



**DEPARTAMENT DE CIÈNCIES FISIOLÒGIQUES I
LABORATORI DE NEUROFISIOLOGIA**

TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LA
SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA
EN LA RED TRABECULAR**

**DAVID SOTO DEL CERRO
2005**

ARCADI GUAL SALA y **XAVIER GASULL CASANOVA**, catedrático y profesor titular de Fisiología respectivamente, del Departament de Ciències Fisiològiques I de la Universitat de Barcelona,

CERTIFICAN:

Que **David Soto del Cerro** ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a la tesis doctoral titulada: "Implicaciones funcionales de la señalización purinérgica en la red trabecular" la cual se ha desarrollado en el Departament de Ciències Fisiològiques I de la Universitat de Barcelona.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firman el certificado en Barcelona a 20 de Junio de 2005.

Fdo: Arcadi Gual Sala

Fdo: Xavier Gasull Casanova

IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LA SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA EN LA RED TRABECULAR

Tesis presentada por David Soto del Cerro para optar al grado de Doctor en Biología por la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Septiembre de 2005

Directores: Arcadi Gual Sala y Xavier Gasull Casanova

AGRADECIMIENTOS

Creedme si os digo que supone para mí un gran momento el escribir al fin estas líneas. Creo que necesitaría de la totalidad de las páginas de esta tesis sólo para expresar los cientos de anécdotas, vivencias y sentimientos que ha generado mi periodo predoctoral. Dicho esto, me ceñiré más o menos al protocolo estándar de agradecimientos con ligeras modificaciones.

En primer lugar, quería agradecerle a mi director de tesis, Arcadi Gual, el haberme brindado la oportunidad de formarme como investigador al haberme aceptado en su grupo. A Xavier Gasull, co-director de tesis, quería agradecerle la asistencia científica prestada durante el periodo de la realización de esta tesis y su inestimable ayuda en la escritura de las divulgaciones científicas. A Jordi Palés quiero agradecerle su apoyo docente, los conocimientos de fisiología que me ha enseñado y esas graciosas anécdotas que ha compartido con todos nosotros en las cenas de laboratorio.

Gracias a Miguel Morales por su ayuda y sus sabios y sosegados consejos. Miguel, quiero disculparme por ponerte frenético en tantas ocasiones al no canalizar un “pelín” más esa energía desbocada que emana de mi ser, situando así en peligro la integridad del laboratorio. De todas maneras debo decirte que a mi parecer exagerabas, pues a la hora de mi marcha el recinto aún sigue en pie.

A Artur Llobet le agradezco que, a pesar de no haber coincidido durante mucho tiempo en el laboratorio, me ayudó a dar los primeros pasos por el espectacular y fascinante micromundo de la electrofisiología. También le quiero agradecer sus siempre interesantes consejos y su pasión científica, la cual es terriblemente contagiosa.

Para Núria no tengo palabras. No se podría expresar ni con un millón de palabras el significado de amistad. Pero ya que he mencionado que seguiría el protocolo, lo respetaré... Gracias Núria por ser una compañera de tesis y amiga simplemente genial. Gracias por tu siempre desinteresada ayuda, tu sincero apoyo, tu nobleza y tu confianza entre otros cientos de cosas más.

Gracias a Azucena, por mantener siempre mi cerebro con la glucosa suficiente y mis músculos tonificados para enfrentarme a los experimentos del camino. Y también a Juanma, ese becario adoptivo a fascículos.

A Esther Gratacós le quiero agradecer los ánimos científicos que recibí por su parte durante el breve período que coincidimos compartiendo poyata.

Gracias a Neus, por su amistad, su pegadiza y sonora alegría y la confianza que ha depositado en mí en más de una ocasión. Gracias por estar dispuesta siempre a tender una mano amiga y, en ocasiones, una mano fisioterapéutica.

Y que le puedo decir a Elena. Elenita... un fractal caótico perdido en un océano de conocimiento. Espero que en un futuro la ciencia una de nuevo nuestras líneas de existencia en algún laboratorio del mundo, porque me fascina tu curiosidad investigadora y las tertulias científicas que he compartido contigo.

