento con melatonina, solo aparecían células IP+ en el punto de inyección (Figura 4.4, B). Toda la superficie restante del EPR estaba prácticamente libre de células IP+.

#### **4.2.5 Análisis de la matriz interfotorreceptora**

Estos hallazgos sugieren una relación con las modificaciones de la matriz interfotorreceptora (IPM) y que esos cambios podrían ser detectados por el patrón de unión de las lectinas PNA y WGA. Estudiamos la distribución estas lectinas en cortes mediante microscopía confocal. Para cada situación experimental, los cortes fueron analizados en la misma sesión, con idénticos parámetros de intensidad y barrido. La organización de la IPM fue evaluada en proyecciones de 10 secciones ópticas confocales consecutivas de 0.5  $\mu\text{m}$ .

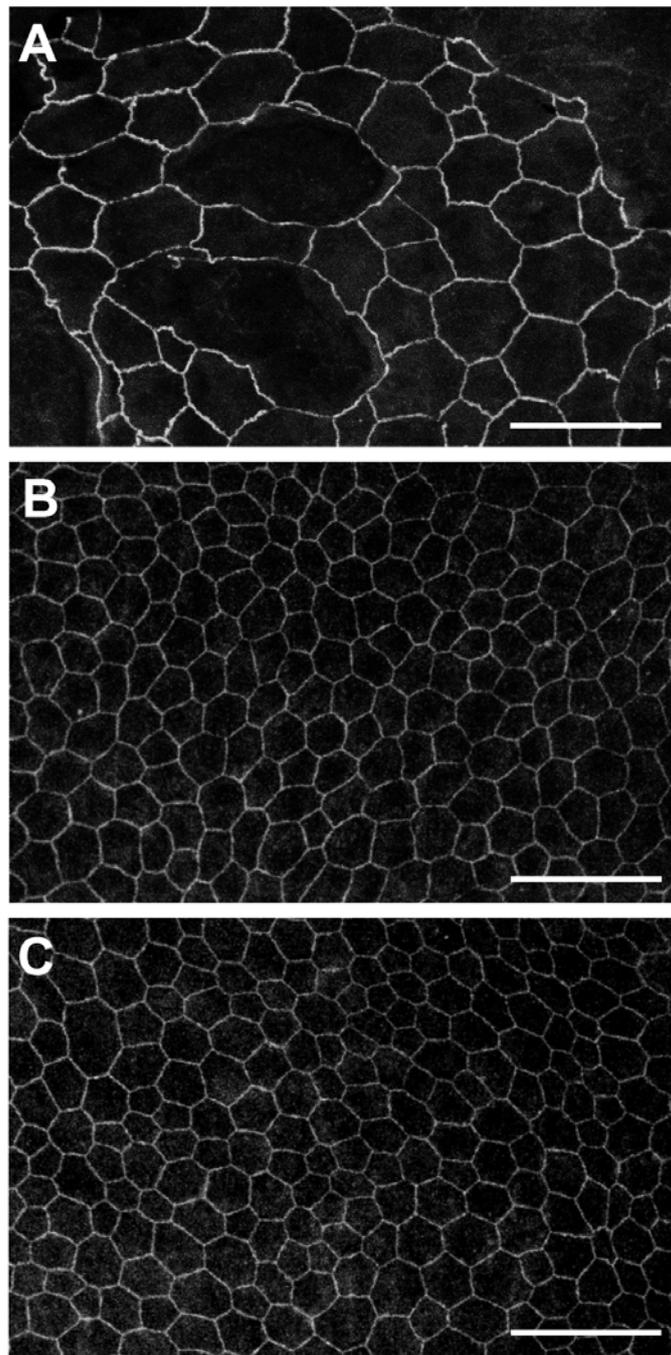


Figura 4.3. Muestras de EPR obtenidas bajo diferentes condiciones e inmunoteñidas con ZO-1. A: El espécimen, obtenido a las 13 hs después de 1 hs de adaptación a la oscuridad, y mantenido in vitro durante 3 horas, presenta extenso daño de la lámina epitelial. B: El patrón hexagonal normal de ZO-1 está casi totalmente conservado en una lámina epitelial obtenida después de 48 hs de adaptación a la oscuridad, al comienzo de la fase nocturna e incubada in vitro por 12 hs. C: Un patrón similar se observa en las muestras de EPR obtenidas después de tratamiento con melatonina, aunque la hora del día y las condiciones de iluminación fueron similares a las descritas en A, y la incubación in vitro fue de 12 hs. Calibración, A, 25  $\mu$ m; B y C, 50  $\mu$ m.

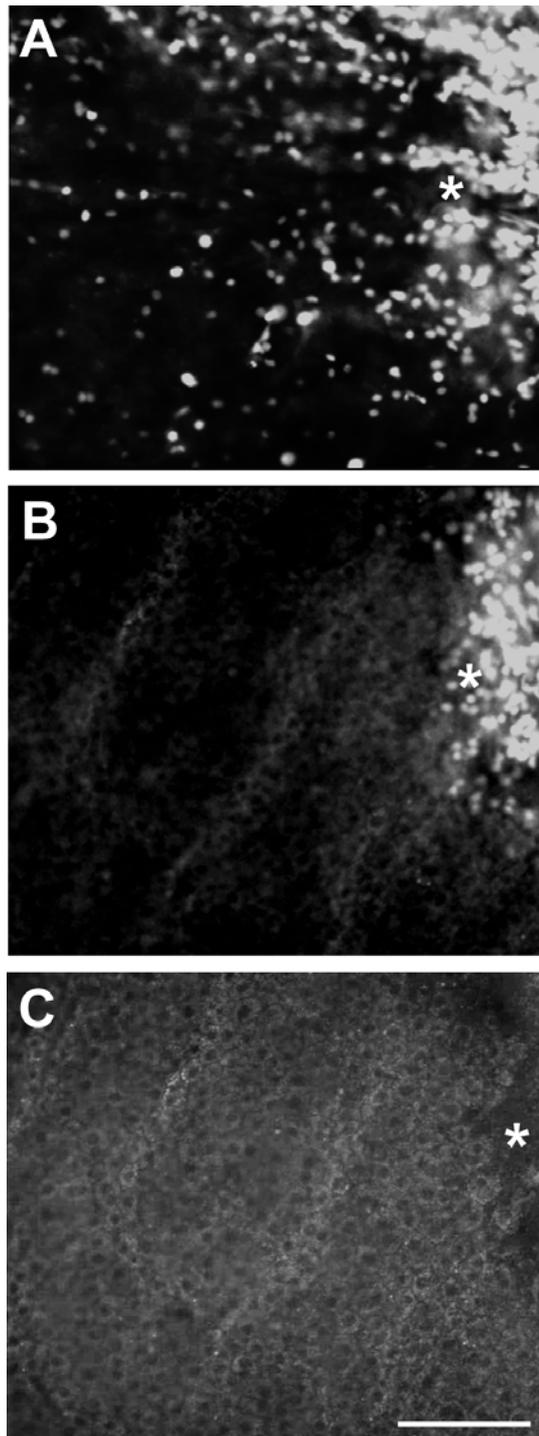


Figura 4.4. Montajes de EPRs provenientes de ojos que sufrieron un desprendimiento de retina in vivo, a las 13 hs, después de 1 hs de adaptación a la oscuridad. Los EPRs fueron incubados con IP. El sitio de la inyección subretinal, rodeado por un gran número de células que no lograron excluir IP, se señala con un asterisco. A: Un EPR control que recibió solución salina muestra células que no excluyen IP dispersas sobre toda la superficie desprendida. B: En un EPR proveniente de un animal tratado con melatonina bajo las mismas condiciones no se observan células marcadas salvo en la zona de la inyección. C: La imagen autofluorescente de la misma preparación muestra la preservación estructural de la lámina epitelial. Calibración para todas las figuras, 50  $\mu\text{m}$ .

Primero se comparó la IPM de ratones fijados a las 20 hs después de 1 o 48 horas de oscuridad. En las retinas fijadas a las 20 hs, después de 1 hora de oscuridad, las vainas de los conos (PNA+) aparecían como estructuras granulosas intensamente fluorescentes. La fluorescencia disminuyó notablemente después de 48 horas de oscuridad (Figura 4.5, A y B). La lectina WGA marcó en forma uniforme todos los segmentos externos (SE), con zonas de mayor intensidad alrededor de los segmentos internos (SI). Todas las retinas mostraron el mismo patrón uniforme de tinción, aunque la intensidad de la fluorescencia fue mucho mayor después de 48 horas de oscuridad (Figura 4.5, C y D).

En los siguientes experimentos, los ratones fueron inyectados con salina o melatonina a las 12 hs, y fijados a las 13 hs, después de 1 hs de adaptación a la oscuridad. En los ratones fijados después de 1 hs de oscuridad, a las 13 hs, el patrón de PNA fue semejante al observado en los ratones fijados a las 20 hs con el mismo tiempo de adaptación. Los animales tratados con melatonina mostraron una clara disminución de la unión de PNA a los conos, particularmente alrededor de los SE. Solo se observaba inmunofluorescencia PNA alrededor de los SI (Figura 4.6, A y B). En los ratones inyectados con salina, WGA mostró una matriz amorfa poco inmunofluorescente. La melatonina provocó un gran incremento en la intensidad de la marca, casi idéntica a la observada a las 48 horas de oscuridad (Figura 4.6, C y D). Por lo tanto, los cambios en la unión de las lectinas detectados al mediodía, una 1 hora después de la melatonina se asemejan a los cambios observados a las 20 hs después de 48 horas de oscuridad constante

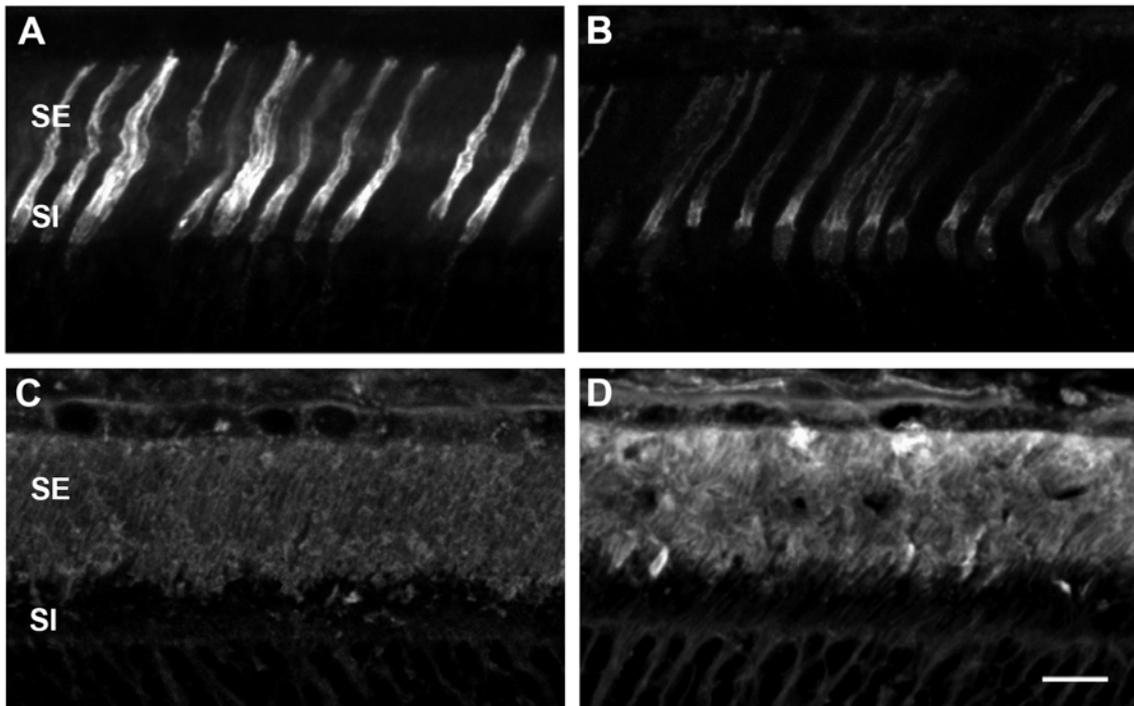


Figura 4.5. Criosecciones de retinas de animales sometidos a oscuridad constante por 1 hs (A y C) o 48 hs (B y D) y fijados 1 hs después de comenzada la fase nocturna. A y B: La fluorescencia de la lectina PNA aparece alrededor de los segmentos internos (SI) y externos (SE) de los conos. Nótese la disminución de la fluorescencia en los SE de las retinas fijadas después de 48 hs de oscuridad. C y D: La lectina WGA muestra una matriz amorfa rodeando los SE de todos los fotorreceptores. La lectina fijada a esta matriz aumenta a las 48 hs de oscuridad constante. Calibración para todas las figuras, 15  $\mu$ m.

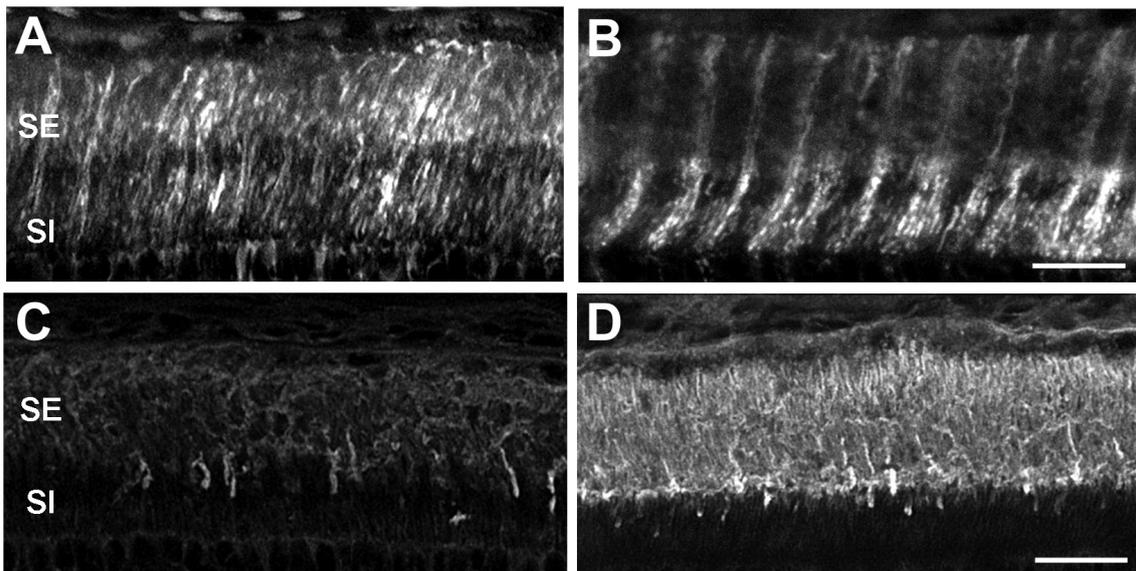


Figura 4.6. Imágenes confocales de criosecciones de retinas obtenidas a las 13 hs, después de 1 hs de adaptación a la oscuridad. A y C, animales que recibieron una inyección de solución salina al comienzo de la adaptación a la oscuridad. B y D, animales que recibieron una inyección de melatonina. A y B: La lectina PNA, que se une a las vainas individuales de los conos, está reducida después del tratamiento con melatonina. C y D: La lectina WGA, que se asocia a la matriz amorfa interfotorreceptora, se une en mayor medida después de la inyección de melatonina. Nótese que las diferencias entre estas retinas son similares a las que se muestran en la Figura 4.5. Calibración para todas las figuras, 25  $\mu\text{m}$ .

## **4.3 Discusión**

Las observaciones experimentales demuestran que la separación *ex vivo* de la retina neural durante la fase de iluminación de un ciclo normal de luz/oscuridad induce un daño de índole submicroscópico en las células del EPR, que puede ser detectado por la incorporación de IP. Estos descubrimientos podrían ser utilizados para obtener células EPR sin daño para desarrollar cultivos primarios. Por otro lado, los resultados arrojan nueva luz de conocimiento sobre las interacciones entre el EPR y la retina.

### **4.3.1 EL EPR según los antecedentes lumínicos**

Los signos de daño en la membrana celular fueron detectados aun en aquellas preparaciones de EPR en las cuales la autofluorescencia y la inmunotinción contra ZO-1 indicaban una buena preservación de la arquitectura epitelial. Por lo tanto, el método de exclusión de colorante permitió detectar un daño más profundo que la pérdida de continuidad epitelial o la persistencia de células EPR adheridas a la retina, los dos métodos más utilizados para evaluar la calidad del EPR desprendido (Endo et al., 1988; Nandrot et al., 2006). Cuando los especímenes que no excluían colorante fueron incubados *in vitro*, los signos necróticos aparecieron en apenas 3 hs.

Durante las primeras 12 hs después de un desprendimiento *in vivo* se producen cambios en la morfología de los procesos apicales y la proliferación de las células del EPR (Anderson et al., 1981; Kroll and Machemer, 1968). Los estudios de apoptosis mediante TUNEL después de un desprendimiento experimental, solo han detectado muerte celular en los fotorreceptores (Lewis et al., 2002; Nour et al., 2003). Este tipo de análisis no detectaría células muertas por mecanismos no-apoptóticos: Por lo tanto, podemos sugerir que algunas alteraciones patológicas del EPR consecutivas a un desprendimiento regmatógeno podrían ser consecuencia de una injuria inicial de este epitelio. Dado que el comportamiento de las células epiteliales es modulado por las alteraciones en los contactos entre células, y entre las células y el sustrato (Lim et al., 2004), la muerte durante el desprendimiento podría gatillar procesos de proliferación, migración y otras consecuencias de importancia clínica (Guerin et al., 1993; Lewis et al., 2002; Men et al., 2003).

Las lesiones de la membrana plasmática, como las detectadas mediante el yoduro de propidio, pueden corresponder a estados metaestable compatibles con la sobrevivencia o con la muerte por necrosis (Jaeschke and Lemasters, 2003). El curso de este estado metaestable puede ser el punto crucial en la evolución de un desprendimiento retinal. Las condiciones del medio extracelular cuando los desprendimientos se efectuaron por la noche después de 48 hs de adaptación a la oscuridad o después del tratamiento con melatonina podrían proteger al EPR de la injuria o influir sobre el resultado de estos estados metaestables.

Esta relación multifactorial entre la adhesión retina neural-EPR y la “fragilidad” de la membrana plasmática del EPR con la historia de luz del animal y la hora del día, es de gran relevancia para comprender la fisiopatología de la retina externa.

En general, 1 hs de adaptación a la oscuridad no impidió el deterioro de la membrana del EPR, en ninguno de los momentos del día evaluados. Recién se encontraron indicios de protección después de 24 hs de adaptación a la oscuridad y solamente para la primera parte de la fase nocturna. El punto óptimo, donde no se detectó daño de las células del EPR, ocurrió en la fase nocturna, después de 48 hs de adaptación a la oscuridad. Las diversas soluciones salinas ensayadas, Ringer, HBSS y CMF-HBSS, fueron igualmente efectivas para obtener una exclusión completa del colorante al comienzo de la fase de la noche después de 48 hs de adaptación a la oscuridad. El medio libre de calcio y magnesio proporcionó una protección adicional, ya que permitió obtener EPR sano al mediodía, después de 24 hs o 48 hs de adaptación a la oscuridad.

El gran deterioro de la membrana observado a las 8 hs, una hora después del encendido de las luces podría estar relacionado con la renovación y fagocitosis de los discos de los bastones, que en los ratones es máximo 2 hs después del encendido de la luz (Nandrot et al., 2004). El inicio de la fase iluminada corresponde a un período de fuerte adhesión entre retina neural y EPR, que parece ser máxima 3.5 hs después del encendido de la luz (Nandrot et al., 2006).

### **4.3.2 La fase nocturna y la adaptación a la oscuridad son reproducidos por melatonina**

Una baja dosis de melatonina administrada durante la fase diurna logró reducir la incorporación de IP después del desprendimiento ex vivo, incluso a los mismos niveles obtenidos con los animales mantenidos en oscuridad constante por 48 hs y operados al comienzo de la fase nocturna. Este efecto protector también se observó in vivo, demostrando así que estas observaciones no dependían de condiciones propias de los experimentos ex vivo.

La melatonina participa en el control de la renovación y fagocitosis de los discos de los fotorreceptores, probablemente a través de un oscilador circadiano acoplado a ciclos diarios de luz/oscuridad (Nguyen-Legros and Hicks, 2000; White and Fisher, 1989). El patrón temporal de daño del EPR desprendido podría reflejar un ritmo circadiano intrínseco, ya que las diferencias entre el número de células PI+ a las 13 y a las 20 hs persistieron por lo menos durante 7 días para los desprendimientos ex vivo en medios con calcio y magnesio. La inversión del momento de máxima incorporación de colorante que acompaña a la inversión del ciclo de luz/oscuridad también apoya la relación de este fenómeno con un reloj circadiano.

Algunos efectos de la melatonina son mediados por sus receptores en las neuronas dopaminérgicas (Fukuhara et al., 2004; Witkovsky, 2004), y la estimulación de los receptores D2 mimetiza los efectos de la luz sobre numerosos fenómenos rítmicos de la retina (Cahill et al., 1991; Doi et al., 2006). Un antagonista selectivo del receptor D2 reprodujo parcialmente las consecuencias de las condiciones horarias y de iluminación sobre el daño del EPR provocado por el desprendimiento. Estos hallazgos indican que la vía melatonina/dopamina interviene en las interacciones entre la retina neural y el EPR.

La melatonina puede también actuar independientemente del oscilador circadiano, ya que tiene funciones antioxidantes y como secuestrador de radicales libres (Hardeland, 2005) que protegen al EPR humano contra la isquemia (Osborne et al., 1998) y el estrés oxidativo (Liang et al., 2004), reducen la proliferación vitreoretinal experimental (Er et al., 2006), y disminuye el tamaño de los infartos cardiacos (Sahna et al., 2005). Este tipo de efectos suele obtenerse después de tratamientos prolongados (Liang et al., 2004), o

grandes dosis de 4 a 10 mg/kg (Er et al., 2006; Sahna et al., 2005). Por el contrario, el efecto de la melatonina sobre la viabilidad del EPR se produjo con dosis mucho más bajas (0.05 mg/kg).

### **4.3.3 Modificaciones de la matriz interfotorreceptora inducidas por las condiciones de luz y melatonina**

La matriz interfotorreceptora de los conos y bastones fueron afectados por las condiciones de iluminación y por la inyección de melatonina. Los componentes de la vaina de los conos desempeñan un importante papel en la adhesión retina-EPR, ya que constituyen un puente molecular entre ambas estructuras (Hageman et al., 1995). La reducción de los sitios PNA+ de la vaina de los conos en todas las condiciones donde el desprendimiento fue menos dañino para el EPR confirman esta función. Las diferencias en las consecuencias del desprendimiento en HBSS o CMF-HBSS en horas del día, podrían reflejar el escaso número de vainas de conos que permanecen adheridas al EPR después de la irrigación con soluciones libres de calcio y magnesio (Fang et al., 2001). Mas importante aún, los efectos inmediatos de la melatonina sugieren que las propiedades de la interfase retina neural/EPR pueden ser rápidamente modificado por esta hormona. Numerosos genes dentro de la retina y del EPR de la rata son regulados por una simple inyección de melatonina (Wiechmann, 2002), pero su relación con la síntesis o degradación de la matriz interfotorreceptora aun no se conoce.

Aunque los resultados obtenidos sólo aportan evidencia sobre el desprendimiento experimental murino, es importante especular su posible significado para la patología humana. Podría ser beneficioso contemplar las condiciones de iluminación, o el tratamiento con melatonina, cuando se requiere el desprendimiento quirúrgico programado de la retina. Por otro lado, la asociación entre retina/EPR y la vía melatonina/dopamina sugiere una relación con la corioretinopatía serosa central, un trastorno asociado con el estrés y agentes simpatomimético (Michael et al., 2003).

## **5. El sistema endotelinérgico en la proliferación vitreoretinal**

### **5.1 Introducción y objetivos específicos**

A pesar del importante progreso en los procedimientos quirúrgicos y los tratamientos coadyuvantes, todavía existe una incidencia significativa de proliferación vitreoretinal (PVR) consecutiva a la cirugía de los desprendimientos de retina (DRs) primarios o complicados (Charteris et al., 2002; Scott et al., 2003). Como describimos en la Introducción, la PVR consiste en el desarrollo de crecimientos celulares, o membranas, sobre las superficies de la retina. El desarrollo de estas membranas se asocia a una compleja remodelación glial (Canto Soler et al., 2002; Fisher et al., 2005; Lewis and Fisher, 2000; Sethi et al., 2005). Las células de Müller presentan aumento de sus filamentos intermedios, la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), y la vimentina. En los DRs experimentales también hay proliferación de los astrocitos (Fisher et al., 1991), que han sido identificados en membranas PVR humanas (Messmer et al., 1998; Mietz et al., 1994; Schwartz et al., 1988; Yamashita et al., 1986). Los astrocitos de la retina normalmente expresan y acumulan endotelina-1 (ET-1) (Prasanna et al., 2005; Ripodas et al., 2001; Torbidoni et al., 2005), un péptido involucrado en la activación glial (Schinelli, 2006) y el desarrollo de diversas condiciones fibróticas (Clozel and Salloukh, 2005). Por otra parte, los niveles de ET-1 están aumentados en el humor vítreo y las membranas epiretinales humanas (Roldan-Pallares et al., 2005). Por lo tanto, los astrocitos y la ET-1 podrían desempeñar un papel central en la patogenia de la PVR.

