

ESTUDIOS DEL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA EN CULTIVO

ELENA BARRAQUER y
GERALD J. CHADER
MARYLAND, U.S.A.

INTRODUCCION

Muchas alteraciones de la función visual atribuidas a deficiencias metabólicas se consideran estar acompañadas de alteraciones del epitelio pigmentario de la retina. Debido a la asociación íntima entre estas células y los fotorreceptores retinianos, es también posible esperar que alteraciones de la función de este epitelio puedan causar alteraciones secundarias en los receptores.

Reciente evidencia obtenida en nuestro laboratorio sugiere que el calcio es importante en la manutención de receptores para la vitamina A, en las células del epitelio pigmentario; estas células normalmente contienen altos niveles de calcio. Calcio también es importante para el proceso de transducción de la luz en los fotorreceptores¹ y este proceso se considera estar bajo la influencia parcial de GMP cíclico y tal vez AMP cíclico². Con el microscopio electrónico se ha comprobado que la adición de AMP cíclico a células pigmentarias en cultivo, produce cambios morfológicos expresados por un aumento en el contenido de melanina y un alargamiento de las microvellosidades del epitelio³.

Debido a estas propiedades nosotros hemos examinado los efectos de la variación de la concentración de calcio en la actividad de las células

del epitelio pigmentario, medida a través de la producción de pigmento y el contenido de GMP y AMP cíclicos.

El epitelio pigmentario de la retina consiste en un tipo único de células que, en condiciones apropiadas, crecen y se diferencian en varios medios de cultivo⁴. Células en cultivo pueden ser fácilmente expuestas a cambios en la concentración de diferentes elementos. Por esta razón, nosotros estudiamos los efectos de la variación de calcio en células pigmentarias del embrión de pollo *in vitro*. El uso de tejido embrionario tiene ciertas ventajas sobre el uso de tejido adulto, ya que crece mejor en cultivo y el epitelio pigmentario del embrión de pollo puede ser disecado totalmente de los tejidos vecinos. A partir de un número pequeño de embriones, se puede conseguir una gran cantidad de células que crecen *in vitro* de la misma forma que *in vivo*, o sea en un solo plano celular, cesando su crecimiento a las 3 o 4 semanas en cultivo, sin sufrir transformaciones aparentes. Estas células mantienen su morfología normal, presentando microvellosidades y lisosomas, su pigmentación es similar a la observada *in vivo* y mantienen su actividad fagocitaria⁵. Lo que es más importante, células pigmentarias en cultivo mantienen su estado de diferenciación y conservan muchos de los sistemas enzimáticos y protéicos que otros tipos celulares pierden al ser cultivados.

MATERIALES Y METODOS

Embriones de *Gallus gallus* fueron obtenidos de un proveedor comercial local. En el presente estudio usamos embriones en el estadio correspondiente a 7 u 8 días de incubación. El epitelio pigmentario se disecó en una pieza única que fue disociada en una solución enzimática de Coon (6 u/ml. de colagenasa, 0,1% de tripsina, 2% de suero de pollo), que contenía 4 mm. de EDTA, incubándolas a 37,5° C durante 10 o 15 minutos. El medio esencial mínimo de Eagle, con un suplemento de 5% de suero fetal bovino, fue usado para cultivar el epitelio en platos de plástico de 60 mm. de diámetro, que contenían 3 ml. del dicho medio.

Normalmente cultivamos 80 platos, usando aproximadamente 48 ojos. El medio de Eagle en 40 de los platos contenía la concentración usual de calcio (1,8 mm.) y en los 40 restantes la concentración fue reducida a 0,18 mm.