A Anna Priscila gracias por las pocas semanas de risas que me ha ofrecido. Han faltado unos meses de tesis juntos para revolucionar el laboratorio de Neurofisiología.

Gracias a Susana por relevarme en la ardua tarea de “guardián de la cueva”. Que tus ojos no se conviertan en los de un topo y puedas seguir los designios del Fura-2 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands).

A Pablo, le doy las gracias de todo corazón por su consejo y su ayuda en los momentos difíciles. Gracias por los ratos compartidos dentro y fuera de las paredes de la Facultad... y en una ocasión, por “dejarse ganar” 7 a 0.

Gracias a la Dra. Frances Edwards por aceptarme con los brazos abiertos en su laboratorio en Londres durante un corto pero emocionante periodo de tiempo y en especial a una pequeña y estridente post-doc italiana que me hizo redescubrir el *patch-clamp*: Roberta.

Agradezco a mi amigo y redactor científico del IDIBAPS, Alex, el haber mostrado siempre gran interés por mi trabajo de tesis a pesar de vivir la ciencia desde otra “trinchera”.

A Esther Tobías, gracias por compartir sus conocimientos científicos y humanos. Ella me enseñó a sobrellevar con dignidad la falta de luz durante horas en el *set* de calcio.

Gracias a mucha otra gente:

A Núria, Lúdia y Pilar, estupendas personas y mejores aún en un duro, importante y fundamental trabajo a la sombra.

A Montse Pau por los innumerables cafés a los cuales me ha invitado, acompañados de interesantes tertulias.

A los miembros de la unidad de ahí arriba: Mari, Elisenda, Feliu, Ada, Jordi, Churri, Manolo, Lluïsa, Carmen y Rosa. A su microondas.

A todos los otros becarios del resto de España: Waldy, Kike, Cruzmi y varios miles más. Y en especial, gracias a uno, Marc, por los buenos e intensos momentos en Bellvitge. A los que ya no están, a los que vendrán.

Pero sobretodo, sobretodo, gracias a ti, Anna. Gracias por creer en mí como científico. Y gracias por millones de otras cosas más. Muchas gracias.

Gracias a la entropía... sin ella, nada sería lo mismo.

A mis padres, Ana y Daniel

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Anatomía funcional del ojo	3
1.1.1. Las tóxicas oculares	3
1.1.2. El segmento anterior del ojo: las cámaras oculares	7
1.1.2.1. Cámara posterior.....	7
1.1.2.1.1. Cuerpo ciliar y procesos ciliares.....	7
1.1.2.2. Cámara anterior y región del ángulo iridocorneal	8
1.1.2.2.1. La red trabecular	9
1.1.2.2.2. El canal de Schlemm.....	11
1.2. El humor acuoso	12
1.2.1. Composición del humor acuoso.....	12
1.2.2. Producción del humor acuoso.....	14
1.2.2.1. Mecanismos implicados en la formación de humor acuoso	14
1.2.2.2. Regulación de la formación del humor acuoso	17
1.2.3. Evacuación del humor acuoso	19
1.2.3.1. Vía convencional	19
1.2.3.2. Vía uveoescleral.....	21
1.3. La presión intraocular (IOP).....	22
1.3.1. Definición.....	22
1.3.2. Medición y valores normales.....	23
1.3.3. Variaciones fisiológicas de la IOP	24
1.3.4. Alteraciones patológicas de la IOP: los glaucomas	25
1.3.4.1. Glaucoma de ángulo cerrado	26
1.3.4.2. Glaucoma primario de ángulo abierto.....	26
1.3.4.3. Glaucomas secundarios	28
1.3.4.4. Genes asociados al glaucoma.....	28
1.3.5. Tratamiento del glaucoma.....	29
1.3.5.1. Tratamientos quirúrgicos	30
1.3.5.2. Farmacología en el tratamiento del glaucoma	30
1.3.6. Terapia génica en el tratamiento del glaucoma.....	32
1.4. Fisiología de la red trabecular	34
1.4.1. La célula trabecular.....	34
1.4.1.1. Origen de la célula trabecular.....	34
1.4.1.2. Heterogeneidad funcional.....	34
1.4.1.3. Características funcionales de las células trabeculares	35
1.4.1.3.1. Potencial de membrana y excitabilidad	35