El ligando ET-1 se encuentra en los astrocitos, el EPR, la capa plexiforme externa (CPE) y la capa plexiforme interna (CPI). La inmunorreactividad sugiere que los astrocitos serían las células con mayor concentración de ET-1 en la retina (Torbidoni et al., 2005). Aunque su localización celular no ha sido bien establecida, la retina también expresa ARNm de ET-2 y ET-3 (Rattner and Nathans, 2005; Zhu et al., 2005).

En nuestro laboratorio hemos demostrado previamente que ambos receptores endotelinérgicos están presentes en la retina del ratón BALB-c. Los receptores ETR-A se detectan en el EPR y en la CPE. También, se los encuentra en las células de la CCG y en el endotelio vascular. El receptor ETR-B se localiza principalmente en los astrocitos, y en menor medida en las neuronas horizontales (Torbidoni et al., 2005).

ET-1 controla la proliferación astrocitaria (MacCumber et al., 1990) probablemente a través de la estimulación de ETR-B (Kasuya et al., 1994; Prasanna et al., 2002; Schinelli et al., 2001), de manera similar podría actuar en las células de Müller.

Las endotelinas también se asocian a los cambios fenotípicos envueltos en la diferenciación de las células tipo fibroblasto y miofibroblastos que conforman el corazón de las membranas de PVR. ET-1 promueve la síntesis de colágeno I y III en los fibroblastos normales (Shi-Wen et al., 2001). También induce el fenotipo fibrogénico característico de las lesiones de esclerosis sistémicas y fibrosis pulmonar a través de un mecanismo dependiente de ambos receptores endotelinérgicos (Shi-Wen et al., 2001) e interviene en la diferenciación de los miofibroblastos, que pueden ser caracterizados por la presencia de actina de músculo liso (SMA), así como en su contracción y migración (Chi et al., 2003; Shi-Wen et al., 2004). Por otra parte, ET-1 es necesaria para la transición epitelio-mesenquimática de las células cancerosas (Rosano et al., 2005).

Para investigar la participación de las vías endotelinérgicas en la patogenia de la PVR, estudiamos la inmunoreactividad de ET-1 y ETR-B en membranas humanas y en ratones con PVR experimental. Luego evaluamos los efectos de tezosentan, un antagonista de los receptores endotelinérgicos, sobre el desarrollo de lesiones del tipo PVR en ratón.

El modelo experimental de PVR que utilizamos fue desarrollado en nuestro laboratorio. Se utilizan ratones C57BL/6 inyectados en el vítreo con dispasa (0.2 U/ $\mu$ l), que determina un desarrollo gradual de lesiones de tipo PVR. Los plegamientos retinales se detectan durante la primera y segunda semana después de la inyección, mientras que las membranas epiretinales aparecen durante la segunda semana en el 60 % de los ojos inyectados (Canto Soler et al., 2002).

Los objetivos específicos del presente capítulo fueron:

- a. Evaluar la inmunoreactividad de las moléculas endotelinéricas, ET-1 y ETR-B, durante la evolución de la PVR experimental inducida por disypasa en ratón.
- b. Detección de ET-1 y ETR-B en muestras de retinas y membranas de PVR humanas.
- c. Estudiar el efecto de tezosentan, un bloqueante de los receptores endotelinéricos, sobre el desarrollo de las lesiones de PVR experimental.

## 5.2 Resultados

### 5.2.1 Curso de la PVR experimental

#### 5.2.1.1 Pliegues y membranas

Evaluamos la distribución de la inmunoreactividad para ET-1 y GFAP a los 7, 14 o 21 días después de la inyección intravítrea de dispasa (n = 10 para cada punto experimental). Los ratones controles C57BL/6 mostraron el patrón de inmunoreactividad para ET-1, ETR-B y GFAP previamente descrito en los ratones de la cepa BALB/c (Torbidoni et al., 2005). Se encontró intensa inmunorreactividad para ET-1 y GFAP en los astrocitos, pero no en las células de Müller (Figura 5.1, A y B).

Las prolongaciones astrocitarias aumentaron después de la inyección de dispasa. También aparecieron prolongaciones de curso irregular ET-1+ y GFAP+ en el interior de la retina (Figura 5.1, C y D). El curso irregular, sumado a la ausencia de los marcadores típicos de células de Müller, CRALBP y GS, sugiere que podrían ser prolongaciones astrocitarias aberrantes. Las típicas fibras radiales de la glia de Müller mostraban inmunorreactividad GFAP, pero carecían de marca ET-1.

Los pliegues retinales aparecieron antes que los DRs o las membranas. Se encontraron pliegues internos, que solo afectaban las capas más externas de la retina, donde los astrocitos estaban intensamente inmunoteñidos para ET-1 y GFAP (Figura 5.1, E y F). Los pliegues externos correspondían a invaginaciones de las capas externas de la retina con pequeños desprendimientos restringidos a la base del pliegue (Figura 5.1, G y H).

Las membranas epirretinales aparecieron después de una o más semanas después de la inyección de dispasa. Usualmente se encontraban adheridas a regiones donde la membrana limitante interna (MLI) había desaparecido e incluían células con marca para ET-1 y GFAP (Figuras 5.1, E y F; 5.2, A y B). También se detectó inmunorreactividad ET-1 en las membranas subretinales. Estas membranas tempranas parecían ser de composición exclusivamente glial. Las membranas fibrosas se formaron en estadios más avanzados y contenían células inmunoreactivas para SMA que frecuentemente

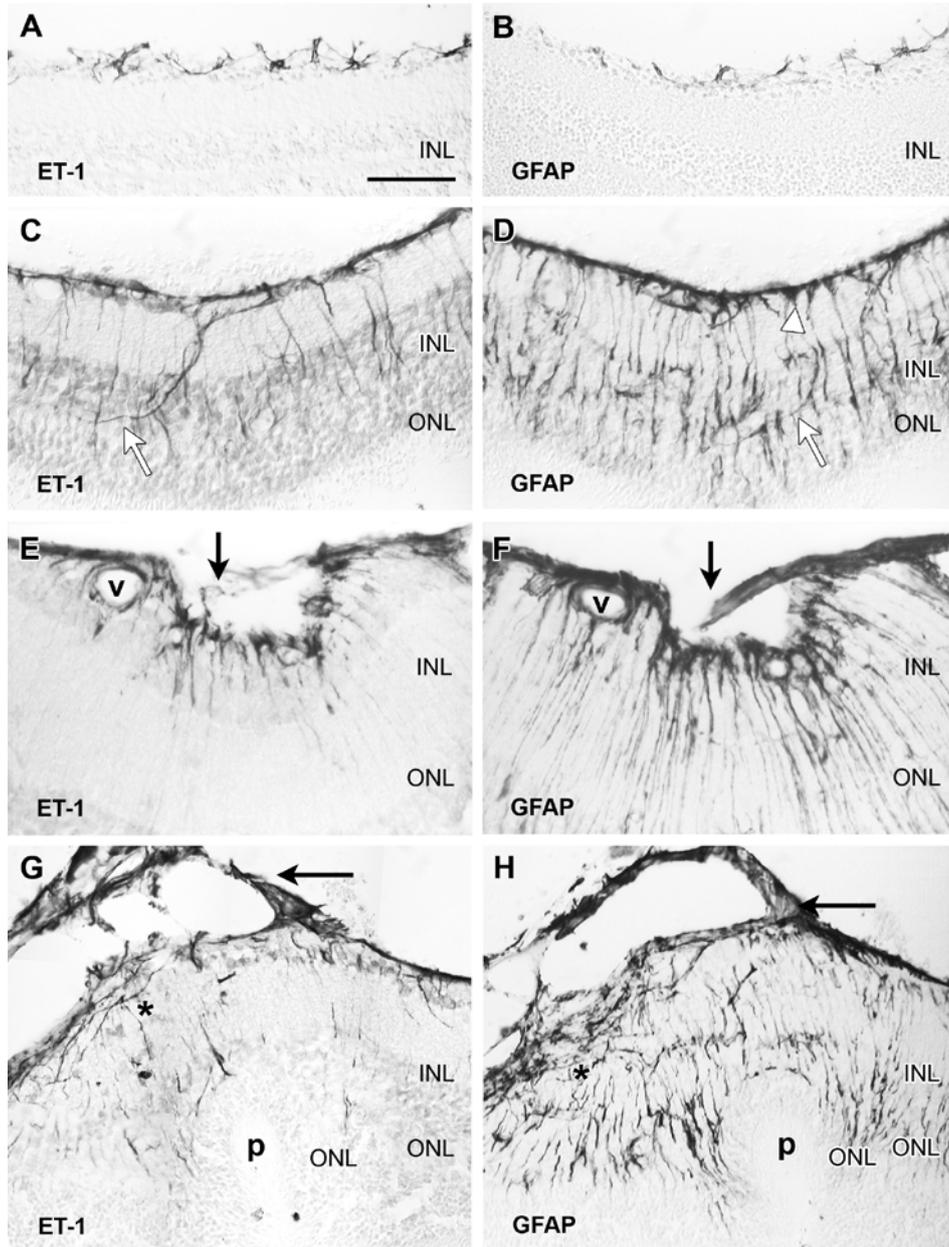


Figura 5.1. Secciones consecutivas de retina inmunoteñidas para ET-1 (izquierda) y GFAP (derecha), con la superficie vítrea hacia arriba. A y B: En la retina normal, ET-1 aparece en astrocitos a lo largo de la superficie vítrea. GFAP muestra los mismos cuerpos y prolongaciones celulares. C y D: Estas y las siguientes imágenes corresponden a ojos inyectados con dispasa (0.2 U/ $\mu$ l). Una semana después, cuerpos y prolongaciones astrocitarias con ET-1+ cubren completamente la superficie vítrea. Algunas prolongaciones se internan en la retina, ya sea en forma radial o no-radial (flechas blancas). GFAP muestra cuerpos y prolongaciones a lo largo de la superficie vítrea (punta de flecha). Casi todas las prolongaciones son radiales y pertenecen a células de Müller. Unos pocos siguen un curso no-radial (flecha blanca). E y F: Pliegues internos con pequeñas membranas adheridas (flecha). ET-1 y GFAP aparecen en el borde vítreo de los pliegues, alrededor de los vasos (v), prolongaciones intrarretinales y la membrana muestran. Las prolongaciones GFAP+ son mucho más abundantes que las ET-1+. G y H: Pliegue externo (p) con una membrana adherida a su superficie vítrea (flecha) intensamente inmunoteñida por ET-1 y GFAP. Se observan prolongaciones ET-1+ con orientación radial o paralela (asterisco). Las prolongaciones GFAP+ son predominantemente radiales y generalmente llegan hasta la capa nuclear externa (ONL). Calibración, A-E, G, H, 50  $\mu$ m; F, 25  $\mu$ m.

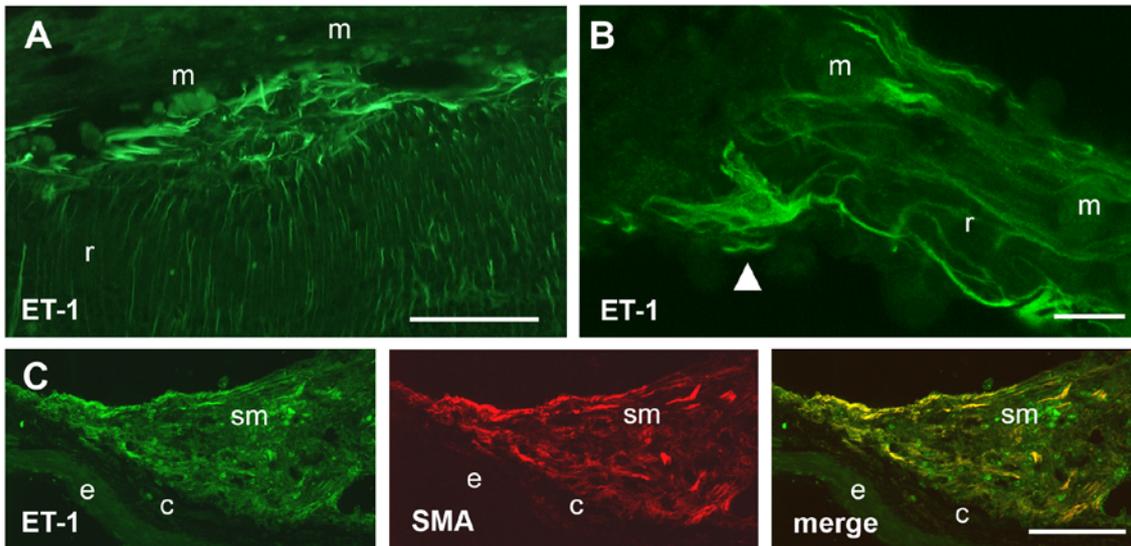


Figura 5.2. Inmunofluorescencia de ET-1 en membranas epi- y subretinales presentes en un ojo inyectado con dispasa ( $0.2 \text{ U}/\mu\text{l}$ ) dos semanas antes. A: Inmunofluorescencia ET-1 en la interfase entre la superficie vítrea y una membrana epirretinal (m). Se observa desorganización de la MLI, con gruesas prolongaciones endotelinéricas paralelas a la superficie y otras más delgadas que se internan en la retina. B: A mayor magnificación, en la interfase se observa una célula ET-1+ cuya morfología recuerda la de un astrocito. La membrana contiene numerosas prolongaciones endotelinéricas. r, retina. C: Imágenes confocales de una membrana subretinal (sm) adherida a la coroides (c), que muestra abundantes células con inmunofluorescencia ET-1 (verde) y SMA (rojo). La superposición demuestra la colocalización de ambos marcadores en células prolongadas, probablemente miofibroblastos. e, esclera. Calibración, A y B,  $50 \mu\text{m}$ ; C,  $100 \mu\text{m}$ .

colocalizaban con ET-1 (Figura 5.2, C). Las membranas fibrosas también contenían células GFAP+, pero éstas rara vez mostraron colocalización con ET-1.

### **5.2.1.2 Inmunoreactividad de ETR-B**

En las retinas controles solo se encontró inmunoreactividad ETR-B en los astrocitos. Después de la inyección de dispa, estos mostraron un gran aumento de la inmunoreactividad ETR-B. El aumento fue más notable en aquellos astrocitos ubicados sobre los pliegues internos (Figura 5.3, A). La inmunoreactividad GFAP se distribuyó más extensamente, sugiriendo una relación tanto con astrocitos como células de Müller. La prolongaciones celulares que formaban las membranas epiretinales (Figura 5.3) también mostraban inmunotinción de ETR-B. Algunas también eran GFAP+.

Las membranas fibrosas contenían células con inmunofluorescencia ETR-B, pero no pudimos observar colocalización con inmunoreactividad SMA.

## **5.2.2 Muestras Humanas**

### **5.2.2.1 Retina**

Unas pocas muestras (n = 4) contenían pequeños parches de tejido retinal. Estos fragmentos siempre mostraron desorganización histoarquitectónica. La naturaleza retinal del tejido fue comprobada mediante inmunoreactividad para opsina que reflejó la presencia de fotorreceptores. La inmunoreactividad ET-1 aparecía en una capa de células ubicadas a lo largo de la superficie vítrea, o en áreas más extensas generalmente asociadas a zonas de mayor desorganización (Figura 5.4). Los fragmentos también mostraron inmunoreactividad GFAP en las mismas regiones, a veces colocalizada con la inmunoreactividad ET-1. Al igual que en la PVR experimental, el patrón regular de GFAP a lo largo de la MLI desapareció en los sitios asociados a membranas. Estas mostraron inmunoreactividad tanto para ET-1 como para GFAP (Figura 5.4, C).

### **5.2.2.2 Membranas**

Las regiones no fibrosas de las membranas epi- y subretinales contenían muchas células ET-1+ y GFAP+, pero unas pocas células SMA+. Por el contrario, las regiones fibrosas contenían numerosas células ET-1+ y SMA+. Estas inmunoreactividades

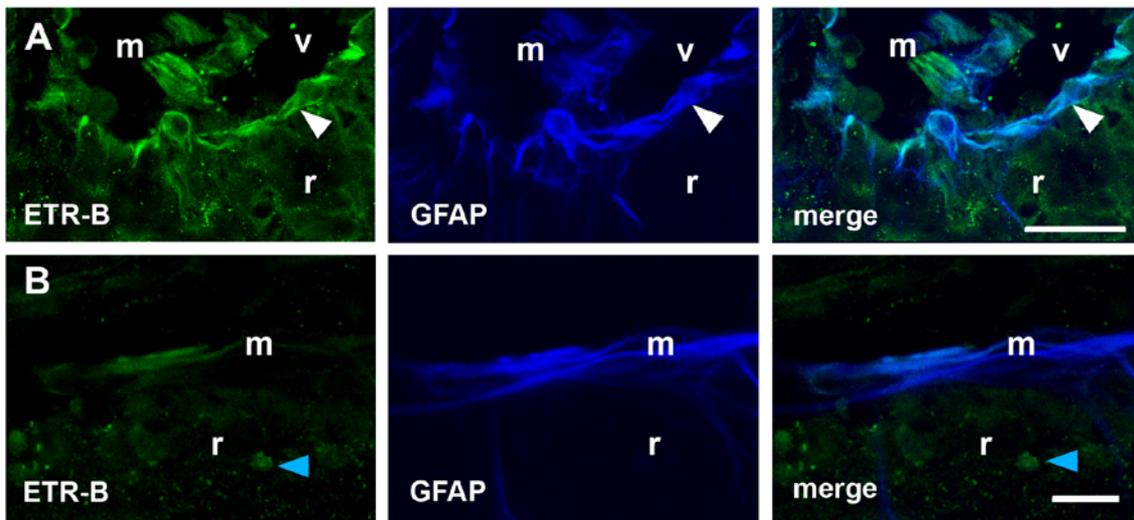


Figura 5.3. Imágenes confocales de membranas epirretinales dos semanas después de la inyección de dispasa ( $0.2 \text{ U}/\mu\text{l}$ ), inmunomarcadas con ETR-B y GFAP. A: En la interfase de la membrana (m) y retina (r) aparecen cuerpos y prolongaciones celulares ETR-B+ (punta de flecha blanca). La membrana también muestra estructuras ETR-B+. v, vítreo. El anticuerpo GFAP marca las mismas estructuras de la interfase, mientras que en la membrana se observa segregación de las inmunofluorescencias ETR-B y GFAP. B: En otra membrana epirretinal se observan unas pocas células ETR-B+ y un número mayor de células GFAP+. La superposición muestra colocalización entre las células ETR-B y GFAP; mientras que la mayor parte de las GFAP+ no poseen ETR-B. La punta de flecha azul señala un núcleo ETR-B+. Calibración, A y B,  $25 \mu\text{m}$ .

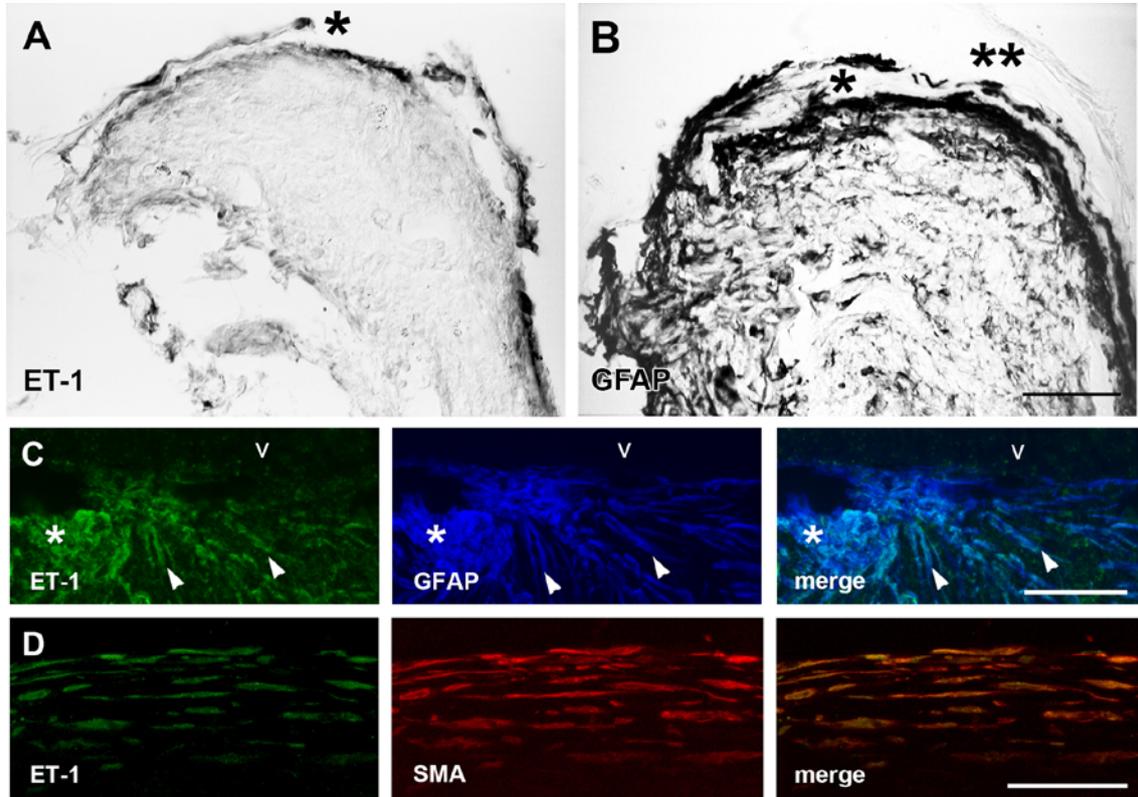


Figura 5.4. Inmunoreactividad ET-1 en muestras humanas. A y B, secciones a través de un fragmento de retina incluido en una membrana epirretinal humana. ET-1 y GFAP fueron detectados mediante procesamiento inmunoenzimático y observados con microscopía de Nomarski. A: Aunque la histoarquitectura retinal está desorganizada, se encuentra inmunoreactividad ET-1 a lo largo de la superficie vítrea. El asterisco indica una membrana epirretinal con intensa inmunoreactividad ET-1. B: Otra sección del mismo fragmento (no consecutiva) muestra extensa inmunoreactividad GFAP en casi todo el espesor de la retina. Además se observan células GFAP+ en una membrana epirretinal (asterisco) que aparentemente emerge de la superficie retinal. Otra membrana adyacente (dos asteriscos) no presenta inmunoreactividad. C: Imágenes confocales a nivel de un pliegue de un fragmento de retina humana. Se observa un crecimiento epirretinal (asterisco) con intensa inmunofluorescencia ET-1. También aparecen células ET-1+ que cursan radialmente (cabezas de flecha) o paralelas a la superficie vítrea (v). Las estructuras GFAP+ se encuentran en las mismas localizaciones pero son más numerosas. D: Membrana epirretinal fibrosa que muestra células alargadas dispuestas en forma paralela. Las células presentan inmunofluorescencia para ET-1 y SMA. La superposición demuestra la colocalización de dichos marcadores en las mismas células. Calibración, A, B y D, 50  $\mu\text{m}$ ; C, 25  $\mu\text{m}$ .

frecuentemente colocalizaban en células que pudieron ser identificadas como miofibroblastos endotelinérgicos (Figura 5.4, D). No detectamos colocalización de ET-1 y GFAP en membranas fibrosas. Tampoco encontramos ejemplos de colocalización de ET-1 con CRALBP o GS.

Las membranas PVR humanas también contenían numerosas células con inmunoreactividad ETR-B. Generalmente mostraban un fenotipo alargado y se disponían en capas regulares (Figura 5.5). Estas membranas contenían miofibroblastos con inmunoreactividad SMA, con o sin inmunoreactividad ETR-B (Figura 5.5, C-E). Las membranas fibrosas rara vez contenían células ETR-B+ y GFAP+ (Figura 5.5, F). No detectamos diferencias significativas entre las membranas epi- y subretinales.