La capacidad de las células de sintetizar pigmento fue evaluada estudiando la actividad de la tirosinasa contenida en ellas a partir del siguiente ensayo:

ESTUDIOS DEL EPITELIO PIGMENTARIO

Los cultivos fueron lavados 3 veces con medio de Dulbecco. Las células fueron removidas de los platos donde habían sido cultivadas y centrifugadas a 3.000 r.p.m., durante 3 minutos, para concentrarlas. El sedimento fue separado del sobrenadante y un extracto de células libres fue preparado homogeneizando la masa de células contenidas en el sedimento en 0,5 ml. de sobrenadante. Este extracto fue ultracentrifugado a 35.000 r.p.m., durante 1 hora, y el sobrenadante fue recogido separando 200 ul para determinar las proteínas contenidas. Mantuvimos todos estos procedimientos a baja temperatura (alrededor de 2°C), para evitar que la actividad enzimática se perdiese. La mezcla para el ensayo (volumen total 200 ul) fue preparada mezclando el extracto de células libres (sobrenadante), con una solución tampón de fosfato de sodio, L-DOPA, L-tirosina y L-tirosina marcada con tritio. La mezcla fue incubada durante 3 horas a 37,5°C. El proceso ocurrido en estas condiciones fue el siguiente: la tirosinasa contenida en el sobrenadante intercambió por un radical OH, el hidrógeno radioactivo del anillo de tirosina marcada, con la consecuente formación de agua tritiada. La reacción fue parada en un baño de hielo, y la mezcla fue pasada a través de columnas de resina sintética de intercambio iónico de 2,5 cm. de largo (Dowex 50W-X8). La mezcla del ensayo reaccionó con la resina sintética, excepto el agua radioactiva que pasó a través de dicha resina y se recogió en frascos. La cantidad de agua tritiada formada fue proporcional a la cantidad de tirosinasa presente en la mezcla. El agua tritiada fue diluída en 2,5 ml. de agua destilada y 16 ml. de una mezcla de cintilación para soluciones acuosas, y la radioactividad de esta solución fue medida. La cifra de desintegraciones por minuto (D.P.M.), indicó el grado de actividad de la tirosinasa contenida en las células.

Con otro grupo de cultivos estudiamos la concentración de nucleótidos cíclicos contenida en las células:

La muestra fue diluída en 6% de ácido Tricloroacético y colocada en una columna de resina sintética de intercambio iónico (Bio-Rad Ag 1-X8), lavándola con 10 ml. de agua destilada, 10 ml. de ácido fórmico 2N para recoger el AMP cíclico, y con 10 ml. de ácido fórmico 4N para recoger el GMP cíclico. Anhídrido acético y tritilamina (en solución de 1:2), fueron usados para aumentar la sensibilidad del ensayo. Para el radioinmunoensayo usamos un anti-

cuerpo para cada nucleótido cíclico, midiendo el desplazamiento específico de ^{125}I -AMP cíclico y de ^{125}I -GMP cíclico.

RESULTADOS

MORFOLOGIA:

En la primera semana en cultivo, las células del epitelio pigmentario presentaron cuerpos celulares relativamente transparentes con forma semejante a fibroblastos, hallándose distribuidas en el plato en forma solitaria o en grupos conteniendo 5 o 6 células separadas unas de otras. Con crecimiento ulterior, estas células tomaron forma hexagonal y formaron colonias de forma y localización regular, que recordaban a los adoquines del empedrado de las calles (figura 1). Mientras que la mayoría de células eran mononucleadas, fue posible encontrar algunas binucleadas. En cultivos de edad avanzada fue muy común el hallar muchas células multinucleadas.