1.4.1.3.2.	Proliferación.....	36
1.4.1.3.3.	Secreción.....	36
1.4.1.3.4.	Fagocitosis.....	37
1.4.1.3.5.	Contractibilidad.....	37
1.4.1.3.6.	Respuesta al estrés.....	38
1.4.1.4.	Receptores.....	39
1.4.1.5.	Canales.....	41
1.4.1.6.	Bombas e intercambiadores.....	42
1.4.1.7.	Vías de señalización intracelular.....	43
1.4.1.7.1.	El calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$).....	43
1.4.1.7.2.	AMPC.....	44
1.4.1.7.3.	GMPc/NO.....	44
1.4.2.	Mecanismos de regulación de la red trabecular.....	45
1.4.2.1.	Propiedades contráctiles de la red trabecular.....	45
1.4.2.2.	Antagonismo funcional red trabecular-músculo ciliar.....	47
1.4.2.3.	Cambios en la matriz extracelular.....	50
1.4.2.4.	El citoesqueleto de actina y las uniones celulares.....	52
1.4.2.5.	Regulación del volumen.....	53
1.5.	Señalización purinérgica.....	56
1.5.1.	Receptores purinérgicos.....	56
1.5.1.1.	Receptores P1.....	57
1.5.1.2.	Receptores P2.....	57
1.5.1.2.1.	Receptores P2X.....	58
1.5.1.2.2.	Receptores P2Y.....	58
1.5.2.	Señalización purinérgica en el ojo.....	63
1.5.2.1.	Receptores purinérgicos en los tejidos oculares.....	63
1.5.2.1.1.	Conjuntiva.....	64
1.5.2.1.2.	Córnea.....	64
1.5.2.1.3.	Iris.....	65
1.5.2.1.4.	Cuerpo ciliar y procesos ciliares.....	65
1.5.2.1.5.	Cristalino.....	66
1.5.2.1.6.	Red trabecular y canal de Schlemm.....	66
1.5.2.1.7.	Retina.....	68
1.5.2.1.8.	Coroides y epitelio pigmentado de la retina.....	69
1.5.2.2.	Nucleótidos y derivados en el humor acuoso.....	69
1.5.2.3.	Efecto de compuestos purinérgicos sobre la IOP.....	71

2. OBJETIVOS	75
3. MATERIAL Y MÉTODOS	79
3.1. Obtención de muestras biológicas.....	79
3.2. Disección del tejido	79
3.3. Cultivos primarios de células trabeculares.....	80
3.4. Registros del calcio intracelular	81
3.5. Registros electrofisiológicos	83
3.6. Medidas de la liberación de ATP	85
3.7. Inmunocitoquímica y Western Blot	87
3.7.1. Inmunocitoquímica.....	87
3.7.2. Western Blot.....	88
3.8. Perfusión de segmentos anteriores <i>in vitro</i>	89
3.9. Análisis estadístico.....	91
4. RESULTADOS	97
4.1. Efectos del ATP sobre el Ca ²⁺ intracelular.....	97
4.2. Caracterización farmacológica	101
4.2.1. Efecto de agonistas sobre el Ca ²⁺ intracelular.....	101
4.2.2. Efecto de antagonistas sobre el Ca ²⁺ intracelular.....	106
4.3. Mecanismos intracelulares activados por el ATP.....	109
4.3.1. Origen del Ca ²⁺ intracelular.....	109
4.3.2. Vías de señalización intracelular.....	111
4.4. Modulación de corrientes iónicas por el ATP extracelular.....	114
4.4.1. Efectos del ATP sobre las corrientes del BK _{Ca}	114
4.4.2. Implicación del receptor P2Y ₂	117
4.4.3. Dependencia del Ca ²⁺ intracelular.....	119
4.5. Papel del ATP como mediador autocrino/paracrino.....	123
4.5.1. Liberación de ATP por las células trabeculares	123
4.5.2. Efectos sobre el Ca ²⁺ y regulación por ectonucleotidasas.....	125
4.6. Efecto del ATP sobre la facilidad de evacuación	127
4.7. Expresión de receptores purinérgicos en las células trabeculares.....	130
4.8. Efecto de los dinucleótidos polifosfato en la fisiología trabecular.....	132
4.8.1. Efectos sobre el Ca ²⁺ intracelular.....	132
4.8.1.1. Ap ₃ A.....	132
4.8.1.2. Ap ₄ A.....	134
4.8.1.3. Ap ₅ A.....	134