### **5.2.3 Bloqueo de los receptores endotelinérgicos**

Cuando ensayamos inyecciones intravítreas con mayor concentración de dispasa (0.3 U/ $\mu$ l) en ratones de 8 semanas de edad (o menos) observamos que esta dosis inducía el crecimiento de membranas en todos los ojos después de una semana de la inyección. Por lo tanto, usamos este procedimiento para evaluar el efecto del bloqueo de los receptores endotelinérgicos sobre el curso de la PVR experimental. Los animales recibieron la inyección intravítrea de dispasa y, una vez recuperados de la anestesia, fueron separados al azar en dos grupos (n = 6 por grupo). Un grupo recibió una inyección diaria de tezosentan (10 mg/kg, vía subcutánea, Actelion Pharmaceuticals, Zurich, Switzerland) y el otro recibió una inyección igual de solución salina. Al cabo de una semana, los ojos fueron fijados y seccionados de manera seriada. Una de cada tres secciones (24 a 26 secciones por ojo) fue procesada inmunoenzimáticamente para la detección de GFAP.

Para cuantificar la severidad de las lesiones inducidas por dispasa, un observador ciego determinó en cada sección la presencia o ausencia de pliegues retinales, membranas epi y subretinales. Se aplicó un sistema de puntaje donde: la presencia de pliegues sumaba 1 punto, presencia de membrana epiretinal, 1 punto (o 2 puntos si la membrana era más grande que la mitad de la retina) y la presencia de membrana subretinal, 1 punto. Los puntos totales para cada tipo de lesión en cada ojo fueron divididos por el número de

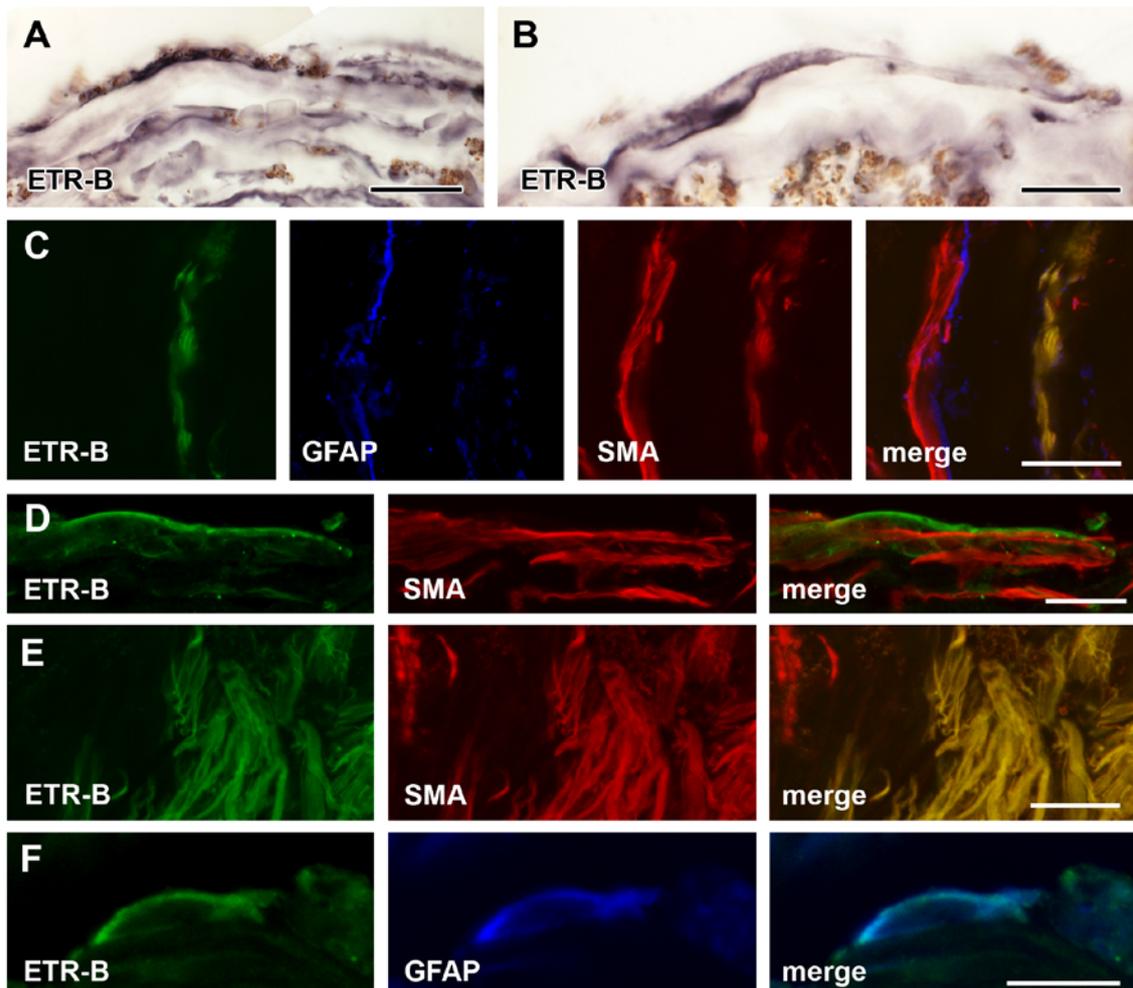


Figura 5.5. ETR-B en membranas epirretinales humanas. A: En una membrana fibrosa, el procedimiento inmunoenzimático muestra células ETR-B+ dispuestas en capas paralelas. B: A mayor magnificación, se observan las células ETR-B+ ubicadas paralelamente a la superficie de la membrana. La membrana contiene abundantes gránulos pigmentados. C: Triple inmunofluorescencia confocal para ETR-B, GFAP y SMA. ETR-B y GFAP aparecen en dos capas celulares diferentes. SMA se encuentra en las dos capas, pero la superposición demuestra que sólo colocaliza con ETR-B. D: En otra membrana se observan células elongadas con inmunofluorescencia ETR-B y SMA. La superposición de imágenes muestra que son células vecinas pero diferentes. E: En una tercera membrana aparecen numerosas células con inmunofluorescencia ETR-B y SMA. La superposición muestra un grupo de células amarillas, que demuestra la colocalización de ambos marcadores. Otro grupo de células presenta solamente inmunofluorescencia SMA. F: En esta membrana aparece una célula con inmunofluorescencia para ETR-B y GFAP. Las imágenes superpuestas demuestran su colocalización. Calibración, A, C-E, 25  $\mu\text{m}$ ; B y F, 15  $\mu\text{m}$ .

secciones cuantificadas. El puntaje promedio refleja la presencia y extensión de las lesiones de cada ojo. Las comparaciones estadísticas fueron hechas con un estudio de la varianza de dos vías, con un post test de Bonferroni (GraphPad Prism version 4.00 para Windows; GraphPad Software, San Diego, CA).

Todos los animales que recibieron solución salina mostraron grandes desprendimientos, acompañados de pliegues retinales internos y externos, y membranas epi- y subretinales. En cambio, los animales que recibieron tezosentan mostraron mínimos pliegues retinales y escaso crecimiento de membranas (Figura 5.6). Asimismo, los animales tratados con tezosentan presentaban menor inmunorreactividad GFAP.

El análisis cuantitativo de estas características (Tabla 5.1) indicó que el tratamiento con tezosentan reducía significativamente la cantidad de pliegues ( $P < 0.01$ ) y membranas epiretinales ( $P < 0.01$ ). Sin embargo, la disminución de membranas subretinales no resultó estadísticamente significativa. Notoriamente, las membranas subretinales no contenían inmunoreactividad de ETR-B, mientras que las células ETR-B+ eran frecuentemente encontradas en las membranas epiretinales y la retina adyacente a las mismas (Figura 5.7).

La inmunorreactividad GFAP en los tratados con tezosentan y sus controles sugieron una reducción en la gliosis retinal, aunque la inmunorreactividad GFAP permaneció elevada en las regiones con DR o membranas subretinales. Para verificar esta diferencia se prepararon otros grupos de animales, semejantes a los descritos anteriormente, cuyas retinas fueron homogeneizadas para determinar GFAP por Western blot ( $n = 6$  por grupo). La densitometría de las bandas mostró una tendencia a la disminución de los niveles de GFAP en los ratones tratados con tezosentan, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

**Tabla 5.1. Lesiones PVR en ratones controles o tratados con Tezosentan**

Lesiones	Salina	Tezosentan
----------	--------	------------

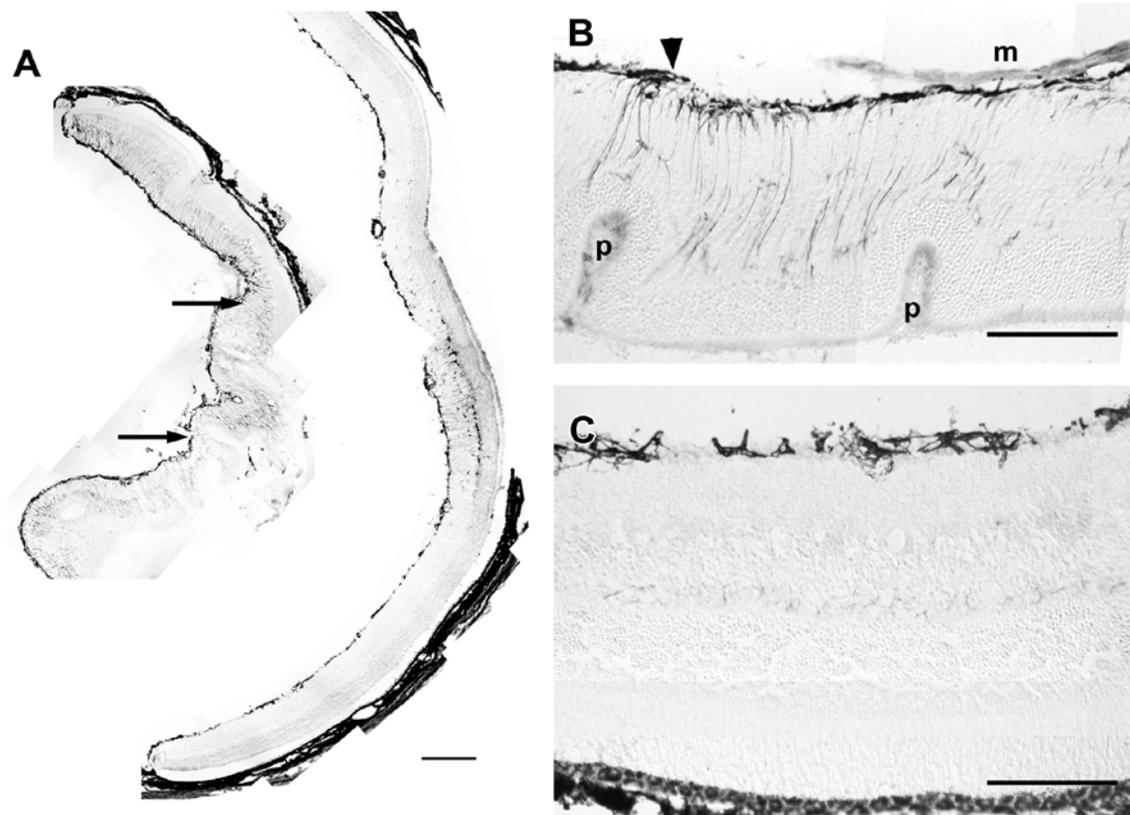


Figura 5.6. Microfotografías de criosecciones de retinas murinas lesionadas con dispasa ( $0.3 \text{ U}/\mu\text{l}$ ) que recibieron salina o tezosentan durante una semana. Los cortes fueron inmunomarcados con GFAP. A: La retina de un animal control (izquierda) muestra severos plegamientos y membranas epiretinales (flechas). Grandes áreas de la retina interna muestran una fuerte inmunorreactividad GFAP. Después del tratamiento con tezosentan (derecha), la retina no presenta pliegues. Solo se detecta inmunorreactividad GFAP en el borde vítreo y en una pequeña zona de la retina interna. B: A mayor aumento, se muestra una retina control que presenta pliegues en la región externa (p) y una membrana epiretinal. La inmunorreactividad GFAP forma una gruesa capa a lo largo de la superficie vítreo y se extiende hacia la retina externa. La punta de flecha muestra crecimientos vítreos GFAP+. C: En un animal tratado con tezosentan, la retina aparece bien adherida al EPR y muestra una buena preservación de las capas retinales. Solo se encuentran estructuras GFAP+ sobre la superficie vítreo. Calibración, A,  $200 \mu\text{m}$ ; B y C,  $60 \mu\text{m}$ .

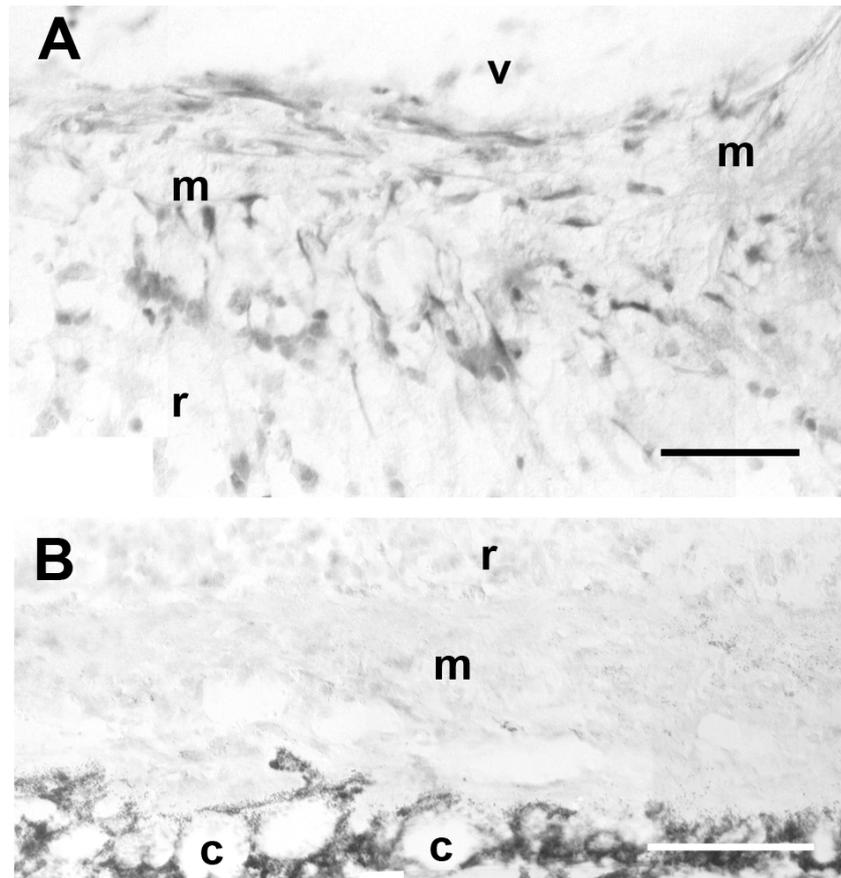


Figura 5.7. Inmunoreactividad ETR-B en membranas epi- y subretinales de ratón desarrolladas una semana después de inyección intravítrea de dispasa (0.3 U/ $\mu$ l). A: La membrana epiretinal (m) está adherida a la superficie retinal y exhibe un gran número de células ETR-B+. v, espacio vítreo; r, retina. B: Esta membrana subretinal (m), alojada entre la retina (r) y la coroides (c), no muestra inmunoreactividad ETR-B. Calibración, A, 50  $\mu$ m; B, 100  $\mu$ m.

Pliegues retinales	0.73 ± 0.13	0.14 ± 0.07
Membranas epiretinales	0.78 ± 0.22	0.10 ± 0.07
Membranas subretinales	0.62 ± 0.13	0.41 ± 0.14

---

Para evaluar el efecto del tezosentan sobre la gliosis, medimos GFAP en retinas desprendidas por medio de inyección subretinal de ácido hialurónico. La retina desprendida, curiosamente, expresó niveles de GFAP muy superiores a los observados después de la dispasa. Después del tratamiento con tezosentan durante una semana, las retinas expresaron aproximadamente el 50% del GFAP medido en las retinas controles (Figura 5.8).

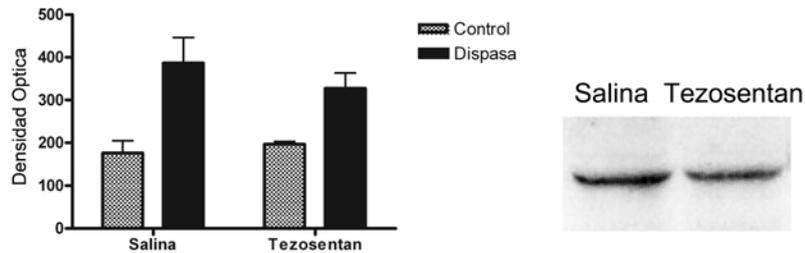
#### **5.2.4 ET-1 y ETR-B en la PVR y DR tempranos**

Para evaluar la importancia de la activación endotelinérgica en la transformación glial que precede el desarrollo de membranas epi- y subretinales, estudiamos etapas más tempranas de la PVR experimental. La RT-PCR clásica demostró que los ARNm de prepro-ET-1 y ETR-B estaban significativamente aumentados 3 días después de la inyección de dispasa (Figura 5.9), antes de la formación de las membranas. También, encontramos aumento de estos ARNms después de DR experimental, que en los ratones es seguido por readhesión espontánea, sin formación de membranas.

La histología mostró que los pliegues retinales estaban presentes apenas 3 días después de la inyección de dispasa, y que los astrocitos de las zonas afectadas mostraban un fuerte incremento de inmunoreactividad ET-1 y ETR-B. Las prolongaciones de los astrocitos muchas veces se extendían hacia la cavidad vítrea, sugiriendo una temprana disrupción de la MLI (Figura 5.10, A y B, E y F).

No se observaron pliegues después del DR. Pero en la zona desprendida, los astrocitos eran más numerosos y mostraban mayor inmunoreactividad ET-1 que en las retinas controles (Figura 5.10, C y D). Llamativamente, la inmunoreactividad ETR-B aumentó

### A. Proteínas GFAP después de inyección de dispasa



### B. Proteínas GFAP después de DR

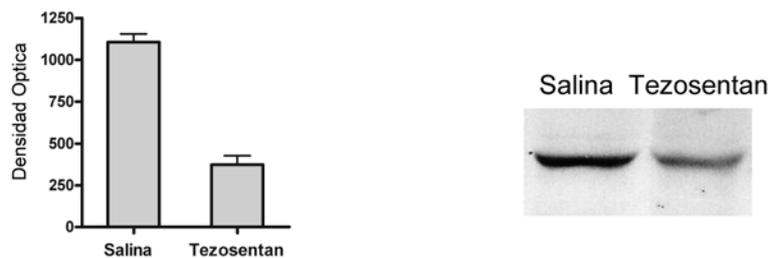


Figura 5.8. Inmunoblots que muestran la expresión de GFAP en retinas con distintos tratamientos. A: Se compara la expresión de GFAP en animales con y sin inyección de dispasa (0.3 U/ $\mu$ l), que recibieron salina o tezosentan durante una semana ( $n = 4$  para cada grupo). La densitometría muestra que el aumento de GFAP provocado por la lesión es significativo ( $P < 0.01$ ). Después del tratamiento con tezosentan no se detectan modificaciones de GFAP en los animales sin PVR experimental, pero el aumento provocado por la dispasa es significativamente menor. Las diferencias fueron evaluadas por ANOVA. Las bandas corresponden a muestras de ojos con PVR experimental que recibieron salina o tezosentan. No se aprecian diferencias entre las bandas. B: Después del desprendimiento de retina (DR) se produce un gran incremento en la proteína de GFAP, que es significativamente reducido por el tratamiento con tezosentan. Prueba de t para muestras pareadas ( $n = 8$  pares,  $P < 0.0004$ ). Las bandas corresponden a muestras de ojos que sufrieron un DR y tratados una semana con salina o tezosentan. Obsérvese la gran reducción de proteína GFAP después del tratamiento con tezosentan.

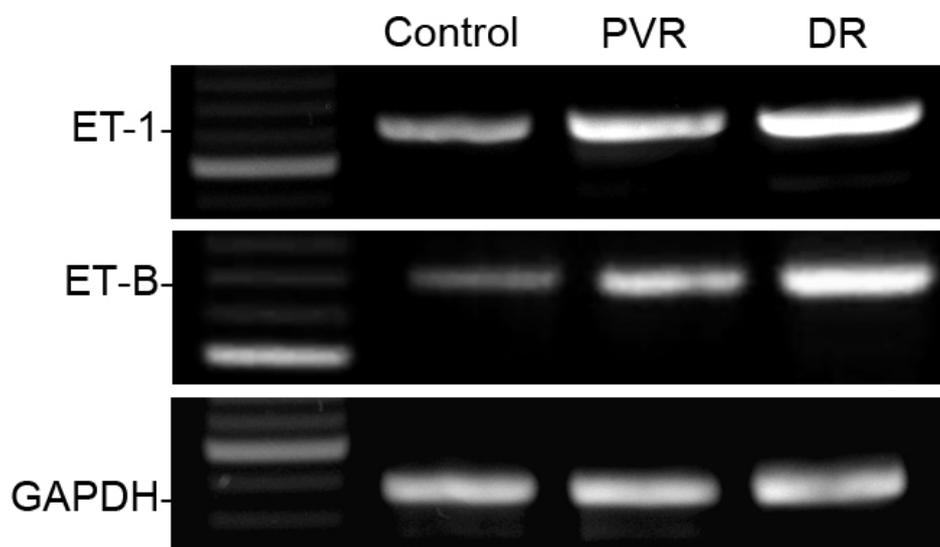


Figura 5.9. Niveles de los ARNms de prepro-ET-1, ETR-B y GAPDH en animales sometidos a DR o PVR experimentales. Los extractos, preparados 3 días después de los procedimientos, muestran aumento de los amplicones prepro-ET-1 y ETR-B, que parece mayor en los animales sometidos a DR que en aquellos inyectados con dispasa. La intensidad de los amplicones de GAPDH no cambia significativamente.

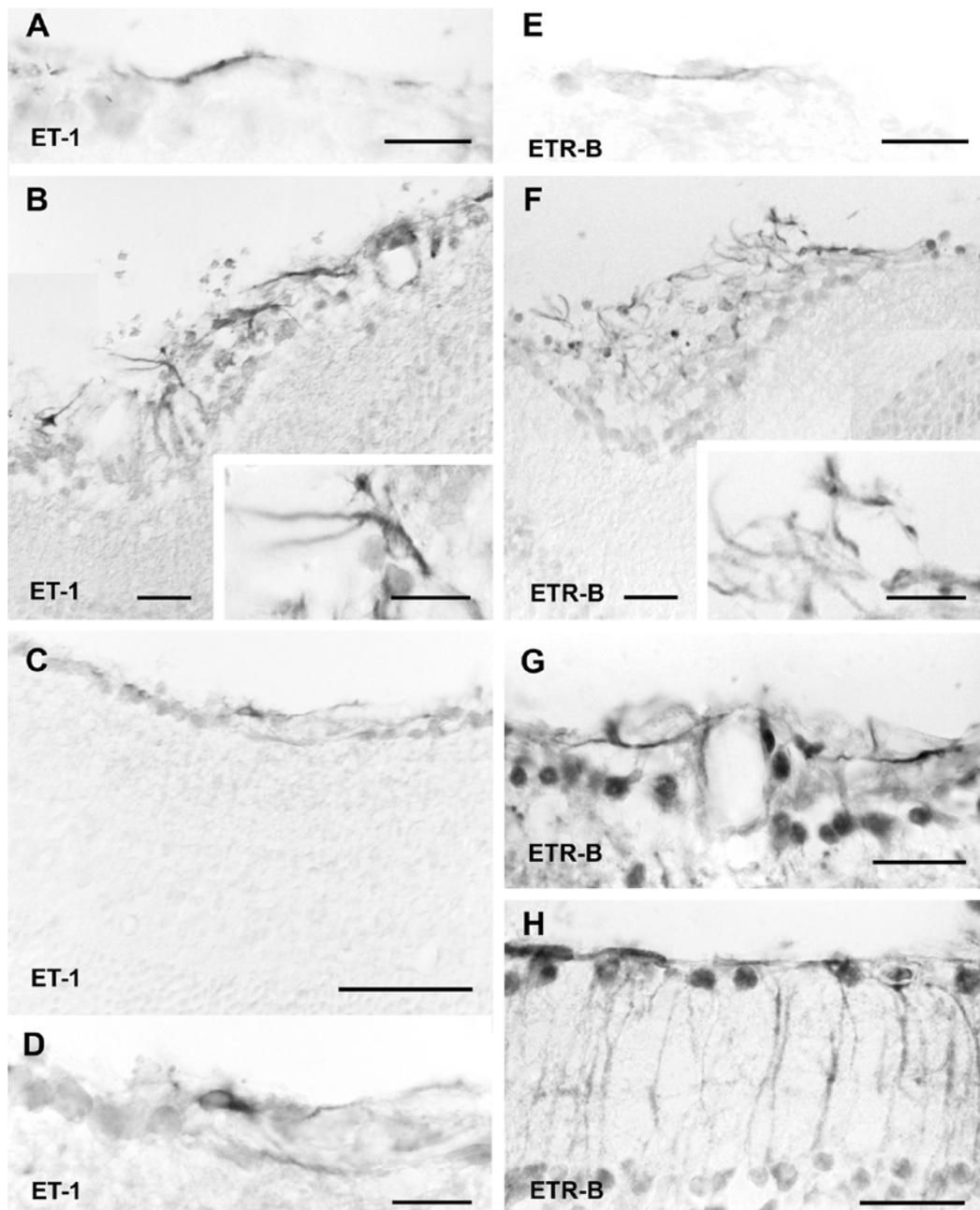


Figura 5.10. Reacción inmunoenzimática para ET-1 (izquierda) y ETR-B (derecha). A: Vista a alto aumento de una retina normal, con escasas prolongaciones astrocitarias ET-1+. B: El número de astrocitos ET-1+ aumenta después de la inyección de dispasa (0.3 U/ $\mu$ l, 3 días). La MLI desaparece y las prolongaciones astrocitarias invaden el espacio vítreo. El detalle ilustra el gran tamaño de estos astrocitos. C: Después de DR, la inmunorreactividad ET-1 está moderadamente incrementada. Solo aparece en astrocitos, que no invaden el espacio vítreo. D: Detalle de C a mayor magnificación. E: Retina normal, que muestra la débil inmunorreactividad ETR-B en prolongaciones astrocitarias. F: Después de dispasa, aparecen numerosos astrocitos ETR-B+ en la superficie vítrea de la retina. Sus prolongaciones invaden el espacio vítreo en zonas donde ha desaparecido la MLI. El detalle muestra el crecimiento vítreo de estas prolongaciones. G: Imagen correspondiente a una retina desprendida que muestra la preservación de la MLI. Hay intensa inmunorreactividad ETR-B en los astrocitos perivasculares. H: En otra retina desprendida se encuentra inmunorreactividad ETR-B en astrocitos y células de Müller. Estas preparaciones también muestran inmunorreactividad ETR-B en los núcleos celulares. Calibración, A, detalle en B, D, E y detalle en F, 15  $\mu$ m; B, F-H, 25  $\mu$ m; C, 50  $\mu$ m.

no solo en los astrocitos sino también en algunas células de Müller (Figura 5.10, G y H).  
En las retinas con DR no encontramos signos de alteración de la MLI.