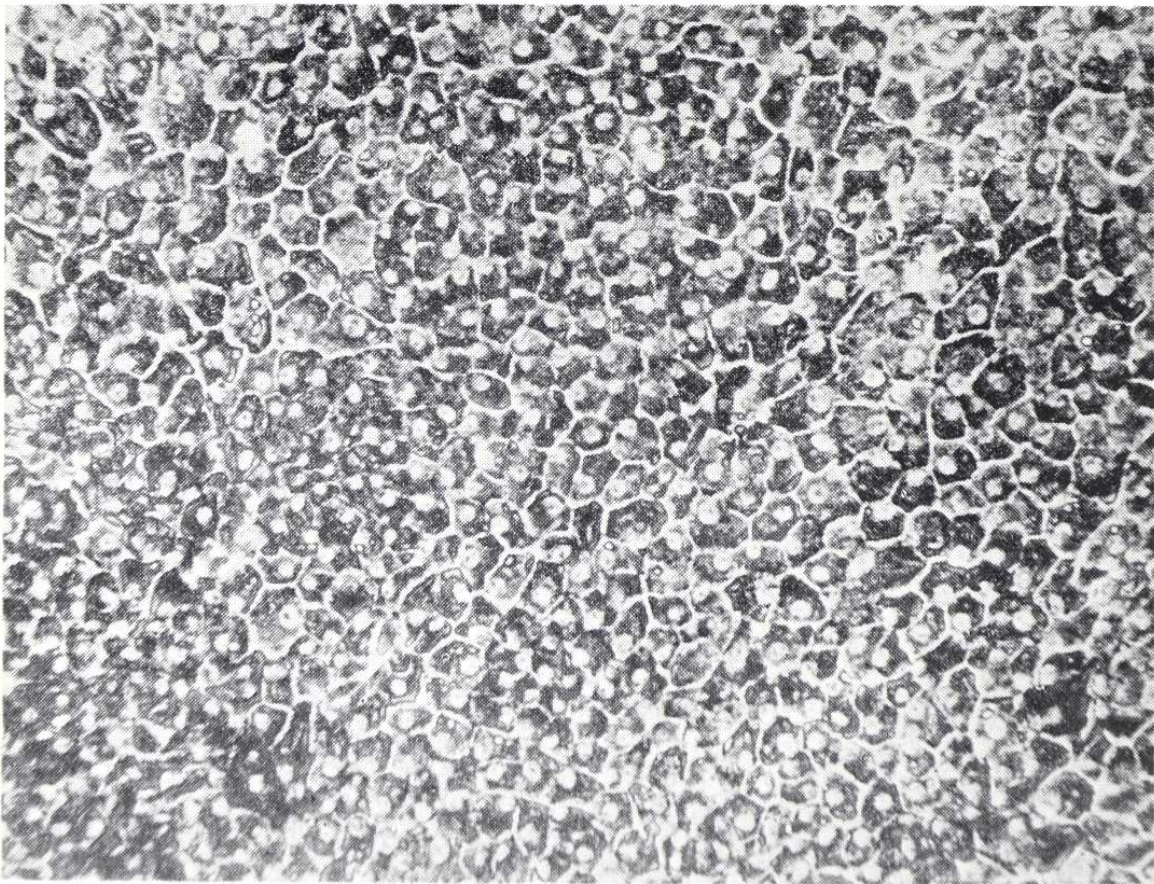


FIGURA 1

Cultivo de células del epitelio pigmentario a las 2 semanas de edad en medio con concentración normal de calcio (1.8 mM). Foto tomada con microscopio electrónico.

ESTUDIOS DEL EPITELIO PIGMENTARIO

La pigmentación varió con la edad de las células y fue diferente en las células de distintas áreas de una misma colonia. Las células más viejas fueron localizadas en el centro de las colonias, el cual fue más oscuro que los bordes de éstas, donde encontramos células jóvenes en estado de división y con forma estrellada. Sin embargo, la pigmentación también varió en células de la misma edad, localizadas en la misma área de una colonia, donde se observaron células con distinta cantidad de pigmento colocadas una al lado de otra.

Los cultivos en el medio deficiente en calcio crecieron más despacio y con una coloración más clara que los cultivados en medio con una concentración normal de calcio. Esto se pudo observar a simple vista (figura 2), y con el microscopio óptico. Con éste se observó que los cultivos conteniendo medio con concentración normal de calcio, parecían 2 o 3 semanas más

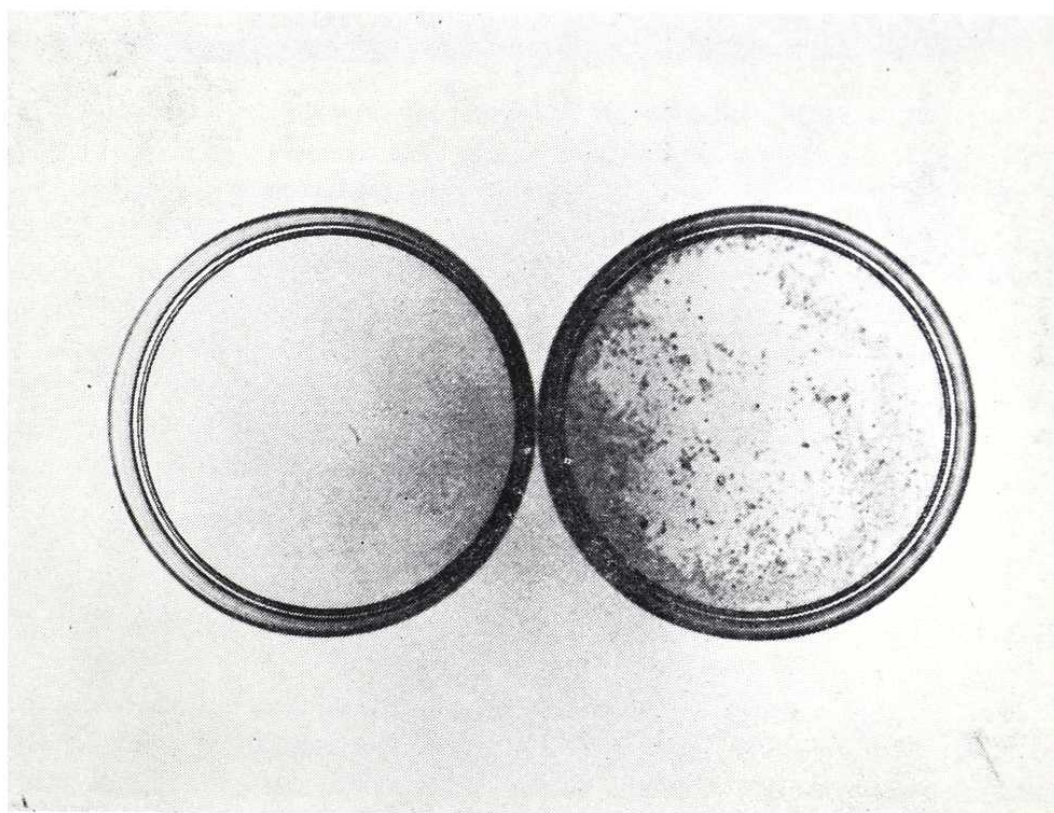


FIGURA 2

Efecto del calcio en los cultivos de células del epitelio pigmentario. Derecha: plato conteniendo medio con concentración normal de calcio (1,8 mm). Izquierda: cultivo de la misma edad en medio deficiente en calcio (1,8 mm). Obsérvese la diferencia en la pigmentación de los dos cultivos.

viejos que los cultivados en el medio deficiente en calcio: había un número mayor de colonias, conteniendo más pigmento. En contraste, cultivos en el medio con bajo calcio, mostraban muchas células jóvenes en estadio de división que, en un cultivo de la misma edad en medio, conteniendo una concentración normal de calcio, sólo habrían aparecido en los bordes de las colonias.

Con el microscopio electrónico se observaron otros cambios morfológicos en los cultivos en el medio deficiente en calcio: disminución del número de melanosomas y premelanosomas, menor cantidad de microvellosidades, aumento del retículo endoplásmico granular y de la producción de matriz celular, y en general las células parecieron anormalmente diferenciadas (figura 3)

ACTIVIDAD DE LA TIROSINASA:

Los dos tipos de cultivos presentaron una actividad enzimática diferente. En los cultivos conteniendo medio con concentración normal de calcio, la actividad de la tirosinasa disminuyó con la edad del cultivo, llegando a un máximo en cultivos de 6 días de edad. En los cultivos con medio deficiente en calcio, sin embargo, las células no alcanzaron el grado máximo de actividad enzimática hasta los 24 días de edad (figura 4). Esta observación no fue sorprendente debido a que el déficit de calcio retrasa el crecimiento y desarrollo de estas células en todos sus aspectos, y que se cree que el calcio es necesario para la formación de gránulos de pigmento ya que este elemento se encuentra unido a dichos gránulos en diferentes partes del cuerpo, especialmente en el epitelio pigmentario.