## **5.3 Discusión**

Nuestros hallazgos en la PVR humana y experimental demostraron la presencia de células que expresan ET-1 y ETR-B en este tipo de lesión. La participación de las vías endotelinérgicas en el desarrollo de la PVR resultó apoyada por experimentos donde logramos prevenir los plegamientos de la retina y el crecimiento de membranas epiretinales en ratones tratados con tezosentan, un antagonista dual de los receptores endotelinérgicos.

### **5.3.1 Moléculas endotelinérgicas y PVR**

Entre las células normales de los ratones BALB/c, los astrocitos presentan la mayor inmunoreactividad de ET-1 (Torbidoni et al., 2005). Estas observaciones han sido ahora confirmadas en los ratones C57BL/6. La inmunoreactividad de ET-1 en los astrocitos y en sus prolongaciones celulares aumenta después de las lesiones tipo PVR inducida por una única inyección intravítrea de 0.2 o 0.3 U/ $\mu$ l de dispasa. También aumenta después de DR producido por inyección subretinal de ácido hialurónico. En las lesiones de PVR experimental, los astrocitos mostraron un alto y anormal número de prolongaciones celulares, que se extendían hacia la cavidad vítrea en zonas de MLI alterada. Es posible que la pérdida focal de la MLI constituya un paso crítico para la migración de los astrocitos. Cabe destacar que la migración focal de los astrocitos fue identificada en las primeras descripciones de la proliferación perirretinal masiva (Laqua and Macheimer, 1975).

Tres días después de la inyección intravítrea de la dispasa, los astrocitos mostraron un gran incremento en la inmunoreactividad de ET-1 y ETR-B, que fue acompañada por un aumento en los ARNm de prepro-ET-1 y ETR-B en la retina. El incremento simultáneo de ET-1 y ETR-B sugiere que los astrocitos podrían activarse por un mecanismo autócrino. El bloqueo de esta vía de señalización impediría la extensión de las prolongaciones celulares astrocitarias y en consecuencia también impediría el plegamiento retinal y el crecimiento de las membranas epiretinales. Esta hipótesis es coherente con la persistencia de las membranas subretinales, que no expresan ETR-B, en los animales tratados con tezosentan. Es necesario realizar nuevos estudios con

antagonistas selectivos para comprender el rol de cada receptor endotelinérgico en la PVR. Aunque nosotros no hemos observado ETR-A en la glia de la retina (Torbidoni et al., 2005; Torbidoni et al., 2006), los astrocitos de cerebro en cultivo podrían expresar ambos receptores (Schinelli et al., 2001). Por otra parte, algunos efectos endotelinérgicos sobre los astrocitos y fibroblastos requieren la participación simultánea de ambos receptores (Blomstrand et al., 2004; Shi-Wen et al., 2006).

### **5.3.2 Modelo explicativo de la participación endotelinérgica en el plegamiento retinal y el crecimiento de las membranas**

La mayor parte de los astrocitos del cerebro no expresan ET-1 en condiciones normales, aunque suelen encontrarse astrocitos con inmunoreactividad ET-1 en regiones mecánicamente deformadas del cerebro. La producción de ET-1 en los cultivos de astrocitos aumenta cuando son sometidos a fuerzas de estiramiento (Ostrow et al., 2000; Ostrow and Sachs, 2005). Por el contrario, los astrocitos retinales siempre muestran inmunoreactividad contra ET-1, aun en ausencia de injuria. Dado que los astrocitos retinales se ubican en la unión entre la retina y el vítreo, la elevada expresión de ET-1 podría reflejar las fuerzas de tensión que actúan sobre esta superficie cóncava. Cualquier disrupción de la MLI, como la que ocurre después de la inyección de dispa, podría aumentar la tensión sobre los astrocitos e incrementar la síntesis de ET-1. Esto potenciaría la producción y secreción de más ET-1, como se describió en otros sistemas (Ehrenreich et al., 1991). Aunque la disrupción de la MLI no necesariamente dependería de la activación endotelinérgica, la inhibición de estas vías podría prevenir la formación de membranas vítreas, aun en presencia de una MLI alterada.

ET-1 controla la proliferación astrocitaria, probablemente vía ETR-B (MacCumber et al., 1990; Prasanna et al., 2002; Schinelli et al., 2001). Además, dichos receptores también podrían mediar un efecto mitogénico similar sobre las células de Müller. Por lo tanto, la progresiva gliosis en la PVR podría ser automantenida por la continua secreción de ET-1 iniciada en los astrocitos. El bloqueo de los receptores endotelinérgicos por tezosentan podría inhibir este mecanismo autócrino como también

los efectos mitogénicos e hipertróficos de ET-1. La disminución en la expresión de GFAP podría también ayudar a quebrar este circuito patogénica, ya que la ausencia de GFAP limita la hipertrofia glial y la hiperexpresión de ETR-B (Nakazawa et al., 2007; Wilhelmsson et al., 2004).

El plegamiento de la retina es un evento temprano en la PVR experimental (Canto Soler et al., 2002), lo que implica que los cambios en la forma celular ocurren antes que las membranas crezcan. El tratamiento con tezosentan disminuyó significativamente los pliegues retinales internos y externos, aun en presencia de grandes DR. Este fenómeno puede ser atribuido a la regulación del citoesqueleto inducida por ET-1, ya que los astrocitos expuestos a este péptido incrementan los niveles de proteínas asociadas a los microtúbulos y actina (Egnaczyk et al., 2003).

### **5.3.3 Fenotipos endotelinérgicos en las membranas epi- y subretinales**

Las membranas epi- y subretinales contenían células inmunoreactivas a ET-1. Algunas de estas células también mostraron inmunoreactividad para GFAP y usualmente se ubicaban en las membranas vítreas tempranas o en la unión entre la membrana epiretinal y la retina. Por el contrario, en las regiones fibrosas, las células ET-1+ a menudo colocalizaban con SMA. La transformación de los astrocitos en miofibroblastos es muy probable. SMA ha sido previamente detectada en los astrocitos (Lecain et al., 1991), mientras que la transformación de células de Müller en miofibroblastos es acompañada por pérdida de la expresión de GFAP (Guidry, 1996). Los miofibroblastos pueden también provenir de otros tipos celulares implicados en el desarrollo de la PVR, como los macrófagos y el EPR (Gamulescu et al., 2006; Vyalov et al., 1993), que también pueden expresar ET-1 (Narayan et al., 2004).

Las membranas de PVR también incluían células ETR-B+. En las membranas humanas, una fracción de estas células correspondían a una subpoblación de miofibroblastos. En los ratones, la colocalización de ETR-B con GFAP o SMA fue raramente encontrada. Por lo tanto, consideramos que se requieren nuevos estudios para identificar la identidad fenotípica de las células ETR-B+ presentes en las membranas. Esto puede ser de gran

importancia terapéutica, porque apoyaría el uso de los bloqueantes endotelinérgicos en la prevención de la fibrosis y RD traccionales. La importancia de los receptores ETR-B en el crecimiento de las membranas está a su vez reflejado por la persistencia de las membranas subretinales, en las cuales no pudimos detectar la expresión de ETR-B, después del tratamiento con tezosentan. Las diferencias entre las membranas epi y subretinales son bien conocidas (Fisher et al., 2005). En el modelo murino de dispa, solo las membranas subretinales contienen células EPR (Canto Soler et al., 2002). Sin embargo, las membranas subretinales humanas contienen células ETR-B+.

En resumen, nuestros hallazgos apoyan la participación de los receptores endotelinérgicos en el desarrollo de las lesiones típicas de la PVR, activación glial, plegamiento de la retina y crecimiento de membranas. Se requieren mayores estudios para comprender la importancia de los distintos circuitos autócrinos y parácrinos, así como la contribución de las distintas isoformas de endotelina a la fisiopatología de la PVR.

## **6. Sistema endotelinérgico y uveítis**

### **6.1 Introducción y objetivos específicos**

La uveítis inducida por endotoxina (UIE) es un modelo animal de inflamación ocular aguda inducido por la administración de lipopolisacárido (LPS), un componente de la envoltura externa de las bacterias Gram negativas. Con frecuencia, las lesiones inflamatorias de la uveítis resultan en vasculitis, desprendimiento de la retina o glaucoma que conducen a pérdidas severas de la visión e incluso ceguera. Por lo tanto, es de gran interés médico dilucidar los mecanismos que intervienen en su patogenia.

LPS aumenta la expresión de diversos mediadores inflamatorios, como la IL-6, TNF- $\alpha$ , prostaglandina E2, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1 y óxido nítrico (NO). Todos los cuales contribuyen al desarrollo de la UIE, es decir, a la rotura de la barrera hemato-ocular y a la infiltración leucocitaria (Hoekzema et al., 1992).

En la rata con sepsis y endotoxemia los niveles circulantes de ET-1 se encuentran sumamente elevados (Zaedi et al., 2006). Diversos estudios muestran que los bloqueantes de receptores endotelinérgicos reducen los efectos endotóxicos (Albertini et al., 2003; Andersson et al., 2008). Se ha demostrado que en la inflamación intestinal, ET-1 induce rodamiento y adhesión de leucocitos en el endotelio venular (Boros et al., 1998). Un mecanismo semejante podría aumentar las posibilidades de ingreso de leucocitos circulantes a la retina. Los receptores endotelinérgicos del endotelio vascular cerebral y los astrocitos que lo rodean podrían ser, por lo menos parcialmente, responsables del pasaje de leucocitos hacia la retina, que requiere la activación de proteínas G heterotriméricas (Adamson et al., 2002).

La administración de ET-1 aumenta la permeabilidad de la barrera hemato-cerebral en ratas (Miller et al., 1996). Unos de sus efectos es la reducción del transporte mediado por P-glucoproteína (Bauer et al., 2007; Hartz et al., 2004). La infección con HIV-1, que altera la barrera hemato-encefálica, aumenta la expresión del ARNm de ET-1 y la secreción del péptido en el endotelio y los astrocitos (Didier et al., 2002). Asimismo, la

presencia de ET-1 en el EPR ha sido asociada con la estabilidad de la barrera hemato-retinal externa (Narayan et al., 2003).

Por otra parte, la uveítis es acompañada por una hiperexpresión de GFAP (Hauck et al., 2007), que indica activación glial. En el SNC, algunos estudios han demostrado que LPS activa las MAP quinasas ERK y p38 en los astrocitos (Bhat et al., 1998). En la retina, LPS induce activación de ERK, predominantemente en las células de Müller, sin que se detecten cambios de JNK o p38 (Takeda et al., 2002). En la uveítis experimental, las áreas de mayor pérdida de las proteínas propias de las uniones ocluyentes, que corresponden a las zonas de apertura de la barrera hemato-retinal, se asocian con redistribución de las prolongaciones perivasculares de los astrocitos (Xu et al., 2005). Dado que la endotelina astrocitaria puede controlar la permeabilidad de la barrera, cabe preguntarse como es afectada por la UIE.

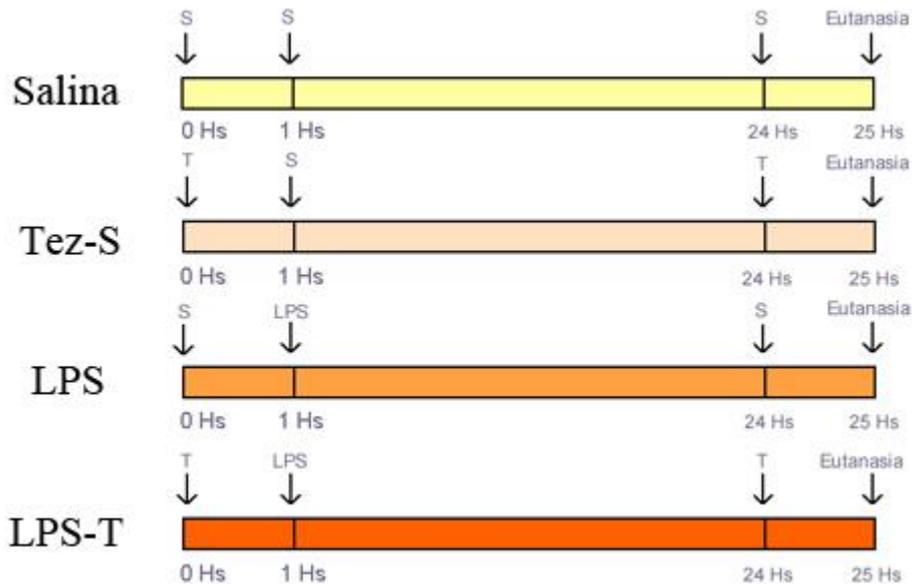
Los objetivos específicos de trabajo fueron:

- a. Estudiar la permeabilidad de la BHR y la reacción astrocitaria en la UIE, y su evolución después del tratamiento con tezosentan, el bloqueante de los receptores endotelinérgicos.
- b. Correlacionar estos cambios con el estado de activación de las moléculas de estrés.

### 6.1.1.1 Diseño experimental

Se empleó el modelo de uveítis inducida por endotoxina (UIE) producido por inyección de LPS (Cousins et al., 1984). La severidad de la UIE fue evaluada por los siguientes parámetros: extravasación de fluidos y células, activación de los astrocitos y activación de las vías de señalización extracelular relacionadas con el estrés (ver métodos en el Capítulo 2).

Utilizamos ratones de la cepa BALB-c, machos de 5-8 semanas, divididos en cuatro grupos experimentales según se muestra en el siguiente esquema:



Al iniciar el experimento, los animales recibieron una inyección subcutánea (sc) de salina (S) o tezosentan (T, 10 mg/kg; Acthelion, Suiza). Una hora después recibieron una inyección intraperitoneal (ip) de LPS (5 mg/kg) o salina. La inyección de tezosentan se repitió a las 24 horas. Los animales fueron sacrificados 1 hora más tarde.

## 6.2 Resultados

### 6.2.1 Características de la UIE

En los animales controles, que no habían recibido LPS, el azul de Evans estaba restringido a los vasos sanguíneos. Por el contrario, la presencia extravascular de azul de Evans en todos los animales que recibieron LPS demostró el aumento de permeabilidad vascular. La extravasación apareció como edema de la papila, y focos de extravasación de fluidos y células dispersos en toda la superficie de la retina (Figuras 6.1; 6.2, A y B). Los capilares de los plexos internos aparecían ingurgitados y con trayecto relativamente tortuoso.

La inmunofluorescencia para GFAP, que aumentó en los astrocitos y las células de Müller, demostró el estado de activación glial inducido por LPS. El aumento de GFAP fue confirmado por Western blot (Figuras 6.3, A y B; 6.4, A y B). Simultáneamente, los astrocitos mostraron un leve aumento de la inmunofluorescencia endotelinérgica (Figura 6.5, A y B).

La UIE tuvo un marcado impacto sobre los receptores endotelinérgicos. Los receptores ETR-A aumentaron en la CPE, en neuronas amacrinas de la CNI, y en la CCG (Figura 6.6, A y B). ETR-B, por su parte, aumentó en los astrocitos asociados a los vasos retinianos internos (Figura 6.7, A y B).

El estado neuroinflamatorio inducido por la UIE también modificó la actividad de las quinasas y factores de transcripción asociados a las vías de estrés. En los animales controles la quinasa activada p-JNK se encontró en la retina interna, en la capa de fibras del NO y MLI, la CPI, y en una hilera de núcleos ubicados en la zona media de la CNI, que probablemente corresponden a células de Müller (Figura 6.8, A). En los animales con UIE la inmunorreactividad p-JNK aumentó en todos los sitios mencionados, especialmente en las prolongaciones vítreas de las células de Müller y los astrocitos, y en los núcleos de la CNI. Además, apareció inmunorreactividad en la CPE, que no fue observada en los animales sanos (Figura 6.8, B).

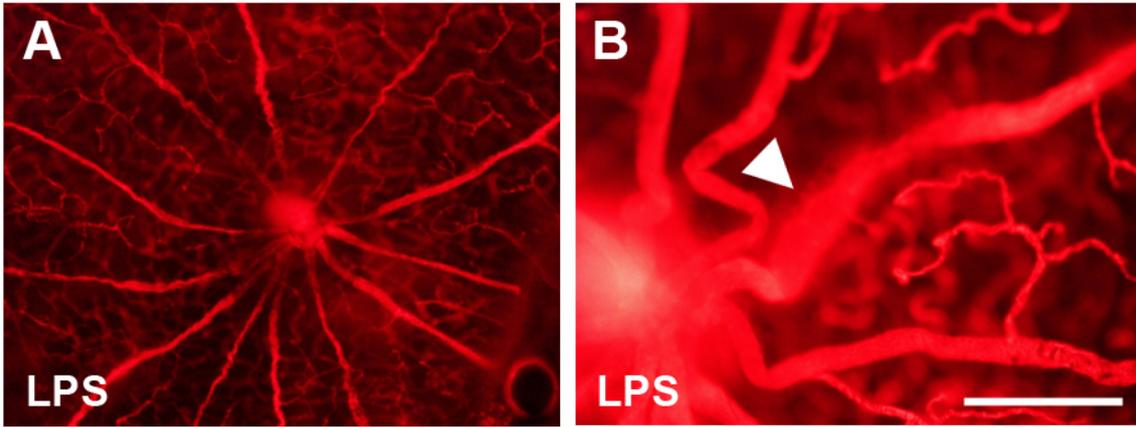


Figura 6.1. Evaluación de la permeabilidad de la BHR en retinas enteras de animales LPS. El colorante azul de Evans inyectado por vía intravenosa abandona la circulación cuando la permeabilidad de la BHR está aumentada. A: Se observa el patrón radial de las ramas de la arteria y vena oftálmicas, como los plexos vasculares internos de la retina. A esta magnificación, se observa el filtrado de colorante a nivel del nervio óptico, que refleja el edema papilar. B: Se muestra el manguito fluorescente perivascular que refleja la extravasación celular y de fluidos (punta de flecha). Calibración, A, 100  $\mu\text{m}$ ; B, 50  $\mu\text{m}$ .

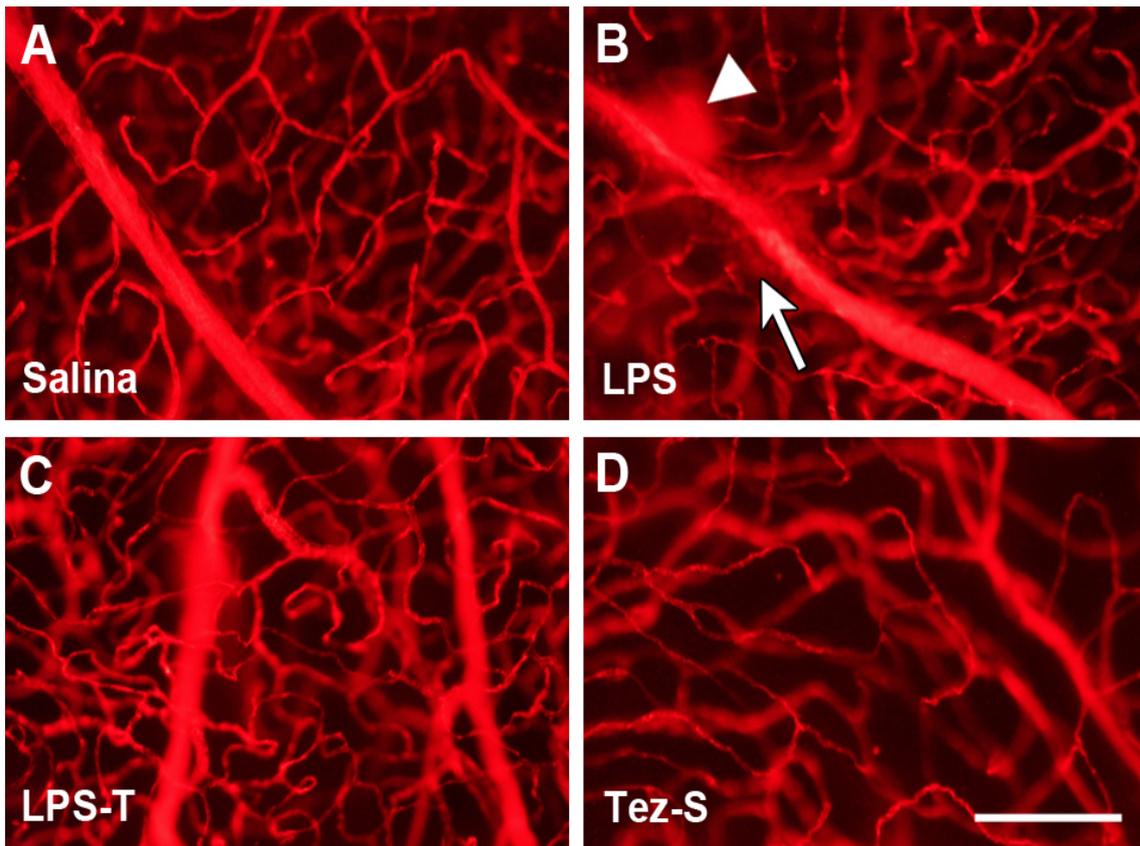


Figura 6.2. Retinas enteras examinadas después de la inyección intravenosa de Azul de Evans. A: En una retina normal se observan las características de la pared de una rama oftálmica y de los capilares asociados. La pared del vaso tiene bordes regulares y los capilares presentan diámetro pequeño. B: Después de la administración de LPS, la pared del vaso oftálmico es irregular, y en tramos aparece rodeado por manguitos difusos que reflejan la extravasación de líquidos (punta de flecha) y células (flecha). C: El tratamiento con tezosentan (LPS-T) previene parcialmente los efectos de LPS sobre los vasos. D: En animales Tez-S no se detectan áreas de extravasación y los capilares aparecen de calibre semejante al observado en los animales no endotoxémicos. Calibración para todas las figuras, 50  $\mu\text{m}$ .

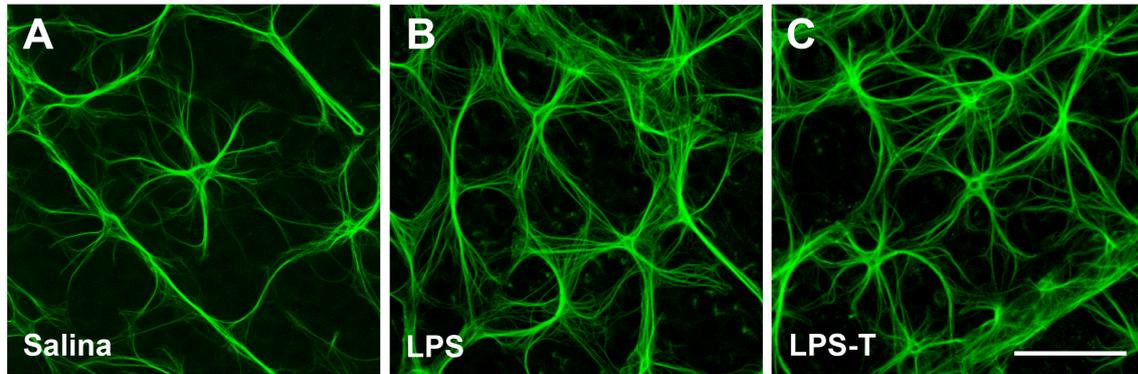


Figura 6.3. Inmunofluorescencia contra GFAP en retinas enteras. A: En los animales controles, no endotoxémicos, GFAP aparece en el soma y prolongaciones celulares de los astrocitos. B: En los animales endotoxémicos, las prolongaciones astrocitarias parecen más numerosas y de mayor longitud. Asimismo presentan mayor inmunofluorescencia GFAP+. C: En los animales con endotoxemia tratados con tezosentan, los astrocitos presentan el mismo patrón de inmunofluorescencia GFAP que los animales no tratados. Calibración para todas las figuras, 25  $\mu$ m.

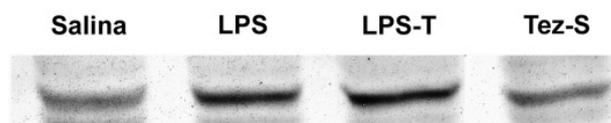


Figura 6.4. Los estudios de Western blot para GFAP en homogenatos de retina muestran la banda de 50 kDa correspondiente a esta proteína. En la primera calle (salina) se observa la expresión basal de GFAP. Los niveles aumentan substancialmente en los homogenatos de animales endotoxémicos (LPS), incluso en aquellos tratados con tezosentan (LPS-T). El tratamiento con tezosentan de animales no endotoxémicos (Tez-S) también aumenta la expresión de GFAP, aunque la diferencia es menor que en los animales endotoxémicos.

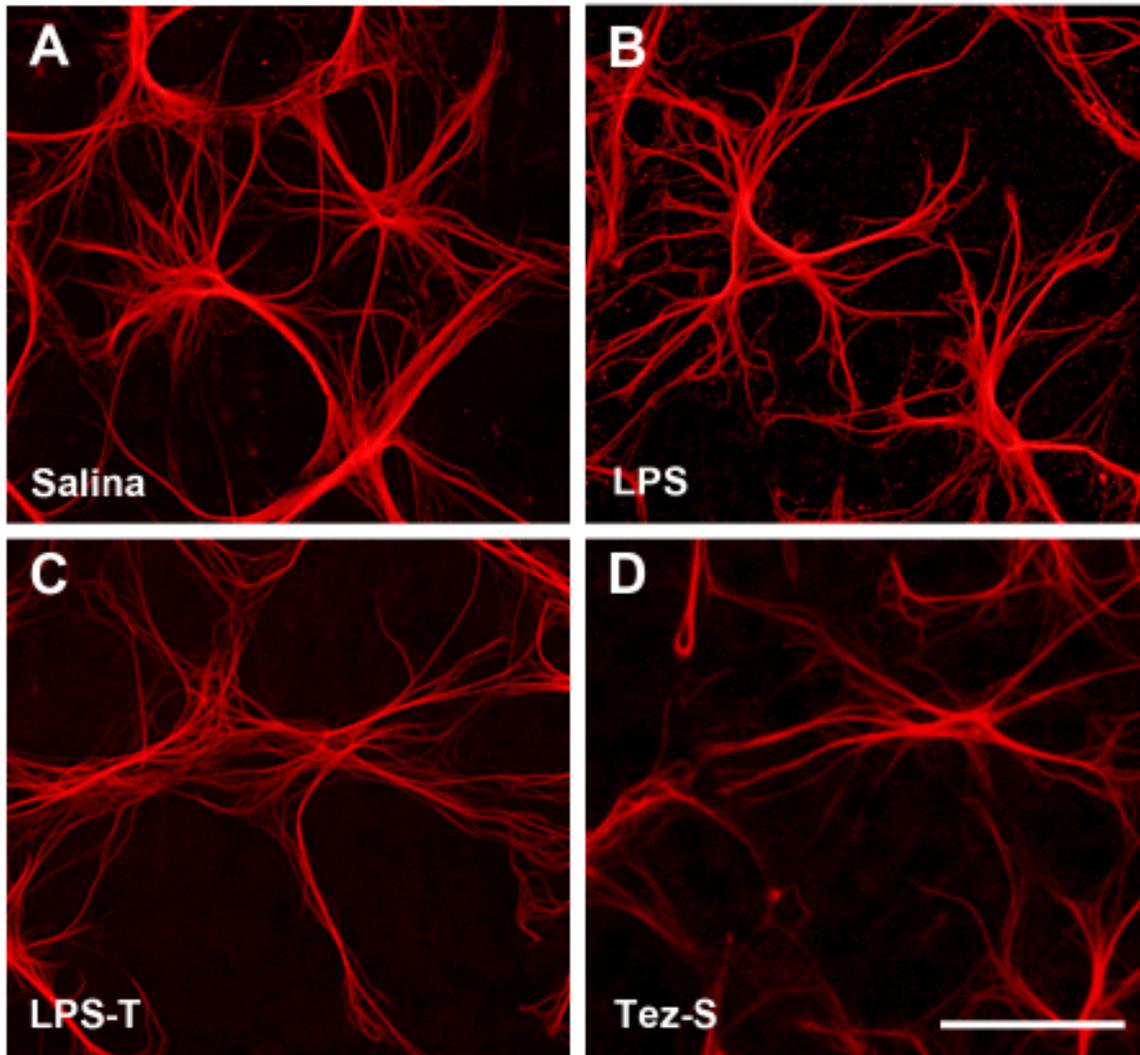


Figura 6.5. Inmunofluorescencia de ET-1 en retinas enteras. A: La marca basal de ET-1 está presente en los astrocitos, tanto en el soma como en los procesos celulares. B: Los animales con el tratamiento de endotoxemia tienen una inmunofluorescencia similar al control. C: Tezosentan reduce la inmunomarcación de ET-1 en los astrocitos de los grupos experimentales tratados con endotoxemia o salina (D). Calibración para todas las figuras, 20  $\mu\text{m}$ .

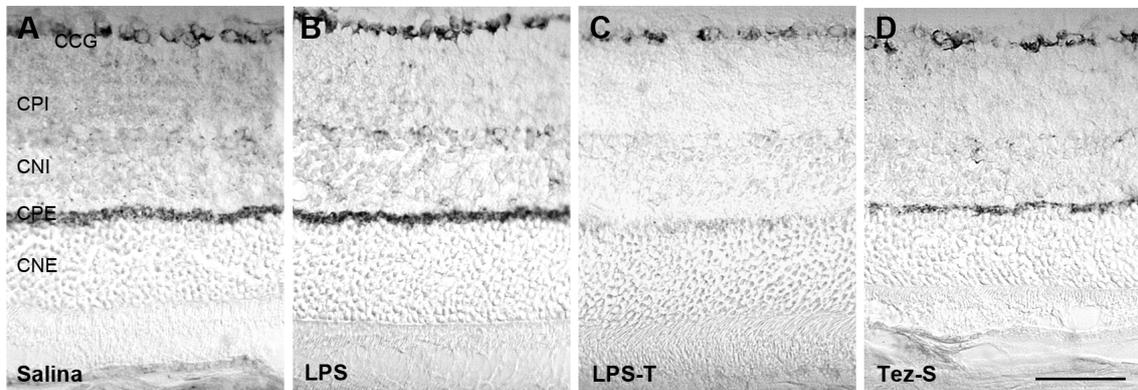


Figura 6.6. Detección inmunoenzimática de ETR-A en criosecciones de retinas. A: En los animales controles (salina) encontramos ETR-A expresado en la plexiforme externa (CPE) y en células de la capa de células ganglionares (CCG). B: En los animales con UIE se observa un aumento de los niveles de inmunoreactividad en las mismas estructuras. Además, se hace evidente la inmunoreactividad de algunas células que ocupan el borde interno de la CNI. C: La inmunoreactividad ETR-A en los animales endotoxémicos tratados con tezosentan es mucho menor que la observada en condiciones basales. D: Tezosentan, aún en ausencia de endotoxemia (Tez-S), reduce los niveles de ETR-A. Calibración para todas las figuras, 50  $\mu\text{m}$ .

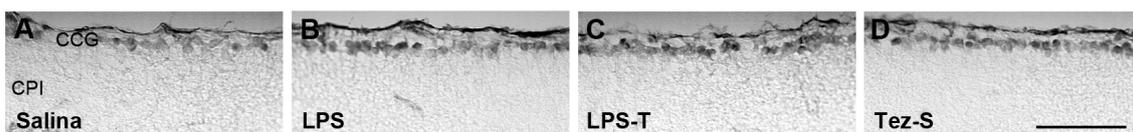


Figura 6.7. Detección inmunoenzimática de ETR-B en criosecciones de retina. Solo se muestra la porción interna de la misma. A: En los animales controles se observa inmunorreactividad ETR-B, de poca intensidad, en los astrocitos. B: Los ratones tratados con endotoxina presentan un aumento de la marca astrocitaria. C: En los ratones con UIE tratados con tezosentan se reduce la inmunorreactividad ETR-B. D: Tezosentan en ausencia de endotoxemia (Tez-S) no muestra diferencias con el grupo control. Calibración para todas las figuras, 50  $\mu\text{m}$ .

Las retinas controles no presentaron inmunorreactividad p-c-Jun (Figura 6.9, A), pero la UIE indujo su aparición en la CCG y en la pared de las ramas de los vasos oftálmicos (Figura 6.9, B). Los animales sanos expresaban inmunorreactividad NF- $\kappa$ B (p65), pero ésta era exclusivamente citoplasmática y estaba restringida a las células de la CCG y a prolongaciones radiales que presumiblemente corresponden a células de Müller (Figura 6.10, A). La UEI determinó importantes modificaciones, que incluyeron: su aparición en la capa de fibras del NO, predominio de localización nuclear en las células de la CCG, presencia en núcleos grandes y alargados de la CNI y en la CPE (Figura 6.10, B).

### **6.2.2 Efectos del tezosentan**

El tratamiento con tezosentan previno casi totalmente la ruptura de la barrera, dado que solo se observaron pequeños focos de extravasación (Figura 6.2). Sin embargo, no modificó la inmunorreactividad GFAP en la capa de astrocitos. Curiosamente, los animales no expuestos a LPS pero tratados con tezosentan (Tez-S) mostraron un leve aumento de la expresión de GFAP con respecto a los controles del grupo Salina (Figura 6.3). Estos resultados fueron confirmados por Western blot (Figura 6.4).

Tezosentan, sin embargo, redujo la inmunofluorescencia ET-1 en los astrocitos. Al igual que para el caso de GFAP, los astrocitos respondieron a tezosentan aún en ausencia de UIE, aunque ahora con un descenso de la inmunofluorescencia ET-1 (Figura 6.5).

Además, la UIE redujo la inmunorreactividad ETR-A en todas las capas de la retina. Notablemente, los animales UIE tratados con el bloqueante anti-endotelinérgico expresaban menor inmunorreactividad ETR-A que los animales controles (Figura 6.6). Este descenso, aunque de menor magnitud, también se observó en animales que recibieron tezosentan sin exposición a LPS. El tratamiento con tezosentan también disminuyó el aumento de ETR-B astrocitario provocado por la UIE (Figura 6.7).

También las quinasas y factores de transcripción incrementados por la UIE fueron afectados por el tratamiento con tezosentan. La p-JNK, que había aparecido en la CPE después de LPS, ya no fue detectada en esa capa plexiforme cuando los animales UIE

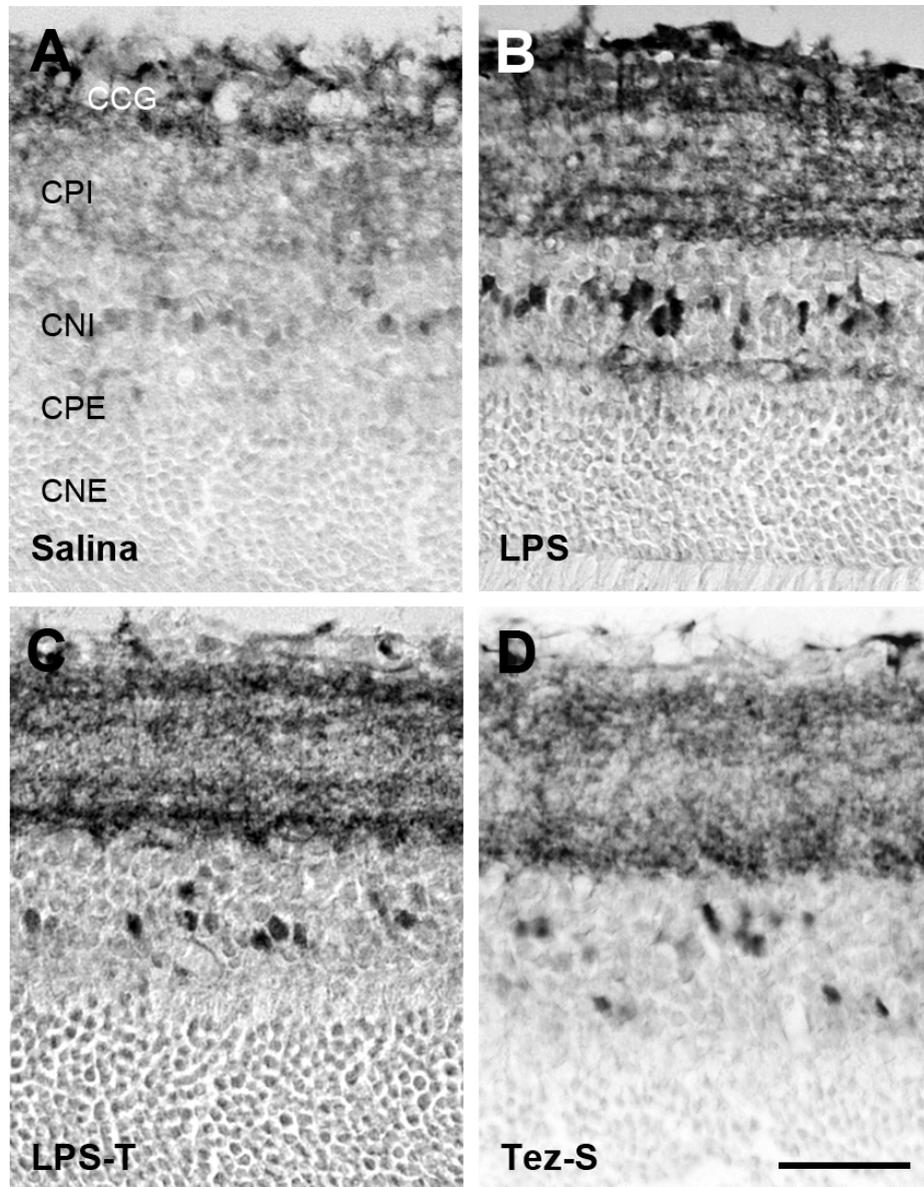


Figura 6.8. Detección inmunoenzimática de p-JNK en cortes de retina. A: En condiciones basales, las retinas muestran inmunoreactividad p-JNK en la CPI y algunas células de la CNI, aunque la marca más intensa está en los cuerpos celulares de la CCG. B: Después del tratamiento con LPS, la inmunorreactividad p-JNK incrementa marcadamente en la retina interna y aparece en la CPE. C: El aumento de p-JNK parece menor en los animales con UIE tratados con tezosentan. La reducción es muy manifiesta en la CPE. D: La inmunorreactividad p-JNK en los animales tratados con tezosentan (Tez-S) sufre un leve aumento en la CPI con respecto a los controles salinos. Calibración para todas las figuras, 50  $\mu$ m.

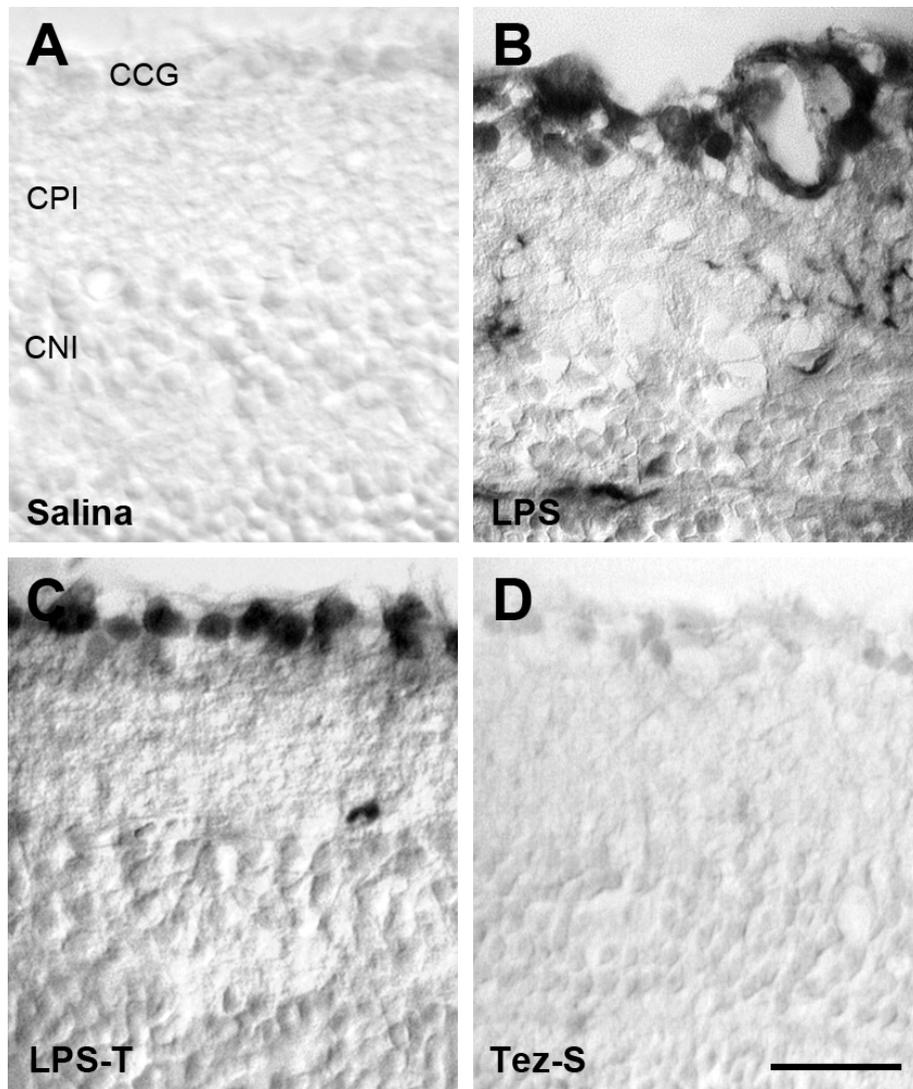


Figura 6.9. Detección inmunoenzimática de p-c-Jun. A: En condiciones basales, las retinas no presentan inmunorreactividad p-c-Jun. B: En los animales con uveítis provocada por LPS, aparece inmunorreactividad en la región interna de la retina, en los núcleos celulares de la CCG. También se la encuentra en células estrelladas de la CPI y en la pared de los vasos sanguíneos. C: Los animales con UIE tratados con tezosentan (LPS-T), muestran únicamente marca en los núcleos celulares de la CCG. D: El tratamiento con tezosentan en ausencia de UIE no modifica la inmunorreactividad p-c-Jun, que al igual que en los controles, es totalmente negativa. Calibración para todas las figuras, 50  $\mu$ m.

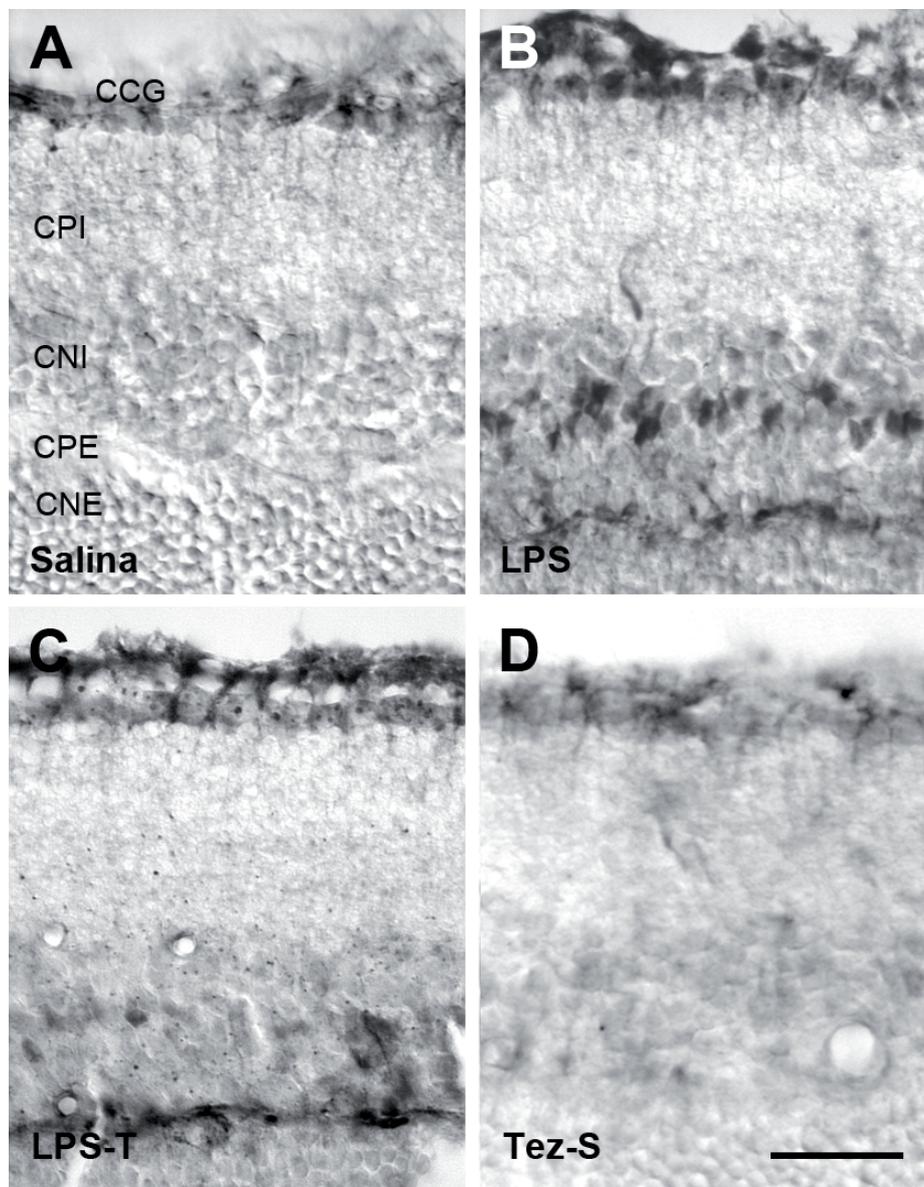


Figura 6.10. Inmunodetección de NF- $\kappa$ B con un antisuero contra la proteína p65. A: En las retinas controles solamente se observa inmunorreactividad citoplasmática en las células de la CCG. B: El tratamiento con LPS incrementa la inmunorreactividad p65, que ahora aparece en los núcleos celulares de la CCG y también en los de la CNI. Además, se observa inmunorreactividad p65 en estructuras de la CPE. También se detecta inmunotinción en las fibras del nervio óptico, en astrocitos y en las prolongaciones vítreas de las células de Müller. C: El tratamiento con tezosentan reduce la inmunorreactividad p-65, que se mantiene sin embargo en la capa de fibras del NO, la CCG y la CPE. D: El tratamiento únicamente con tezosentan no modifica la expresión basal de p65. Calibración para todas las figuras, 50  $\mu$ m.

fueron tratados con tezosentan (Figura 6.8). Tezosentan no modificó la actividad de p-JNK en los animales sanos.

El bloqueo endotelinérgico también modificó la activación de p-c-Jun inducida por LPS. Su principal efecto fue eliminar la presencia de este factor de transcripción activado en las células de la pared vascular (Figura 6.9). Tezosentan también redujo los cambios de NF- $\kappa$ B (p65) inducidos por LPS (Figura 6.10).

## 6.3 Discusión

La respuesta endotelinérgica a la UIE involucró tanto a la glia como a las estructuras neuronales. El tratamiento con un bloqueante de los receptores endotelinérgicos permitió minimizar la pérdida de la BHR característica de esta lesión neuroinflamatoria.

La conservación de la BHR fue acompañada por cambios en los niveles de ET-1, ETR-A y ETR-B. También redujo la activación de las quinasas y factores de transcripción relacionados con las vías de estrés.