CONCENTRACION DE LOS NUCLEOTIDOS CICLICOS:

Las concentraciones de los nucleótidos cíclicos también variaron. En los cultivos conteniendo medio con concentración normal de calcio, hallamos una concentración máxima en los cultivos de 2 a 3 semanas de edad. Observamos una concentración máxima de GMP cíclico a los 11 días en cultivo, y una de AMP cíclico a los 17 días. Los dos nucleótidos cíclicos se encontraron en cultivo en concentraciones similares, pero estas fueron inferiores a las que se encuentran en las células del epitelio pigmentario del embrión de pollo *in vivo*.

ESTUDIOS DEL EPITELIO PIGMENTARIO

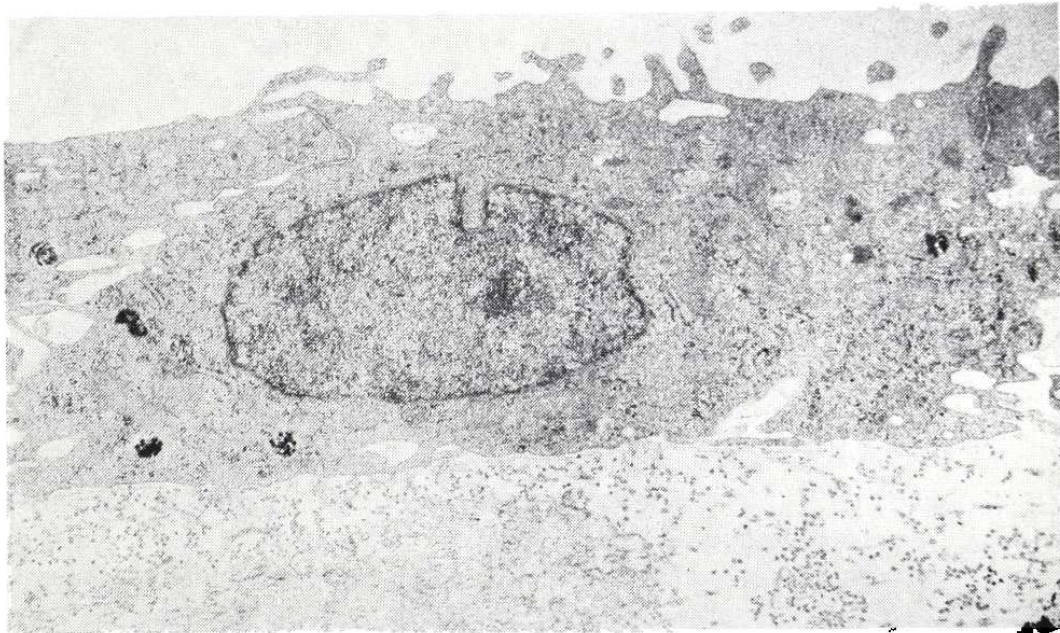
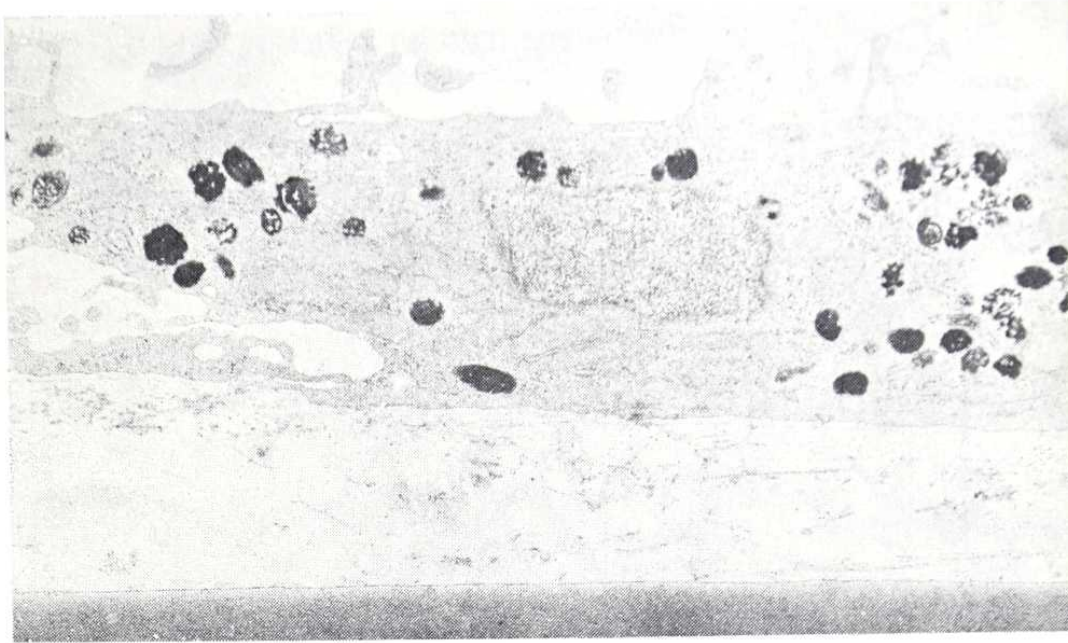