El endotelio vascular cerebral constituye el primer blanco del LPS (Rummel et al., 2005). Al ser inyectado por vía sistémica, LPS se une a un receptor endotelial y penetra en estas células desde donde inicia una reacción masiva que incluye la permeabilización de la barrera hemato-cerebral y el desarrollo de una respuesta inflamatoria del tejido nervioso (Singh and Jiang, 2004). La acción de la glia parece ser dual. Por una parte, la ET-1 proveniente de los astrocitos reduce la expresión endotelial de P-glicoproteína, un fenómeno que contribuye a aumentar la permeabilidad de la BHR (Hartz et al., 2004). Por la otra, algunas evidencias sugieren que la glia podría proteger la función de la BHR afectada por LPS (Descamps et al., 2003; Gaillard et al., 2003). Aunque es necesaria mayor información para conocer los mecanismos subyacentes, nuestros datos confirman que la ruptura de la barrera depende, por lo menos parcialmente, de la activación de receptores ETR-B.

Es interesante resaltar que tezosentan no disminuyó la expresión de GFAP en este modelo, aunque dicha reducción es uno de los efectos más característicos del bloqueo endotelinérgico en otras formas de injuria retinal (Torbidoni et al., 2006) (ver Capítulo 5), lesiones del nervio óptico (Rogers et al., 2003a) y de otros sitios del SNC (Gadea et al., 2008). La diferencia entre estos modelos y la UIE probablemente corresponden a que esta última es un fenómeno agudo, que evoluciona espontáneamente en 24 hs, mientras que los casos mencionados son crónicos y requieren la administración de bloqueantes endotelinérgicos durante varias semanas.

Dado que la endotoxina acelera la muerte de las neuronas ganglionares in vitro (Arai et al., 2003), podemos especular que la hiperexpresión de ETR-A en la CCG podría estar

relacionada con mecanismos apoptóticos. En los cardiomiocitos, la activación de receptores ETR-A previene la muerte inducida por estrés oxidativo (Kakita et al., 2001), por agonistas beta-adrenérgicos (Araki et al., 2000), y por privación de suero (Ogata et al., 2003). El aumento de ETR-A en la CCG probablemente estaría relacionado con el aumento de p-c-Jun y NF- $\kappa$ B observado en los núcleos celulares de esta capa.

La activación de la quinasa JNK es crítica para la muerte celular programada fisiológica o patológica, pero su acción también podría prevenir la muerte celular (Borsello and Forloni, 2007). Se ha postulado que la elección de uno u otro camino dependería de distintas isoformas de JNK, pero no existe evidencia experimental que apoye esta hipótesis. Sin embargo, el camino apoptótico requiere actividad JNK nuclear (Bjorkblom et al., 2008). Por lo tanto, se puede asumir que el aumento de p-JNK inducido en los núcleos de la CNI estaría relacionado con la lesión inflamatoria, y que tezosentan podría frenar la producción de esas lesiones.

Tezosentan también redujo la inmunorreactividad de p-c-Jun inducida por la UIE. La fosforilación de c-Jun es imprescindible para numerosas respuestas inflamatorias, incluyendo el aumento de la permeabilidad vascular (Fahmy et al., 2006). Por lo tanto, su desaparición en la pared vascular por acción del bloqueante endotelinérgico sugiere un papel directo de los receptores endotelinérgicos en la ruptura de la BHR.

Se ha demostrado que la regulación eficiente de NF- $\kappa$ B tiene utilidad para el control de las inflamaciones locales o sistémicas, incluyendo la uveítis (Kitamei et al., 2006). En nuestro modelo de UEI se produjo rápidamente la translocación nuclear de este factor de transcripción en las células de la CCG y las células de Müller. Asimismo, se observó su aparición en astrocitos y en la CPE. Cambios semejantes se encuentran en un modelo de uveítis inmune (Kitamei et al., 2006). Tezosentan redujo los cambios inducidos por LPS, especialmente la translocación nuclear en las células de Müller.

Parece importante señalar, que tezosentan indujo cambios en ciertos parámetros retinales aún en animales sanos, no expuestos a LPS. La hiperexpresión de GFAP inducida por el bloqueo endotelinérgico, previamente descrita por nosotros (Torbidoni et al., 2006), fue confirmada por los experimentos descritos en este capítulo. La

hiperexpresión de GFAP es una señal de injuria neural pero no es necesariamente indicio de mayor daño. Por el contrario, en ciertos modelos se considera que la activación astrocitaria podría tener efecto neuroprotector (Gonzalez Deniselle et al., 2001). También se encuentra una activación semejante en el preconditionamiento isquémico (Casson et al., 2003). De este modo, el leve aumento de GFAP observado por acción del tezosentan constituye probablemente una forma de neuroprotección (Torbidoni et al., 2006).

Además, demostramos que, aún en los animales sanos, tezosentan reducía la inmunorreactividad ET-1 en los astrocitos y la inmunorreactividad ETR-A en todas sus localizaciones neuronales. En estos animales también modificó la actividad p-JNK en los estratos sinápticos de la retina. La presencia de p-JNK en la CPI, que indica una localización neuronal, podría estar asociada a la fosforilación de proteínas sinápticas, como PSD-95 (Kim et al., 2007). El aumento de la actividad p-JNK inducido por tezosentan en los estratos más externos de la CPI, sugiere que la actividad endotelinérgica podría regular la neurotransmisión en alguna etapa de la vía visual.

En resumen, la UIE murina involucra una respuesta del sistema endotelinérgico que facilitaría la pérdida de barrera hemato-retinal, y que puede ser reducida por el bloqueo de los receptores endotelinérgicos. Este resultado probablemente depende de la activación de diversos mecanismos intrarretinianos, que incluyen la activación de la glia y de las vías intracelulares de estrés.

## 7. Conclusiones generales

El sentido de la vista tal como lo conocemos depende de las funciones transductoras y transmisoras de la retina, una red neuronal fotosensible que hasta ahora no ha podido ser reproducida artificialmente. En gran medida, porque la función visual exige que el sistema neural de recepción ocupe una posición espacial definida, con gran exposición al medio ambiente de donde proviene la luz y sin embargo, protegida de los componentes eventualmente nocivos del mismo. Por otra parte, la retina, al igual que otras regiones del sistema nervioso central, requiere un medio interno propio, distinto del medio sistémico. Mi trabajo de tesis estuvo dedicado al análisis de esta particular posición de la retina con respecto a otros tejidos del organismo y con respecto al medio ambiente, que definen interfases concretas conocidas como “barreras”. Como expliqué en la Introducción, estas barreras han sido objeto de numerosos estudios. Todavía seguimos describiéndolas con términos provenientes de la Mecánica, pero es cada vez más evidente que tienen un comportamiento complejo, donde la mayor parte de sus elementos responden de manera condicional, según el contexto molecular de cada momento y lugar.

Es por este motivo que me interesó analizar una pequeña muestra de las moléculas que más contribuyen a regular las funciones celulares, los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), en el escenario de las distintas interfases que permiten a la retina mantener su posición de privilegio sin perder contacto con el medio externo e interno. En cada una de ellas elegí uno de los muchos receptores presentes e intenté replantear su funcionalidad en condiciones fisiológicas y patológicas. Vale la pena mencionar aquí que muchas enfermedades oftalmológicas tienen primaria- o secundariamente, una alteración de una o más barreras.

La interfase con el medio ambiente, imprescindible porque es el portador de la luz, ocurre a nivel de la superficie anterior del ojo. Aquí pude estudiar los receptores canabinoides, CB1 y CB2, que no habían sido descritos previamente en esta localización. En muestras de epitelio conjuntival, demostré la capacidad de CB1 y CB2

para reducir los niveles intracelulares de AMPc. Más importante aún, logré constatar sus interacciones con las vías intracelulares de estrés. En otros términos, las evidencias obtenidas muestran que la activación de estos receptores puede reducir los fenómenos gatillados por una citoquina inflamatoria. Este hallazgo implica que el sistema canabinoide es de gran importancia para comprender la patogenia y descubrir nuevos tratamientos para el alivio de las frecuentes enfermedades inflamatorias de la superficie anterior del ojo. Otro hallazgo importante es el efecto promotor del crecimiento epitelial de estos receptores. Interesa decir aquí, que en el laboratorio prosiguen estudios de CB1 y CB2 en el epitelio corneal, donde la facilitación de la proliferación celular podría ser aplicada a las condiciones clínicas que requieren la regeneración de ese epitelio.

Las interfases con el medio interno dependen del intercambio entre la circulación sanguínea y la retina. La barrera hemato-retinal externa está dada por el cierre del espacio extracelular del epitelio pigmentario retinal (EPR). La adhesión entre los fotorreceptores y el EPR es de gran importancia clínica, ya que su pérdida da lugar al desprendimiento de retina (DR). Habitualmente, la retina desprendida se reaplica por medios quirúrgicos, pero la recuperación funcional rara vez es completa y en ocasiones ocurre la proliferación vitreoretinal (PVR). El estudio de estas lesiones en modelos experimentales desarrollados en nuestro laboratorio, me llevó al análisis de ligandos de GPCRs. Así, pude demostrar que la melatonina modifica profundamente la adhesividad entre la retina y el EPR, y que además podría ejercer un efecto protector sobre el EPR desprendido. La dopamina, otro integrante de la cadena de señalización, reprodujo parcialmente los efectos de melatonina.

En la PVR, donde el daño de las barreras es mayor, estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la glia de Müller participa en la formación de las membranas características de esta lesión. Por otra parte, también habíamos demostrado la presencia de endotelina y sus receptores en los astrocitos, que son un componente importante de la barrera hemato-retinal interna. Descubrí que la inducción de lesiones tipo PVR en un modelo experimental en ratón se asocia a aumento de la expresión de endotelina y sus receptores en la retina y en las membranas que se forman después de la lesión de la membrana limitante interna de la retina. También observe la presencia de estas

moléculas en membranas humanas que habían sido removidas quirúrgicamente. A nivel experimental, pude demostrar que el tratamiento de los animales con PVR inducida con un bloqueante de los receptores endotelinérgicos eliminó la formación de las membranas epirretinales. Por lo tanto, cabe imaginar que estos bloqueantes, o drogas derivadas de los mismos, puedan ser de utilidad en el tratamiento de esta enfermedad.

Las uveítis, independientemente de su etiología, dependen también de una alteración de la barrera hematorretinal. El modelo de uveítis inducida por endotoxina (UIE) me permitió demostrar que el aumento de permeabilidad de la barrera, la reacción astrocitaria y la activación de las vías intracelulares de estrés pueden ser reguladas por los receptores endotelinérgicos.

Mucho se puede y debe hacer todavía en este terreno, tanto por su interés biológico como clínico.

## 8. Bibliografía

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7(1):41-53.
- Aboud ME, Martin BR. 1992. Neurobiology of marijuana abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13(5):201-206.
- Adamson P, Wilbourn B, Etienne-Manneville S, Calder V, Beraud E, Milligan G, Couraud PO, Greenwood J. 2002. Lymphocyte trafficking through the blood-brain barrier is dependent on endothelial cell heterotrimeric G-protein signaling. *FASEB J* 16(10):1185-1194.
- Albertini M, Clement MG, Hussain SN. 2003. Role of endothelin ETA receptors in sepsis-induced mortality, vascular leakage, and tissue injury in rats. *Eur J Pharmacol* 474(1):129-135.
- An L, Wang RK. 2008. In vivo volumetric imaging of vascular perfusion within human retina and choroids with optical micro-angiography. *Opt Express* 16(15):11438-11452.
- Anderson DH, Stern WH, Fisher SK, Erickson PA, Borgula GA. 1981. The onset of pigment epithelial proliferation after retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21(1 Pt 1):10-16.
- Andersson A, Fenhammar J, Frithiof R, Weitzberg E, Sollevi A, Hjelmqvist H. 2008. Mixed endothelin receptor antagonism with tezosentan improves intestinal microcirculation in endotoxemic shock. *J Surg Res* 149(1):138-147.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. 1990. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 348(6303):730-732.
- Arai K, Wood JP, Osborne NN. 2003. Beta-adrenergic receptor agonists and antagonists counteract LPS-induced neuronal death in retinal cultures by different mechanisms. *Brain Res* 985(2):176-186.
- Araki M, Hasegawa K, Iwai-Kanai E, Fujita M, Sawamura T, Kakita T, Wada H, Morimoto T, Sasayama S. 2000. Endothelin-1 as a protective factor against beta-adrenergic agonist-induced apoptosis in cardiac myocytes. *J Am Coll Cardiol* 36(4):1411-1418.
- Aristodemou P, Stanford M. 2006. Therapy insight: The recognition and treatment of retinal manifestations of systemic vasculitis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2(8):443-451.
- Asaria RH, Charteris DG. 2006. Proliferative vitreoretinopathy: developments in pathogenesis and treatment. *Compr Ophthalmol Update* 7(4):179-185.
- Ashton N, Cunha-Vaz JG. 1965. Effect of Histamine on the Permeability of the Ocular Vessels. *Arch Ophthalmol* 73:211-223.
- Bagnato A, Spinella F, Rosano L. 2005. Emerging role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 12(4):761-772.
- Baler R, Covington S, Klein DC. 1997. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase gene promoter. cAMP activation via a cAMP-responsive element-CCAAT complex. *J Biol Chem* 272(11):6979-6985.

- Barthel LK, Raymond PA. 1990. Improved method for obtaining 3-microns cryosections for immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 38(9):1383-1388.
- Barton M, Yanagisawa M. 2008. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol* 86(8):485-498.
- Basavarajappa BS. 2007. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Pept Lett* 14(3):237-246.
- Bauer B, Hartz AM, Miller DS. 2007. Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol* 71(3):667-675.
- Bauer HC, Bauer H. 2000. Neural induction of the blood-brain barrier: still an enigma. *Cell Mol Neurobiol* 20(1):13-28.
- Begley DJ, Brightman MW. 2003. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res* 61:39-78.
- Bellhorn RW. 1980. Permeability of blood-ocular barriers of neonatal and adult cat to sodium fluorescein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19(8):870-877.
- Berman ER. 1969. Mucopolysaccharides (glycosaminoglycans) of the retina: identification, distribution and possible biological role. *Bibl Ophthalmol* 79:5-31.
- Bertram R, Tabak J, Toporikova N, Freeman ME. 2006. Endothelin action on pituitary lactotrophs: one receptor, many GTP-binding proteins. *Sci STKE* 2006(321):er2.
- Besharse JC, Dunis DA. 1983. Methoxyindoles and photoreceptor metabolism: activation of rod shedding. *Science* 219(4590):1341-1343.
- Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL. 1998. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* 18(5):1633-1641.
- Bjorkblom B, Vainio JC, Hongisto V, Herdegen T, Courtney MJ, Coffey ET. 2008. All JNKs can kill, but nuclear localization is critical for neuronal death. *J Biol Chem* 283(28):19704-19713.
- Blomstrand F, Venance L, Siren AL, Ezan P, Hanse E, Glowinski J, Ehrenreich H, Giaume C. 2004. Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 19(4):1005-1015.
- Boros M, Massberg S, Baranyi L, Okada H, Messmer K. 1998. Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. *Gastroenterology* 114(1):103-114.
- Borsello T, Forloni G. 2007. JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration. *Curr Pharm Des* 13(18):1875-1886.
- Bremnes T, Paasche JD, Mehlum A, Sandberg C, Bremnes B, Attramadal H. 2000. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *J Biol Chem* 275(23):17596-17604.
- Brightman MW, Reese TS. 1969. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40(3):648-677.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. 2006. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25(4):397-424.

- Brunner F, Bras-Silva C, Cerdeira AS, Leite-Moreira AF. 2006. Cardiovascular endothelins: essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 111(2):508-531.
- Buchweitz JP, Karmaus PW, Harkema JR, Williams KJ, Kaminski NE. 2007. Modulation of airway responses to influenza A/PR/8/34 by Delta9-tetrahydrocannabinol in C57BL/6 mice. *J Pharmacol Exp Ther* 323(2):675-683.
- Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D. 1997. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci* 17(4):1226-1242.
- Cahill GM, Besharse JC. 1992. Light-sensitive melatonin synthesis by *Xenopus* photoreceptors after destruction of the inner retina. *Vis Neurosci* 8(5):487-490.
- Cahill GM, Grace MS, Besharse JC. 1991. Rhythmic regulation of retinal melatonin: metabolic pathways, neurochemical mechanisms, and the ocular circadian clock. *Cell Mol Neurobiol* 11(5):529-560.
- Campbell M, Collery R, McEvoy A, Gardiner TA, Stitt AW, Brankin B. 2006. Involvement of MAPKs in endostatin-mediated regulation of blood-retinal barrier function. *Curr Eye Res* 31(12):1033-1045.
- Canto Soler MV, Gallo JE, Dodds RA, Suburo AM. 2002. A mouse model of proliferative vitreoretinopathy induced by dispase. *Exp Eye Res* 75(5):491-504.
- Cardillo JA, Stout JT, LaBree L, Azen SP, Omphroy L, Cui JZ, Kimura H, Hinton DR, Ryan SJ. 1997. Post-traumatic proliferative vitreoretinopathy. The epidemiologic profile, onset, risk factors, and visual outcome. *Ophthalmology* 104(7):1166-1173.
- Carrier EJ, Kearns CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ. 2004. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylethanolamide, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 65(4):999-1007.
- Caspi RR. 2006. Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol Rev* 213:23-35.
- Casson RJ, Wood JP, Melena J, Chidlow G, Osborne NN. 2003. The effect of ischemic preconditioning on light-induced photoreceptor injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(3):1348-1354.
- Clouthier DE, Williams SC, Yanagisawa H, Wieduwilt M, Richardson JA, Yanagisawa M. 2000. Signaling pathways crucial for craniofacial development revealed by endothelin-A receptor-deficient mice. *Dev Biol* 217(1):10-24.
- Clozel M, Ramuz H, Clozel JP, Breu V, Hess P, Loffler BM, Coassolo P, Roux S. 1999. Pharmacology of tezosentan, new endothelin receptor antagonist designed for parenteral use. *J Pharmacol Exp Ther* 290(2):840-846.
- Clozel M, Salloukh H. 2005. Role of endothelin in fibrosis and anti-fibrotic potential of bosentan. *Ann Med* 37(1):2-12.
- Cousins SW, Guss RB, Howes EL, Jr., Rosenbaum JT. 1984. Endotoxin-induced uveitis in the rat: observations on altered vascular permeability, clinical findings, and histology. *Exp Eye Res* 39(5):665-676.
- Cunha-Vaz JG. 1978. The blood-ocular barriers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17(11):1037-1039.
- Cunha-Vaz JG. 2004. The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res* 78(3):715-721.

- Chakrabarti A, Onaivi ES, Chaudhuri G. 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein. *DNA Seq* 5(6):385-388.
- Chan CK, Lin SG, Nuthi AS, Salib DM. 2008. Pneumatic retinopexy for the repair of retinal detachments: a comprehensive review (1986-2007). *Surv Ophthalmol* 53(5):443-478.
- Charteris DG, Sethi CS, Lewis GP, Fisher SK. 2002. Proliferative vitreoretinopathy-developments in adjunctive treatment and retinal pathology. *Eye* 16(4):369-374.
- Chaurasia SS, Haque R, Pozdeyev N, Jackson CR, Iuvone PM. 2006. Temporal coupling of cyclic AMP and Ca/calmodulin-stimulated adenylyl cyclase to the circadian clock in chick retinal photoreceptor cells. *J Neurochem* 99(4):1142-1150.
- Chen J, Matias I, Dinh T, Lu T, Venezia S, Nieves A, Woodward DF, Di Marzo V. 2005. Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun* 330(4):1062-1067.
- Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, Karin M. 2003a. The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med* 9(5):575-581.
- Chen W, Ishikawa M, Yamaki K, Sakuragi S. 2003b. Wistar rat palpebral conjunctiva contains more slow-cycling stem cells that have larger proliferative capacity: implication for conjunctival epithelial homeostasis. *Jpn J Ophthalmol* 47(2):119-128.
- Chi X, Anselmi K, Watkins S, Gandhi CR. 2003. Prevention of cultured rat stellate cell transformation and endothelin-B receptor upregulation by retinoic acid. *Br J Pharmacol* 139(4):765-774.
- Choi YK, Kim KW. 2008. AKAP12 in astrocytes induces barrier functions in human endothelial cells through protein kinase Czeta. *FEBS J* 275(9):2338-2353.
- D'Argenio G, Valenti M, Scaglione G, Cosenza V, Sorrentini I, Di Marzo V. 2006. Up-regulation of anandamide levels as an endogenous mechanism and a pharmacological strategy to limit colon inflammation. *FASEB J* 20(3):568-570.
- Davenport AP, Maguire JJ. 2006. Endothelin. *Handb Exp Pharmacol*(176 Pt 1):295-329.
- De Filippis D, Russo A, De Stefano D, Maiuri MC, Esposito G, Cinelli MP, Pietropaolo C, Carnuccio R, Russo G, Iuvone T. 2007. Local administration of WIN 55,212-2 reduces chronic granuloma-associated angiogenesis in rat by inhibiting NF-kappaB activation. *J Mol Med* 85(6):635-645.
- de Juan E, Jr., Loewenstein A, Bressler NM, Alexander J. 1998. Translocation of the retina for management of subfoveal choroidal neovascularization II: a preliminary report in humans. *Am J Ophthalmol* 125(5):635-646.
- Demuth DG, Molleman A. 2006. Cannabinoid signalling. *Life Sci* 78(6):549-563.
- Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, Girault JA. 2001. Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. *J Neurochem* 77(3):957-960.
- Derkinderen P, Valjent E, Toutant M, Corvol JC, Enslin H, Ledent C, Trzaskos J, Caboche J, Girault JA. 2003. Regulation of extracellular signal-regulated kinase by cannabinoids in hippocampus. *J Neurosci* 23(6):2371-2382.

- Derocq JM, Segui M, Marchand J, Le Fur G, Casellas P. 1995. Cannabinoids enhance human B-cell growth at low nanomolar concentrations. *FEBS Lett* 369(2-3):177-182.
- Descamps L, Coisne C, Dehouck B, Cecchelli R, Torpier G. 2003. Protective effect of glial cells against lipopolysaccharide-mediated blood-brain barrier injury. *Glia* 42(1):46-58.
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34(5):605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258(5090):1946-1949.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372(6507):686-691.
- Di Marzo V, Izzo AA. 2006. Endocannabinoid overactivity and intestinal inflammation. *Gut* 55(10):1373-1376.
- Didier N, Banks WA, Creminon C, Dereuddre-Bosquet N, Mabondzo A. 2002. HIV-1-induced production of endothelin-1 in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Neuroreport* 13(9):1179-1183.
- Didier N, Romero IA, Creminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A. 2003. Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem* 86(1):246-254.
- Diebold Y, Calonge M, Enriquez de Salamanca A, Callejo S, Corrales RM, Saez V, Siemasko KF, Stern ME. 2003. Characterization of a spontaneously immortalized cell line (IOBA-NHC) from normal human conjunctiva. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(10):4263-4274.
- Diederer RM, La Heij EC, Kessels AG, Goezinne F, Liem AT, Hendrikse F. 2007. Scleral buckling surgery after macula-off retinal detachment: worse visual outcome after more than 6 days. *Ophthalmology* 114(4):705-709.
- Doi M, Yujnovsky I, Hirayama J, Malerba M, Tirota E, Sassone-Corsi P, Borrelli E. 2006. Impaired light masking in dopamine D2 receptor-null mice. *Nat Neurosci* 9(6):732-734.
- Doyle SE, Grace MS, McIvor W, Menaker M. 2002. Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: the role of melatonin. *Vis Neurosci* 19(5):593-601.
- Dubocovich ML. 1983. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature* 306(5945):782-784.
- Dupuis J, Goresky CA, Fournier A. 1996. Pulmonary clearance of circulating endothelin-1 in dogs in vivo: exclusive role of ETB receptors. *J Appl Physiol* 81(4):1510-1515.
- Egnaczyk GF, Pomonis JD, Schmidt JA, Rogers SD, Peters C, Ghilardi JR, Mantyh PW, Maggio JE. 2003. Proteomic analysis of the reactive phenotype of astrocytes following endothelin-1 exposure. *Proteomics* 3(5):689-698.
- Ehrenreich H, Anderson RW, Ogino Y, Rieckmann P, Costa T, Wood GP, Coligan JE, Kehrl JH, Fauci AS. 1991. Selective autoregulation of endothelins in primary

- astrocyte cultures: endothelin receptor-mediated potentiation of endothelin-1 secretion. *New Biol* 3(2):135-141.
- Ehrenreich H, Nau TR, Dembowski C, Hasselblatt M, Barth M, Hahn A, Schilling L, Siren AL, Bruck W. 2000. Endothelin b receptor deficiency is associated with an increased rate of neuronal apoptosis in the dentate gyrus. *Neuroscience* 95(4):993-1001.
- El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y, Tsai NT, Caldwell RB, Liou GI. 2006. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am J Pathol* 168(1):235-244.
- Endo EG, Yao XY, Marmor MF. 1988. Pigment adherence as a measure of retinal adhesion: dependence on temperature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29(9):1390-1396.
- Engelhardt B. 2006. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 113(4):477-485.
- Er H, Turkoz Y, Mizrak B, Parlakpınar H. 2006. Inhibition of experimental proliferative vitreoretinopathy with protein kinase C inhibitor (chelerythrine chloride) and melatonin. *Ophthalmologica* 220(1):17-22.
- Erickson KK, Sundstrom JM, Antonetti DA. 2007. Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions. *Angiogenesis* 10(2):103-117.
- Fahmy RG, Waldman A, Zhang G, Mitchell A, Tedla N, Cai H, Geczy CR, Chesterman CN, Perry M, Khachigian LM. 2006. Suppression of vascular permeability and inflammation by targeting of the transcription factor c-Jun. *Nat Biotechnol* 24(7):856-863.
- Fang XY, Hayashi A, Cekic O, Morimoto T, Ohji M, Kusaka S, Kamei M, Fujikado T, Tano Y. 2001. Effect of Ca(2+)-free and Mg(2+)-free BSS Plus solution on the retinal pigment epithelium and retina in rabbits. *Am J Ophthalmol* 131(4):481-488.
- Farhat N, Matouk CC, Mamarbachi AM, Marsden PA, Allen BG, Thorin E. 2008. Activation of ETB receptors regulates the abundance of ET-1 mRNA in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 153(7):1420-1431.
- Farooqui AA, Taylor WA, Horrocks LA. 1986. Characterization and solubilization of membrane bound diacylglycerol lipases from bovine brain. *Int J Biochem* 18(11):991-997.
- Fatt I, Shantinath K. 1971. Flow conductivity of retina and its role in retinal adhesion. *Exp Eye Res* 12(2):218-226.
- Faubert BL, Kaminski NE. 2000. AP-1 activity is negatively regulated by cannabidiol through inhibition of its protein components, c-fos and c-jun. *J Leukoc Biol* 67(2):259-266.
- Faude F, Wendt S, Biedermann B, Gartner U, Kacza J, Seeger J, Reichenbach A, Wiedemann P. 2001. Facilitation of artificial retinal detachment for macular translocation surgery tested in rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(6):1328-1337.
- Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA. 1993. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(16):7656-7660.

- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. 1995. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 48(3):443-450.
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggin RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. 1996. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* 393(2-3):231-235.
- Filipeanu CM, de Zeeuw D, Nelemans SA. 1997. Delta9-tetrahydrocannabinol activates [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases partly sensitive to capacitative store refilling. *Eur J Pharmacol* 336(1):R1-3.
- Fisher SK, Erickson PA, Lewis GP, Anderson DH. 1991. Intraretinal proliferation induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(6):1739-1748.
- Fisher SK, Lewis GP. 2003. Muller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data. *Vision Res* 43(8):887-897.
- Fisher SK, Lewis GP, Linberg KA, Verardo MR. 2005. Cellular remodeling in mammalian retina: results from studies of experimental retinal detachment. *Prog Retin Eye Res* 24(3):395-431.
- Fowler CJ, Holt S, Nilsson O, Jonsson KO, Tiger G, Jacobsson SO. 2005. The endocannabinoid signaling system: pharmacological and therapeutic aspects. *Pharmacol Biochem Behav* 81(2):248-262.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63(6):1256-1272.
- Fride E, Mechoulam R. 1993. Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur J Pharmacol* 231(2):313-314.
- Fujieda H, Hamadanizadeh SA, Wankiewicz E, Pang SF, Brown GM. 1999. Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience* 93(2):793-799.
- Fujihara T, Murakami T, Fujita H, Nakamura M, Nakata K. 2001. Improvement of corneal barrier function by the P2Y(2) agonist INS365 in a rat dry eye model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(1):96-100.
- Fukuhara C, Liu C, Ivanova TN, Chan GC, Storm DR, Iuvone PM, Tosini G. 2004. Gating of the cAMP signaling cascade and melatonin synthesis by the circadian clock in mammalian retina. *J Neurosci* 24(8):1803-1811.
- Gadea A, Schinelli S, Gallo V. 2008. Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J Neurosci* 28(10):2394-2408.
- Gaillard PJ, de Boer AB, Breimer DD. 2003. Pharmacological investigations on lipopolysaccharide-induced permeability changes in the blood-brain barrier in vitro. *Microvasc Res* 65(1):24-31.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232(1):54-61.
- Gamulescu MA, Chen Y, He S, Spee C, Jin M, Ryan SJ, Hinton DR. 2006. Transforming growth factor beta2-induced myofibroblastic differentiation of

- human retinal pigment epithelial cells: regulation by extracellular matrix proteins and hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res* 83(1):212-222.
- Garbarino-Pico E, Carpentieri AR, Contin MA, Sarmiento MI, Brocco MA, Panzetta P, Rosenstein RE, Caputto BL, Guido ME. 2004. Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day. *J Biol Chem* 279(49):51172-51181.
- Gardner TW, Lieth E, Khin SA, Barber AJ, Bonsall DJ, Leshner T, Rice K, Brennan WA, Jr. 1997. Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(11):2423-2427.
- Gau M, Meier P, Wiedemann P. 1999. [Penetrating and perforating eye injuries with foreign bodies during motorized brush-cutting while wearing head protection gear]. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 215(5):311-314.
- Geller SF, Lewis GP, Fisher SK. 2001. FGFR1, signaling, and AP-1 expression after retinal detachment: reactive Muller and RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(6):1363-1369.
- Gerard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. 1991. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 279 (Pt 1):129-134.
- German OL, Buzzi E, Rotstein NP, Rodriguez-Boulan E, Politi LE. 2008. Retinal pigment epithelial cells promote spatial reorganization and differentiation of retina photoreceptors. *J Neurosci Res* 86(16):3503-3514.
- Ghazi NG, Green WR. 2002. Pathology and pathogenesis of retinal detachment. *Eye* 16(4):411-421.
- Gipson IK. 2004. Distribution of mucins at the ocular surface. *Exp Eye Res* 78(3):379-388.
- Gkoumassi E, Dekkers BG, Droge MJ, Elzinga CR, Schmidt M, Meurs H, Zaagsma J, Nelemans SA. 2007. Virodhamine and CP55,940 modulate cAMP production and IL-8 release in human bronchial epithelial cells. *Br J Pharmacol* 151(7):1041-1048.
- Go SL, Maugeri A, Mulder JJ, van Driel MA, Cremers FP, Hoyng CB. 2003. Autosomal dominant rhegmatogenous retinal detachment associated with an Arg453Ter mutation in the COL2A1 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(9):4035-4043.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. 2006. Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071(1):10-23.
- Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1778(3):729-756.
- Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, De Nicola AF. 2001. Cellular basis of steroid neuroprotection in the wobbler mouse, a genetic model of motoneuron disease. *Cell Mol Neurobiol* 21(3):237-254.
- Goraca A. 2002. New views on the role of endothelin (minireview). *Endocr Regul* 36(4):161-167.
- Greenwood J, Etienne-Manneville S, Adamson P, Couraud PO. 2002. Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol* 38(6):315-322.

- Greenwood J, Wang Y, Calder VL. 1995. Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *off. Immunology* 86(3):408-415.
- Guerin CJ, Lewis GP, Fisher SK, Anderson DH. 1993. Recovery of photoreceptor outer segment length and analysis of membrane assembly rates in regenerating primate photoreceptor outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(1):175-183.
- Guidry C. 1996. Isolation and characterization of porcine Muller cells. Myofibroblastic dedifferentiation in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(5):740-752.
- Guzman M. 2005. Effects on cell viability. *Handb Exp Pharmacol*(168):627-642.
- Habayeb OM, Bell SC, Konje JC. 2002. Endogenous cannabinoids: metabolism and their role in reproduction. *Life Sci* 70(17):1963-1977.
- Hackett S, Friedman Z, Campochiaro PA. 1986. Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate modulates retinal pigment epithelial cell migration in vitro. *Arch Ophthalmol* 104(11):1688-1692.
- Hageman GS, Marmor MF, Yao XY, Johnson LV. 1995. The interphotoreceptor matrix mediates primate retinal adhesion. *Arch Ophthalmol* 113(5):655-660.
- Hanus L, Abu-Lafi S, Fridel E, Breuer A, Vogel Z, Shalev DE, Kustanovich I, Mechoulam R. 2001. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7):3662-3665.
- Hardeland R. 2005. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine* 27(2):119-130.
- Harrison VJ, Barnes K, Turner AJ, Wood E, Corder R, Vane JR. 1995. Identification of endothelin 1 and big endothelin 1 in secretory vesicles isolated from bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14):6344-6348.
- Hart S, Fischer OM, Ullrich A. 2004. Cannabinoids induce cancer cell proliferation via tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17)-mediated transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 64(6):1943-1950.
- Hartz AM, Bauer B, Fricker G, Miller DS. 2004. Rapid Regulation of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier by Endothelin-1. *Mol Pharmacol*.
- Hatae N, Aksentijevich N, Zemkova HW, Kretschmannova K, Tomic M, Stojilkovic SS. 2007. Cloning and functional identification of novel endothelin receptor type A isoforms in pituitary. *Mol Endocrinol* 21(5):1192-1204.
- Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, Stangassinger M, Gerhards H, Ueffing M, Deeg CA. 2007. Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 6(6):2121-2131.
- Hausmann M, Rogler G. 2008. Immune-non immune networks in intestinal inflammation. *Curr Drug Targets* 9(5):388-394.
- He F, Song ZH. 2007. Molecular and cellular changes induced by the activation of CB2 cannabinoid receptors in trabecular meshwork cells. *Mol Vis* 13:1348-1356.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(5):1932-1936.
- Herring AC, Kaminski NE. 1999. Cannabinol-mediated inhibition of nuclear factor-kappaB, cAMP response element-binding protein, and interleukin-2 secretion by activated thymocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 291(3):1156-1163.

- Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. 1985. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *Am J Physiol* 248(5 Pt 1):C550-556.
- Hickey WF. 2001. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36(2):118-124.
- Hilkens J, Ligtenberg MJ, Vos HL, Litvinov SV. 1992. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biochem Sci* 17(9):359-363.
- Hoekzema R, Verhagen C, van Haren M, Kijlstra A. 1992. Endotoxin-induced uveitis in the rat. The significance of intraocular interleukin-6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(3):532-539.
- Hohmann AG, Herkenham M. 1998. Regulation of cannabinoid and mu opioid receptors in rat lumbar spinal cord following neonatal capsaicin treatment. *Neurosci Lett* 252(1):13-16.
- Hohmann AG, Suplita RL, 2nd. 2006. Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J* 8(4):E693-708.
- Hollyfield JG, Varner HH, Rayborn ME, Osterfeld AM. 1989. Retinal attachment to the pigment epithelium. Linkage through an extracellular sheath surrounding cone photoreceptors. *Retina* 9(1):59-68.
- Hori Y, Spurr-Michaud S, Russo CL, Argueso P, Gipson IK. 2004. Differential regulation of membrane-associated mucins in the human ocular surface epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(1):114-122.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54(2):161-202.
- Hu P, Pollard JD, Chan-Ling T. 2000. Breakdown of the blood-retinal barrier induced by activated T cells of nonneural specificity. *Am J Pathol* 156(4):1139-1149.
- Huang AJ, Tseng SC, Kenyon KR. 1990. Alteration of epithelial paracellular permeability during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31(3):429-435.
- Hurst RD, Fritz IB. 1996. Nitric oxide-induced perturbations in a cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Physiol* 167(1):89-94.
- Igarashi Y, Chiba H, Utsumi H, Miyajima H, Ishizaki T, Gotoh T, Kuwahara K, Tobioka H, Satoh M, Mori M, Sawada N. 2000. Expression of receptors for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and neurturin in the inner blood-retinal barrier of rats. *Cell Struct Funct* 25(4):237-241.
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, Goto K, Masaki T. 1989a. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8):2863-2867.
- Inoue A, Yanagisawa M, Takawa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. 1989b. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *J Biol Chem* 264(25):14954-14959.
- Ishac EJ, Jiang L, Lake KD, Varga K, Abood ME, Kunos G. 1996. Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol* 118(8):2023-2028.

- Ishizaki T, Chiba H, Kojima T, Fujibe M, Soma T, Miyajima H, Nagasawa K, Wada I, Sawada N. 2003. Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Exp Cell Res* 290(2):275-288.
- Iuvone PM, Chong NW, Bernard M, Brown AD, Thomas KB, Klein DC. 1999. Melatonin biosynthesis in chicken retina. Regulation of tryptophan hydroxylase and arylalkylamine N-acetyltransferase. *Adv Exp Med Biol* 460:31-41.
- Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS. 2005. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Prog Retin Eye Res* 24(4):433-456.
- Jaeschke H, Lemasters JJ. 2003. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 125(4):1246-1257.
- Janzer RC, Raff MC. 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325(6101):253-257.
- Jiang G, Ke Y, Sun D, Han G, Kaplan HJ, Shao H. 2008. Reactivation of uveitogenic T cells by retinal astrocytes derived from experimental autoimmune uveitis-prone B10RIII mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(1):282-289.
- Jockers R, Maurice P, Boutin JA, Delagrange P. 2008. Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *Br J Pharmacol* 154(6):1182-1195.
- Johnson LV, Hageman GS. 1991. Structural and compositional analyses of isolated cone matrix sheaths. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(7):1951-1957.
- Johnson LV, Hageman GS, Blanks JC. 1986. Interphotoreceptor matrix domains ensheath vertebrate cone photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27(2):129-135.
- Johnstrom P, Fryer TD, Richards HK, Harris NG, Barret O, Clark JC, Pickard JD, Davenport AP. 2005. Positron emission tomography using 18F-labelled endothelin-1 reveals prevention of binding to cardiac receptors owing to tissue-specific clearance by ET B receptors in vivo. *Br J Pharmacol* 144(1):115-122.
- Juan-Pico P, Fuentes E, Bermudez-Silva FJ, Javier Diaz-Molina F, Ripoll C, Rodriguez de Fonseca F, Nadal A. 2006. Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium* 39(2):155-162.
- Kakita T, Hasegawa K, Iwai-Kanai E, Adachi S, Morimoto T, Wada H, Kawamura T, Yanazume T, Sasayama S. 2001. Calcineurin pathway is required for endothelin-1-mediated protection against oxidant stress-induced apoptosis in cardiac myocytes. *Circ Res* 88(12):1239-1246.
- Kase S, Aoki K, Harada T, Harada C, Ohgami K, Shiratori K, Nishi S, Ohno S, Yoshida K. 2004. Activation of nuclear factor-kappa B in the conjunctiva with the epithelial scraping of the mouse cornea and human epidemic keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 88(7):947-949.
- Kasuya Y, Abe Y, Hama H, Sakurai T, Asada S, Masaki T, Goto K. 1994. Endothelin-1 activates mitogen-activated protein kinases through two independent signalling pathways in rat astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 204(3):1325-1333.
- Kaur C, Ling EA. 2008. Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. *Curr Med Chem* 15(29):3068-3080.

- Kedzierski RM, Yanagisawa M. 2001. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:851-876.
- Kim MJ, Futai K, Jo J, Hayashi Y, Cho K, Sheng M. 2007. Synaptic accumulation of PSD-95 and synaptic function regulated by phosphorylation of serine-295 of PSD-95. *Neuron* 56(3):488-502.
- Kim RY, Yao XY, Marmor MF. 1993. Oxygen dependency of retinal adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(6):2074-2078.
- Kitamei H, Iwabuchi K, Namba K, Yoshida K, Yanagawa Y, Kitaichi N, Kitamura M, Ohno S, Onoe K. 2006. Amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) with an inhibitor of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB), pyrrolidine dithiocarbamate. *J Leukoc Biol* 79(6):1193-1201.
- Kitano A, Saika S, Yamanaka O, Ikeda K, Okada Y, Shirai K, Reinach PS. 2007. Emodin suppression of ocular surface inflammatory reaction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(11):5013-5022.
- Klegeris A, Bissonnette CJ, McGeer PL. 2003. Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. *Br J Pharmacol* 139(4):775-786.
- Klitten LL, Rath MF, Coon SL, Kim JS, Klein DC, Moller M. 2008. Localization and regulation of dopamine receptor D4 expression in the adult and developing rat retina. *Exp Eye Res* 87(5):471-477.
- Kniesel U, Wolburg H. 2000. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 20(1):57-76.
- Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. 1988. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 238(2):249-252.
- Koto T, Takubo K, Ishida S, Shinoda H, Inoue M, Tsubota K, Okada Y, Ikeda E. 2007. Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. *Am J Pathol* 170(4):1389-1397.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. 2008. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 1778(3):631-645.
- Kroll AJ, Machemer R. 1968. Experimental retinal detachment in the owl monkey. 3. Electron microscopy of retina and pigment epithelium. *Am J Ophthalmol* 66(3):410-427.
- Kuc RE, Maguire JJ, Davenport AP. 2006. Quantification of endothelin receptor subtypes in peripheral tissues reveals downregulation of ET(A) receptors in ET(B)-deficient mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(6):741-745.
- Kuchler-Bopp S, Delaunoy JP, Artault JC, Zaepfel M, Dietrich JB. 1999. Astrocytes induce several blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells. *Neuroreport* 10(6):1347-1353.
- Kusuhara H, Sugiyama Y. 2001. Efflux transport systems for drugs at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier (Part 1). *Drug Discov Today* 6(3):150-156.
- Laqua H, Machemer R. 1975. Glial cell proliferation in retinal detachment (massive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol* 80(4):602-618.
- Leal EC, Manivannan A, Hosoya K, Terasaki T, Cunha-Vaz J, Ambrosio AF, Forrester JV. 2007. Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of

- leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(11):5257-5265.
- Lecain E, Alliot F, Laine MC, Calas B, Pessac B. 1991. Alpha isoform of smooth muscle actin is expressed in astrocytes in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* 28(4):601-606.
- Lee SW, Kim WJ, Choi YK, Song HS, Son MJ, Gelman IH, Kim YJ, Kim KW. 2003. SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat Med* 9(7):900-906.
- Levin ER. 1995. Endothelins. *N Engl J Med* 333(6):356-363.
- Lewis G, Mervin K, Valter K, Maslim J, Kappel PJ, Stone J, Fisher S. 1999. Limiting the proliferation and reactivity of retinal Muller cells during experimental retinal detachment: the value of oxygen supplementation. *Am J Ophthalmol* 128(2):165-172.
- Lewis GP, Charteris DG, Sethi CS, Leitner WP, Linberg KA, Fisher SK. 2002. The ability of rapid retinal reattachment to stop or reverse the cellular and molecular events initiated by detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(7):2412-2420.
- Lewis GP, Fisher SK. 2000. Muller cell outgrowth after retinal detachment: association with cone photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(6):1542-1545.
- Lewis GP, Sethi CS, Carter KM, Charteris DG, Fisher SK. 2005. Microglial cell activation following retinal detachment: a comparison between species. *Mol Vis* 11:491-500.
- Li DQ, Luo L, Chen Z, Kim HS, Song XJ, Pflugfelder SC. 2006. JNK and ERK MAP kinases mediate induction of IL-1beta, TNF-alpha and IL-8 following hyperosmolar stress in human limbal epithelial cells. *Exp Eye Res* 82(4):588-596.
- Liang FQ, Aleman TS, ZaixinYang, Cideciyan AV, Jacobson SG, Bennett J. 2001. Melatonin delays photoreceptor degeneration in the rds/rds mouse. *Neuroreport* 12(5):1011-1014.
- Liang FQ, Green L, Wang C, Alssadi R, Godley BF. 2004. Melatonin protects human retinal pigment epithelial (RPE) cells against oxidative stress. *Exp Eye Res* 78(6):1069-1075.
- Liang H, Baudouin C, Labbe A, Pauly A, Martin C, Warnet JM, Brignole-Baudouin F. 2006. In vivo confocal microscopy and ex vivo flow cytometry: new tools for assessing ocular inflammation applied to rabbit lipopolysaccharide-induced conjunctivitis. *Mol Vis* 12:1392-1402.
- Ligresti A, Bisogno T, Matias I, De Petrocellis L, Cascio MG, Cosenza V, D'Argenio G, Scaglione G, Bifulco M, Sorrentini I, Di Marzo V. 2003. Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. *Gastroenterology* 125(3):677-687.
- Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V. 2006. Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 318(3):1375-1387.
- Lim JM, Byun S, Chung S, Park TH, Seo JM, Joo CK, Chung H, Cho DI. 2004. Retinal pigment epithelial cell behavior is modulated by alterations in focal cell-substrate contacts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(11):4210-4216.

- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY, Kunos G. 2006. A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(36):13345-13350.
- Liu S, Li J, Tan DT, Beuerman RW. 2007. The eyelid margin: a transitional zone for 2 epithelial phenotypes. *Arch Ophthalmol* 125(4):523-532.
- Lu Q, Straiker A, Maguire G. 2000. Expression of CB2 cannabinoid receptor mRNA in adult rat retina. *Vis Neurosci* 17(1):91-95.
- Luchetti F, Betti M, Canonico B, Arcangeletti M, Ferri P, Galli F, Papa S. 2008. ERK MAPK activation mediates the antiapoptotic signaling of melatonin in UVB-stressed U937 cells. *Free Radic Biol Med*.
- Luo L, Li DQ, Doshi A, Farley W, Corrales RM, Pflugfelder SC. 2004. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(12):4293-4301.
- Luscher TF, Barton M. 2000. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 102(19):2434-2440.
- Maccarrone M, Di Rienzo M, Battista N, Gasperi V, Guerrieri P, Rossi A, Finazzi-Agro A. 2003. The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J Biol Chem* 278(36):33896-33903.
- MacCumber MW, Ross CA, Snyder SH. 1990. Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(6):2359-2363.
- Mackie K, Stella N. 2006. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J* 8(2):E298-306.
- Marie O, Thillaye-Goldenberg B, Naud MC, de Kozak Y. 1999. Inhibition of endotoxin-induced uveitis and potentiation of local TNF-alpha and interleukin-6 mRNA expression by interleukin-13. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(10):2275-2282.
- Marmor MF. 2001. Mechanism of normal retinal adhesion. In: Ryan SJ, editor. *Retina*: Mosby.
- Marmorstein AD. 2001. The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic* 2(12):867-872.
- Marquez L, Abanades S, Andreu M. 2008. [Endocannabinoid system and bowel inflammation.]. *Med Clin (Barc)* 131(13):513-517.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B. 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302(5642):84-88.
- Masaki T, Vane JR, Vanhoutte PM. 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol Rev* 46(2):137-142.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346(6284):561-564.

- Mattapallil MJ, Sahin A, Silver PB, Sun SH, Chan CC, Remmers EF, Hejtmancik JF, Caspi RR. 2008. Common genetic determinants of uveitis shared with other autoimmune disorders. *J Immunol* 180(10):6751-6759.
- Mayo JC, Sainz RM, Uria H, Antolin I, Esteban MM, Rodriguez C. 1998. Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J Pineal Res* 24(3):179-192.
- McFarland MJ, Barker EL. 2004. Anandamide transport. *Pharmacol Ther* 104(2):117-135.
- McIntosh BT, Hudson B, Yegorova S, Jollimore CA, Kelly ME. 2007. Agonist-dependent cannabinoid receptor signalling in human trabecular meshwork cells. *Br J Pharmacol* 152(7):1111-1120.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50(1):83-90.
- Mechoulam R, Gaoni Y. 1965. Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron* 21(5):1223-1229.
- Men G, Peyman GA, Kuo PC, Ghahramani F, Canakis C, Ratnakaram R, Bezerra Y. 2003. The effect of intraoperative retinal manipulation on the underlying retinal pigment epithelium: an experimental study. *Retina* 23(4):475-480.
- Mendizabal VE, Adler-Graschinsky E. 2007. Cannabinoids as therapeutic agents in cardiovascular disease: a tale of passions and illusions. *Br J Pharmacol* 151(4):427-440.
- Mervin K, Valter K, Maslim J, Lewis G, Fisher S, Stone J. 1999. Limiting photoreceptor death and deconstruction during experimental retinal detachment: the value of oxygen supplementation. *Am J Ophthalmol* 128(2):155-164.
- Messmer EM, Heidenkummer HP, Kampik A. 1998. Ultrastructure of epiretinal membranes associated with macular holes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236(4):248-254.
- Michael JC, Pak J, Pulido J, de Venecia G. 2003. Central serous chorioretinopathy associated with administration of sympathomimetic agents. *Am J Ophthalmol* 136(1):182-185.
- Mietz H, Walshe R, Wiedemann P, Heimann K, Green WR. 1994. Histopathologic study of epiretinal proliferations after vitrectomy with daunomycin and silicone oil. *Retina* 14(5):425-429.
- Miezewska KE, van Veen T, Murray JM, Aguirre GD. 1991. Rod and cone specific domains in the interphotoreceptor matrix. *J Comp Neurol* 308(3):371-380.
- Miller RD, Monsul NT, Vender JR, Lehmann JC. 1996. NMDA- and endothelin-1-induced increases in blood-brain barrier permeability quantitated with Lucifer yellow. *J Neurol Sci* 136(1-2):37-40.
- Milligan G. 2003. Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol Pharmacol* 64(6):1271-1276.
- Mitra RA, Mieler WF. 1999. Controversies in the management of open-globe injuries involving the posterior segment. *Surv Ophthalmol* 44(3):215-225.
- Mormina ME, Thakur S, Molleman A, Whelan CJ, Baydoun AR. 2006. Cannabinoid signalling in TNF-alpha induced IL-8 release. *Eur J Pharmacol* 540(1-3):183-190.

- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365(6441):61-65.
- Nagy N, Goldstein AM. 2006. Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Dev Biol* 293(1):203-217.
- Nakazawa T, Takeda M, Lewis GP, Cho KS, Jiao J, Wilhelmsson U, Fisher SK, Pekny M, Chen DF, Miller JW. 2007. Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(6):2760-2768.
- Nandrot EF, Anand M, Sircar M, Finnemann SC. 2006. Novel role for alphavbeta5-integrin in retinal adhesion and its diurnal peak. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(4):C1256-1262.
- Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. 2004. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *J Exp Med* 200(12):1539-1545.
- Narayan S, Brun AM, Yorio T. 2004. Endothelin-1 distribution and basolateral secretion in the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 79(1):11-19.
- Narayan S, Prasanna G, Krishnamoorthy RR, Zhang X, 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(11):4885-4894.
- Nguyen-Legros J, Chanut E, Versaux-Botteri C, Simon A, Trouvin JH. 1996. Dopamine inhibits melatonin synthesis in photoreceptor cells through a D2-like receptor subtype in the rat retina: biochemical and histochemical evidence. *J Neurochem* 67(6):2514-2520.
- Nguyen-Legros J, Hicks D. 2000. Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol* 196:245-313.
- Nour M, Quiambao AB, Peterson WM, Al-Ubaidi MR, Naash MI. 2003. P2Y(2) receptor agonist INS37217 enhances functional recovery after detachment caused by subretinal injection in normal and rds mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(10):4505-4514.
- O'Brien RF, Robbins RJ, McMurtry IF. 1987. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. *J Cell Physiol* 132(2):263-270.
- Ofek O, Karsak M, Leclerc N, Fogel M, Frenkel B, Wright K, Tam J, Attar-Namdar M, Kram V, Shohami E, Mechoulam R, Zimmer A, Bab I. 2006. Peripheral cannabinoid receptor, CB2, regulates bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(3):696-701.
- Ogata Y, Takahashi M, Ueno S, Takeuchi K, Okada T, Mano H, Ookawara S, Ozawa K, Berk BC, Ikeda U, Shimada K, Kobayashi E. 2003. Antiapoptotic effect of endothelin-1 in rat cardiomyocytes in vitro. *Hypertension* 41(5):1156-1163.
- Oksche A, Boese G, Horstmeyer A, Furkert J, Beyermann M, Bienert M, Rosenthal W. 2000. Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Mol Pharmacol* 57(6):1104-1113.

- Osborne NN, Nash MS, Wood JP. 1998. Melatonin counteracts ischemia-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(12):2374-2383.
- Ostrow LW, Langan TJ, Sachs F. 2000. Stretch-induced endothelin-1 production by astrocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 36(5 Suppl 1):S274-277.
- Ostrow LW, Sachs F. 2005. Mechanosensation and endothelin in astrocytes--hypothetical roles in CNS pathophysiology. *Brain Res Brain Res Rev* 48(3):488-508.
- Owczarek FR, Marak GE, Pilkerton AR. 1975. Retinal adhesion in light- and dark-adapted rabbits. *Invest Ophthalmol* 14(5):353-358.
- Pardridge WM. 2005. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol* 30(1):57-70.
- Peled M, Shaish A, Frishman L, Cohen H, Tal R, Harats D. 2006. Endothelin B receptor antagonist increases preproendothelin-1 transcription in bovine aortic endothelial cells and in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 47(5):668-672.
- Persidsky Y, Zheng J, Miller D, Gendelman HE. 2000. Mononuclear phagocytes mediate blood-brain barrier compromise and neuronal injury during HIV-1-associated dementia. *J Leukoc Biol* 68(3):413-422.
- Pertwee RG. 2000. Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development. *Expert Opin Investig Drugs* 9(7):1553-1571.
- Pertwee RG. 2005. Inverse agonism and neutral antagonism at cannabinoid CB1 receptors. *Life Sci* 76(12):1307-1324.
- Pertwee RG. 2006. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes (Lond)* 30 Suppl 1:S13-18.
- Pertwee RG, Fernando SR. 1996. Evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in mouse urinary bladder. *Br J Pharmacol* 118(8):2053-2058.
- Pertwee RG, Joe-Adigwe G, Hawksworth GM. 1996. Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in mouse vas deferens. *Eur J Pharmacol* 296(2):169-172.
- Petersen G, Moesgaard B, Schmid PC, Schmid HH, Broholm H, Kosteljanetz M, Hansen HS. 2005. Endocannabinoid metabolism in human glioblastomas and meningiomas compared to human non-tumour brain tissue. *J Neurochem* 93(2):299-309.
- Petty MA, Lo EH. 2002. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol* 68(5):311-323.
- Pflug R, Nelson R, Huber S, Reitsamer H. 2008. Modulation of horizontal cell function by dopaminergic ligands in mammalian retina. *Vision Res* 48(12):1383-1390.
- Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D. 1999. Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjogren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* 19(3):201-211.
- Porter AC, Felder CC. 2001. The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 90(1):45-60.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC. 2002. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 301(3):1020-1024.

- Pournaras CJ, Rungger-Brandle E, Riva CE, Hardarson SH, Stefansson E. 2008. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 27(3):284-330.
- Pozdeyev N, Tosini G, Li L, Ali F, Rozov S, Lee RH, Iuvone PM. 2008. Dopamine modulates diurnal and circadian rhythms of protein phosphorylation in photoreceptor cells of mouse retina. *Eur J Neurosci* 27(10):2691-2700.
- Prasanna G, Hulet C, Desai D, Krishnamoorthy RR, Narayan S, Brun AM, Suburo AM, Yorio T. 2005. Effect of elevated intraocular pressure on endothelin-1 in a rat model of glaucoma. *Pharmacol Res* 51(1):41-50.
- Prasanna G, Krishnamoorthy R, Clark AF, Wordinger RJ, Yorio T. 2002. Human optic nerve head astrocytes as a target for endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(8):2704-2713.
- Prefontaine A, Calderone A, Dupuis J. 2008. Role of endothelin receptors on basal and endothelin-1-stimulated lung myofibroblast proliferation. *Can J Physiol Pharmacol* 86(6):337-342.
- Prescott SM, Majerus PW. 1983. Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate. *J Biol Chem* 258(2):764-769.
- Prestifilippo JP, Fernandez-Solari J, de la Cal C, Iribarne M, Suburo AM, Rettori V, McCann SM, Elverdin JC. 2006. Inhibition of salivary secretion by activation of cannabinoid receptors. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(8):1421-1429.
- Raffai G, Feher E, Nadasy G, Paku S, Pogany G, Timar F, Szende B, Monos E. 2005. Selective suppression of an endothelin and platelet-derived growth factor containing vesicular system in endothelium of rat saphenous vein by long-term orthostasis. *J Vasc Res* 42(2):157-164.
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Batkai S, Hasko G, Liaudet L, Huffman JW, Csiszar A, Ungvari ZI, Mackie K, Chatterjee S, Pacher P. 2007. Cannabinoid-2 receptor stimulation attenuates TNF $\alpha$ -induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
- Rattner A, Nathans J. 2005. The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia. *J Neurosci* 25(18):4540-4549.
- Raub TJ. 1996. Signal transduction and glial cell modulation of cultured brain microvessel endothelial cell tight junctions. *Am J Physiol* 271(2 Pt 1):C495-503.
- Read RW. 2006. Uveitis: advances in understanding of pathogenesis and treatment. *Curr Rheumatol Rep* 8(4):260-266.
- Reese TS, Karnovsky MJ. 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34(1):207-217.
- Reppert SM, Weaver DR. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418(6901):935-941.
- Revoltella RP, Papini S, Rosellini A, Michelini M. 2007. Epithelial stem cells of the eye surface. *Cell Prolif* 40(4):445-461.
- Richardson JD, Kilo S, Hargreaves KM. 1998. Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. *Pain* 75(1):111-119.
- Ripodas A, de Juan JA, Roldan-Pallares M, Bernal R, Moya J, Chao M, Lopez A, Fernandez-Cruz A, Fernandez-Durango R. 2001. Localisation of endothelin-1

- mRNA expression and immunoreactivity in the retina and optic nerve from human and porcine eye. Evidence for endothelin-1 expression in astrocytes. *Brain Res* 912(2):137-143.
- Roberge FG, Caspi RR, Nussenblatt RB. 1988. Glial retinal Muller cells produce IL-1 activity and have a dual effect on autoimmune T helper lymphocytes. Antigen presentation manifested after removal of suppressive activity. *J Immunol* 140(7):2193-2196.
- Rogers SD, Peters CM, Pomonis JD, Hagiwara H, Ghilardi JR, Mantyh PW. 2003a. Endothelin B receptors are expressed by astrocytes and regulate astrocyte hypertrophy in the normal and injured CNS. *Glia* 41:180-190.
- Rogers SD, Peters CM, Pomonis JD, Hagiwara H, Ghilardi JR, Mantyh PW. 2003b. Endothelin B receptors are expressed by astrocytes and regulate astrocyte hypertrophy in the normal and injured CNS. *Glia* 41(2):180-190.
- Roldan-Pallares M, Rollin R, Mediero A, Martinez-Montero JC, Fernandez-Cruz A, Bravo-Llata C, Fernandez-Durango R. 2005. Immunoreactive ET-1 in the vitreous humor and epiretinal membranes of patients with proliferative vitreoretinopathy. *Mol Vis* 11:461-471.
- Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Dedhar S, de Herreros AG, Natali PG, Bagnato A. 2005. Endothelin-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 65(24):11649-11657.
- Rosellini A, Papini S, Giannarini C, Nardi M, Revoltella RP. 2007. Human conjunctival epithelial precursor cells and their progeny in 3D organotypic culture. *Int J Dev Biol* 51(8):739-743.
- Ruan GX, Allen GC, Yamazaki S, McMahon DG. 2008. An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biol* 6(10):e249.
- Ruan GX, Zhang DQ, Zhou T, Yamazaki S, McMahon DG. 2006. Circadian organization of the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(25):9703-9708.
- Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J, et al. 1991. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 115(6):1725-1735.
- Rubin LL, Staddon JM. 1999. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 22:11-28.
- Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, Guzman M. 2000. The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol* 58(4):814-820.
- Ruiz-Moreno JM, Thillaye B, de Kozak Y. 1992. Retino-choroidal changes in endotoxin-induced uveitis in the rat. *Ophthalmic Res* 24(3):162-168.
- Rummel C, Voss T, Matsumura K, Korte S, Gerstberger R, Roth J, Hubschle T. 2005. Nuclear STAT3 translocation in guinea pig and rat brain endothelium during systemic challenge with lipopolysaccharide and interleukin-6. *J Comp Neurol* 491(1):1-14.
- Russell FD, Davenport AP. 1999. Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol* 126(2):391-398.

- Sahna E, Parlakpınar H, Turkoz Y, Acet A. 2005. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion induced infarct size and oxidative changes. *Physiol Res* 54(5):491-495.
- Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11(12):4131-4142.
- Sakamoto K, Ishida N. 1998. Circadian expression of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat retina. *Neurosci Lett* 245(2):113-116.
- Sakamoto K, Liu C, Kasamatsu M, Iuvone PM, Tosini G. 2006. Intraocular injection of kainic acid does not abolish the circadian rhythm of arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA in rat photoreceptors. *Mol Vis* 12:117-124.
- Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. 1990. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 348(6303):732-735.
- Sanchez C, Rueda D, Segui B, Galve-Roperh I, Levade T, Guzman M. 2001. The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein *fan*. *Mol Pharmacol* 59(5):955-959.
- Sanchez MG, Ruiz-Llorente L, Sanchez AM, Diaz-Laviada I. 2003. Activation of phosphoinositide 3-kinase/PKB pathway by CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors expressed in prostate PC-3 cells. Involvement in Raf-1 stimulation and NGF induction. *Cell Signal* 15(9):851-859.
- Sarfraz S, Afaq F, Adhami VM, Malik A, Mukhtar H. 2006. Cannabinoid receptor agonist-induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G1 cell cycle arrest. *J Biol Chem* 281(51):39480-39491.
- Savaskan E, Jockers R, Ayoub M, Angeloni D, Fraschini F, Flammer J, Eckert A, Muller-Spahn F, Meyer P. 2007. The MT2 melatonin receptor subtype is present in human retina and decreases in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 4(1):47-51.
- Savaskan E, Wirz-Justice A, Olivieri G, Pache M, Krauchi K, Brydon L, Jockers R, Muller-Spahn F, Meyer P. 2002. Distribution of melatonin MT1 receptor immunoreactivity in human retina. *J Histochem Cytochem* 50(4):519-526.
- Scott IU, Flynn HW, Jr., Murray TG, Feuer WJ. 2003. Outcomes of surgery for retinal detachment associated with proliferative vitreoretinopathy using perfluoro-n-octane: a multicenter study. *Am J Ophthalmol* 136(3):454-463.
- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE. 1997. Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 142(2):278-287.
- Scher J, Wankiewicz E, Brown GM, Fujieda H. 2002. MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(3):889-897.
- Schiffman EL, Intengan HD, Thibault G, Touyz RM. 1997. Clinical significance of endothelin in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 12(4):354-367.
- Schinelli S. 2006. Pharmacology and physiopathology of the brain endothelin system: an overview. *Curr Med Chem* 13(6):627-638.

- Schinelli S, Zanassi P, Paolillo M, Wang H, Feliciello A, Gallo V. 2001. 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(22):8842-8853.
- Schlicker E, Timm J, Gothert M. 1996. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 354(6):791-795.
- Schraermeyer U, Heimann K. 1999. Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation. *Pigment Cell Res* 12(4):219-236.
- Schwartz D, de la Cruz ZC, Green WR, Michels RG. 1988. Proliferative vitreoretinopathy. Ultrastructural study of 20 retroretinal membranes removed by vitreous surgery. *Retina* 8(4):275-281.
- Sethi CS, Lewis GP, Fisher SK, Leitner WP, Mann DL, Luthert PJ, Charteris DG. 2005. Glial remodeling and neural plasticity in human retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(1):329-342.
- Shatos MA, Rios JD, Horikawa Y, Hodges RR, Chang EL, Bernardino CR, Rubin PA, Dartt DA. 2003. Isolation and characterization of cultured human conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(6):2477-2486.
- Sheridan CM, Occeleston NL, Hiscott P, Kon CH, Khaw PT, Grierson I. 2001. Matrix metalloproteinases: a role in the contraction of vitreo-retinal scar tissue. *Am J Pathol* 159(4):1555-1566.
- Shi-Wen X, Chen Y, Denton CP, Eastwood M, Renzoni EA, Bou-Gharios G, Pearson JD, Dashwood M, du Bois RM, Black CM, Leask A, Abraham DJ. 2004. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell* 15(6):2707-2719.
- Shi-Wen X, Denton CP, Dashwood MR, Holmes AM, Bou-Gharios G, Pearson JD, Black CM, Abraham DJ. 2001. Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J Invest Dermatol* 116(3):417-425.
- Shi-Wen X, Rodriguez-Pascual F, Lamas S, Holmes A, Howat S, Pearson JD, Dashwood MR, du Bois RM, Denton CP, Black CM, Abraham DJ, Leask A. 2006. Constitutive ALK5-independent c-Jun N-terminal kinase activation contributes to endothelin-1 overexpression in pulmonary fibrosis: evidence of an autocrine endothelin loop operating through the endothelin A and B receptors. *Mol Cell Biol* 26(14):5518-5527.
- Shichiri M, Kato H, Marumo F, Hirata Y. 1997. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension* 30(5):1198-1203.
- Shichiri M, Sedivy JM, Marumo F, Hirata Y. 1998. Endothelin-1 is a potent survival factor for c-Myc-dependent apoptosis. *Mol Endocrinol* 12(2):172-180.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. 1995. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* 270(8):3726-3731.
- Simon GM, Cravatt BF. 2006. Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem* 281(36):26465-26472.

- Singh AK, Jiang Y. 2004. How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? *Toxicology* 201(1-3):197-207.
- Smith RS, Rudt LA. 1975. Ocular vascular and epithelial barriers to microperoxidase. *Invest Ophthalmol* 14(7):556-560.
- Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC. 2001. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(10):2283-2292.
- Stanga PE, Kychenthal A, Fitzke FW, Halfyard AS, Chan R, Bird AC, Aylward GW. 2002. Retinal pigment epithelium translocation after choroidal neovascular membrane removal in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 109(8):1492-1498.
- Steinberg RH, Wood I. 1974. Pigment epithelial cell ensheathment of cone outer segments in the retina of the domestic cat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 187(1089):461-478.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388(6644):773-778.
- Stonebraker JR, Wagner D, Lefensty RW, Burns K, Gendler SJ, Bergelson JM, Boucher RC, O'Neal WK, Pickles RJ. 2004. Glycocalyx restricts adenoviral vector access to apical receptors expressed on respiratory epithelium in vitro and in vivo: role for tethered mucins as barriers to luminal infection. *J Virol* 78(24):13755-13768.
- Stork PJ, Schmitt JM. 2002. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 12(6):258-266.
- Straiker A, Stella N, Piomelli D, Mackie K, Karten HJ, Maguire G. 1999a. Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25):14565-14570.
- Straiker AJ, Maguire G, Mackie K, Lindsey J. 1999b. Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(10):2442-2448.
- Strauss O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85(3):845-881.
- Suburo AM, Chaud M, Franchi A, Polak JM, Gimeno MA. 1995. Distribution of neuronal and non-neuronal NADPH diaphorases and nitric oxide synthases in rat uterine horns under different hormonal conditions. *Biol Reprod* 52(3):631-637.
- Sugawara T, Sieving PA, Iuvone PM, Bush RA. 1998. The melatonin antagonist luzindole protects retinal photoreceptors from light damage in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(12):2458-2465.
- Sugden PH. 2003. An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 35(8):871-886.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 1995. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215(1):89-97.
- Sun D, Enzmann V, Lei S, Sun SL, Kaplan HJ, Shao H. 2003. Retinal pigment epithelial cells activate uveitogenic T cells when they express high levels of MHC class II molecules, but inhibit T cell activation when they express restricted levels. *J Neuroimmunol* 144(1-2):1-8.

- Takeda M, Takamiya A, Yoshida A, Kiyama H. 2002. Extracellular signal-regulated kinase activation predominantly in Muller cells of retina with endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(4):907-911.
- Torbidoni V, Iribarne M, Ogawa L, Prasanna G, Suburo AM. 2005. Endothelin-1 and endothelin receptors in light-induced retinal degeneration. *Exp Eye Res* 81(3):265-275.
- Torbidoni V, Iribarne M, Suburo AM. 2006. Endothelin receptors in light-induced retinal degeneration. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(6):1095-1100.
- Tosini G, Davidson AJ, Fukuhara C, Kasamatsu M, Castanon-Cervantes O. 2007. Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors. *FASEB J* 21(14):3866-3871.
- Tosini G, Dirden JC. 2000. Dopamine inhibits melatonin release in the mammalian retina: in vitro evidence. *Neurosci Lett* 286(2):119-122.
- Tosini G, Fukuhara C. 2003. Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. *J Neuroendocrinol* 15(4):364-369.
- Tseng SC. 1985. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology* 92(6):728-733.
- Turjanski AG, Rosenstein RE, Estrin DA. 1998. Reactions of melatonin and related indoles with free radicals: a computational study. *J Med Chem* 41(19):3684-3689.
- Turksen K, Troy TC. 2004. Barriers built on claudins. *J Cell Sci* 117(Pt 12):2435-2447.
- Uhlmann S, Bringmann A, Uckermann O, Pannicke T, Weick M, Ulbricht E, Goczałik I, Reichenbach A, Wiedemann P, Francke M. 2003. Early glial cell reactivity in experimental retinal detachment: effect of suramin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(9):4114-4122.
- Vyalov S, Desmouliere A, Gabbiani G. 1993. GM-CSF-induced granulation tissue formation: relationships between macrophage and myofibroblast accumulation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 63(4):231-239.
- Walshe R, Esser P, Wiedemann P, Heimann K. 1992. Proliferative retinal diseases: myofibroblasts cause chronic vitreoretinal traction. *Br J Ophthalmol* 76(9):550-552.
- Watsky MA, Jablonski MM, Edelhauser HF. 1988. Comparison of conjunctival and corneal surface areas in rabbit and human. *Curr Eye Res* 7(5):483-486.
- White MP, Fisher LJ. 1989. Effects of exogenous melatonin on circadian disc shedding in the albino rat retina. *Vision Res* 29(2):167-179.
- Wiechmann AF. 2002. Regulation of gene expression by melatonin: a microarray survey of the rat retina. *J Pineal Res* 33(3):178-185.
- Wiechmann AF, O'Steen WK. 1992. Melatonin increases photoreceptor susceptibility to light-induced damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(6):1894-1902.
- Wiedemann P, Weller M. 1988. The pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy. *Acta Ophthalmol Suppl* 189:3-15.
- Wilhelmsson U, Li L, Pekna M, Berthold CH, Blom S, Eliasson C, Renner O, Bushong E, Ellisman M, Morgan TE, Pekny M. 2004. Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci* 24(21):5016-5021.

- Wislocki GB, Ladman AJ. 1955. The demonstration of a blood-ocular barrier in the albino rat by means of the intravitam deposition of silver. *J Biophys Biochem Cytol* 1:501-510.
- Witkovsky P. 2004. Dopamine and retinal function. *Doc Ophthalmol* 108(1):17-40.
- Wolburg H, Lippoldt A. 2002. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 38(6):323-337.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B. 2003. Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 105(6):586-592.
- Wolosin JM, Budak MT, Akinci MA. 2004. Ocular surface epithelial and stem cell development. *Int J Dev Biol* 48(8-9):981-991.
- Wright K, Rooney N, Feeney M, Tate J, Robertson D, Welham M, Ward S. 2005. Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* 129(2):437-453.
- Xu H, Dawson R, Crane IJ, Liversidge J. 2005. Leukocyte diapedesis in vivo induces transient loss of tight junction protein at the blood-retina barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(7):2487-2494.
- Yamashita H, Hori S, Masuda K. 1986. Population and proportion of component cells in preretinal membranes. *Jpn J Ophthalmol* 30(3):269-281.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332(6163):411-415.
- Yanagisawa M, Masaki T. 1989. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci* 10(9):374-378.
- Yazulla S, Studholme KM, McIntosh HH, Deutsch DG. 1999. Immunocytochemical localization of cannabinoid CB1 receptor and fatty acid amide hydrolase in rat retina. *J Comp Neurol* 415(1):80-90.
- Yoshizawa T, Kimura S, Kanazawa I, Yanagisawa M, Masaki T. 1989. Endothelin-1 depolarizes a ventral root potential in the newborn rat spinal cord. *J Cardiovasc Pharmacol* 13 Suppl 5:S216-217.
- Zaedi S, Jesmin S, Yamaguchi N, Shimojo N, Maeda S, Gando S, Yamaguchi I, Goto K, Miyauchi T. 2006. Altered expression of endothelin, vascular endothelial growth factor, and its receptor in hepatic tissue in endotoxemic rat. *Exp Biol Med (Maywood)* 231(6):1182-1186.
- Zajicek G, Perry A, Pe'er J. 1995. Streaming of labelled cells in the conjunctival epithelium. *Cell Prolif* 28(4):235-243.
- Zhang J, Wu GS, Ishimoto S, Pararajasegaram G, Rao NA. 1997. Expression of major histocompatibility complex molecules in rodent retina. Immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(9):1848-1857.
- Zhong L, Geng L, Njie Y, Feng W, Song ZH. 2005. CB2 cannabinoid receptors in trabecular meshwork cells mediate JWH015-induced enhancement of aqueous humor outflow facility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(6):1988-1992.

Zhu Q, Xu X, Xia X, Gu Q, Ho PC. 2005. Role of protein kinase C on the alteration of retinal endothelin-1 in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Eye Res* 81(2):200-206.