FIGURA 3 - A - B.

Cultivos de epitelio pigmentario observados al microscopio electrónico. a) Medio de cultivo con concentración normal de calcio (1,8 mm); b) medio deficiente en calcio (0,18 mm): disminución del número de melanosomas y premelanosomas, menor cantidad de microvellosidades, aumento del RE granular y de la producción de matriz celular.

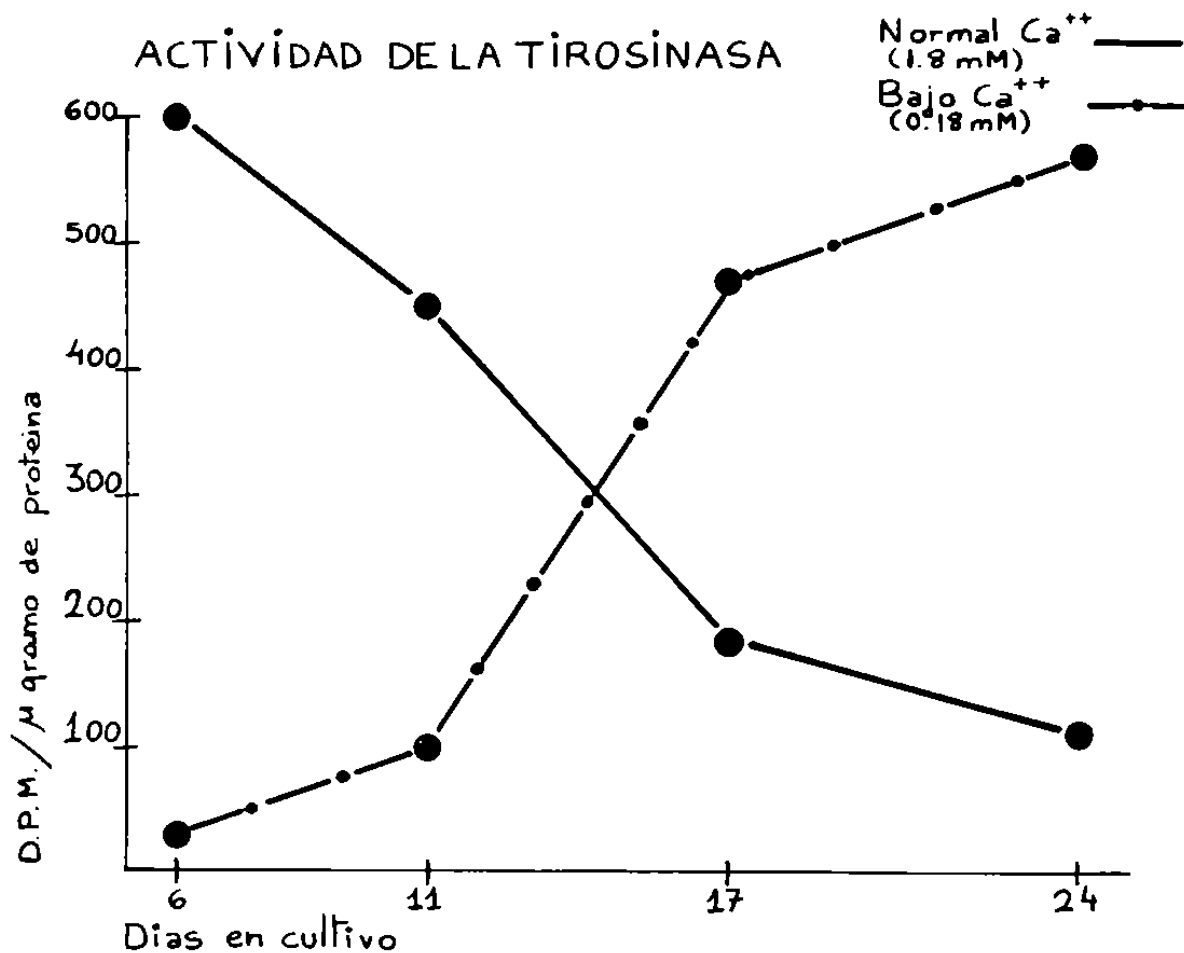


FIGURA 4

Actividad de la tirosinasa en las células del epitelio pigmentario en cultivo. En medio normal en calcio (1,8 mM), la actividad disminuye con la edad del cultivo. En medio bajo en calcio (0,18 mM), las células no alcanzan su máxima actividad enzimática hasta los 24 días en cultivo.

En los cultivos con medio deficiente en calcio ambos nucleótidos cíclicos también alcanzaron sus máximas concentraciones a las 2 o 3 semanas de vida en cultivo. Mientras que en el medio con concentración normal de calcio la concentración máxima de AMP cíclico era mayor que la de GMP cíclico, en el medio bajo en calcio esta relación se invertía (figura 5).

Se sabe que los nucleótidos cíclicos actúan como mensajeros intracelulares, y que el GMP cíclico es elevado en las células indiferenciadas que se encuentran en estadio de crecimiento máximo, mientras que el AMP cíclico es elevado en células bien diferenciadas.

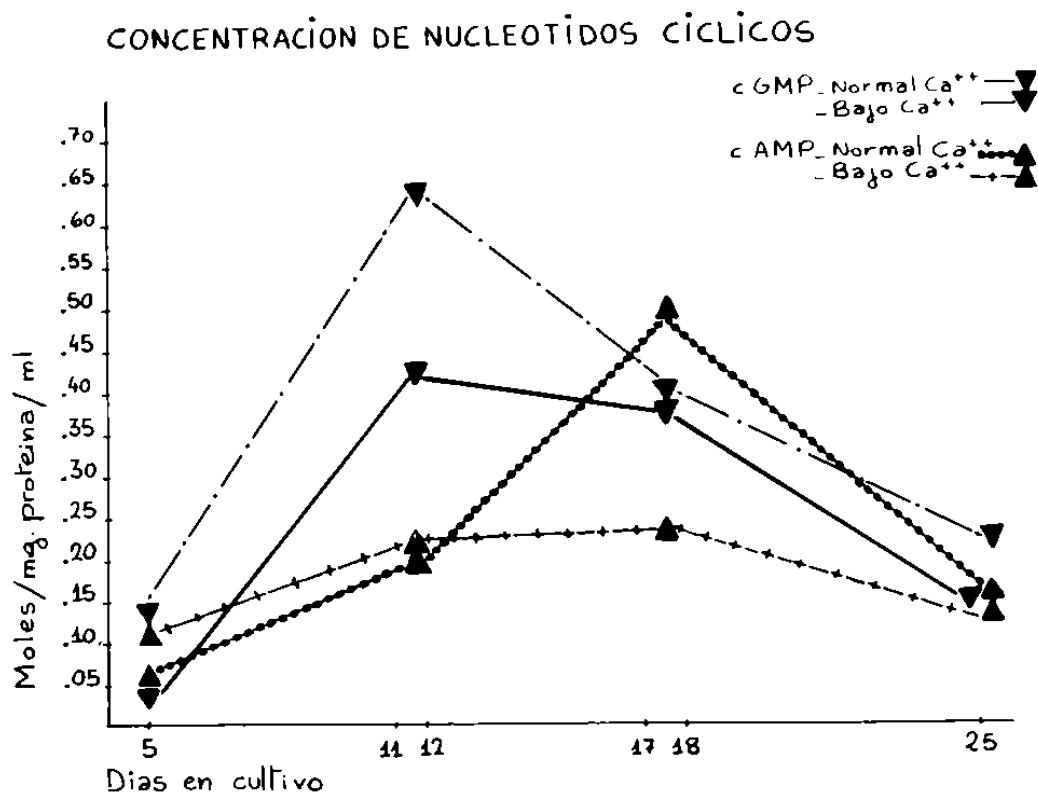


FIGURA 5

Concentración de los nucleótidos cíclicos en las células del epitelio pigmentario en cultivo. En medio normal en calcio (1,8), la concentración máxima de AMP cíclico es mayor que la de GMP cíclico, pero en el medio bajo en calcio (0,18 mm), esta relación se invierte.

Por lo que no es extraño observar el incremento de GMP cíclico en el medio deficiente en calcio junto con la disminución de AMP cíclico en dicho medio.

CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren que el calcio es un factor muy importante para la manutención del epitelio pigmentario en cultivo. Su ausencia en el medio de cultivo provoca cambios en la pigmentación normal de las células, en los niveles de concentración de los nucleótidos cíclicos y en la melanogénesis de los cultivos en estado joven. La falta de calcio en el medio de cultivo retrasa el crecimiento y diferenciación de las células, y produce

cambios en otros aspectos del fenotipo celular. Es probable que el calcio tenga una profunda influencia tanto en el desarrollo como en la homeostasis de las células del epitelio pigmentario de la retina *in vitro*, y posiblemente también *in vivo*.

Agradecemos la colaboración del doctor Francisco de Monasterio, en la revisión científica de este trabajo para su publicación.

REFERENCES

1. HAGINS, W. A., & YOSHIKAMI, S.: **Ionic mechanism in excitation of photoreceptors.** Ann. N. Y. Acad. Sci. 264: 314-325.
2. FLETCHER, R. T., & CHADER, G. J.: **Cyclic GMP: Control of concentration by light in retinal photoreceptors.** Biochem. Biophys. Res. Comm. 70: 1297-1302, 1976.
3. y 4. REDFERN, N., ISRAEL, P., BERGSMA, D., Robison, Jr., W. G., WHIKEHART, D., & CHADER, G. J.: **Neural retinal and pigment epithelial cells in culture: Patterns of differentiation and effects of prostaglandins and cyclic AMP on pigmentation.** Exp. Eye Res. 22: 559-568, 1976.
5. GOLDMAN, A. I., O'BRIEN, P. J., MASTERSON, E., ISRAEL, P., TEIRSTEIN, P., & CHADER, G. J.: **A quantitative system for studying phagocytosis in pigment epithelium tissue culture.** Exp. Eye Res. 28: 455-467, 1979.