4.8.1.4. Up ₄ U	135
4.8.2. Efectos sobre la facilidad de evacuación	138
4.9. Caracterización farmacológica del receptor P2Y ₁ en la red trabecular	142
4.9.1. Efectos de la estimulación del receptor P2Y ₁ sobre la [Ca ²⁺] _i	142
4.9.2. Papel del receptor P2Y ₁ sobre la facilidad de evacuación	145
5. DISCUSIÓN.....	151
6. CONCLUSIONES	175
7. REFERENCIAS	179

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1.	Esquema general de la estructura del ojo	5
Fig. 1.2.	Segmento anterior del ojo	6
Fig. 1.3	La red trabecular y el canal de Schlemm	10
Fig. 1.4	Formación y evacuación del humor acuoso	16
Fig. 1.5	Vías de evacuación del humor acuoso	18
Fig. 1.6	Flujo de humor acuoso a través de la red trabecular	20
Fig. 1.7	Vía transcelular a través del endotelio del canal de Schlemm	21
Fig. 1.8	Estructura del ángulo iridocorneal en los glaucomas	27
Fig. 1.9	Efecto del músculo ciliar sobre la facilidad de evacuación	48
Fig. 1.10	Modelo de antagonismo funcional entre la red trabecular y el músculo ciliar	49
Fig. 1.11	Mecanismos iónicos involucrados en la regulación del volumen celular.....	55
Fig. 3.1	Esquema del sistema de registro del Ca^{2+} intracelular	83
Fig. 3.2	Esquema del sistema registros electrofisiológicos	84
Fig. 3.3	Esquema del sistema de registro de la facilidad de evacuación	91
Fig. 4.1	Curva dosis-respuesta para el ATP en las células trabeculares	98
Fig. 4.2	Movilizaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ producidas por el ATP en las células trabeculares bovinas y humanas	98
Fig. 4.3	Movilizaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ producidas por el ATP a distintas concentraciones en las células trabeculares	100
Fig. 4.4	Porcentaje de respuesta de las células trabeculares frente a agonistas purinérgicos	105
Fig. 4.5	Movilizaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ producidas por agonistas purinérgicos en células trabeculares	105
Fig. 4.6	Efecto de antagonistas purinérgicos sobre las movilizaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células trabeculares	108
Fig. 4.7	Efecto de antagonistas purinérgicos sobre el porcentaje de respuesta de las células trabeculares	108
Fig. 4.8	Mecanismos intracelulares de la respuesta al ATP	110
Fig. 4.9	Efecto de la supresión del Ca^{2+} sobre las movilizaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en las células trabeculares	111
Fig. 4.10	Efecto del ATP sobre las corrientes del BK_{Ca} en las células trabeculares	115
Fig. 4.11	Efecto del ATP sobre las corrientes del BK_{Ca} en las células trabeculares II.....	116
Fig. 4.12	Comparación de las corrientes del BK_{Ca} en las células trabeculares bovinas y humanas	117

Fig. 4.13	Efecto de la suramina sobre las corrientes del BK _{Ca} moduladas por ATP en células trabeculares	118
Fig. 4.14	Efecto de la suramina sobre las corrientes del BK _{Ca} en células trabeculares	118
Fig. 4.15	Efecto del BAPTA sobre las corrientes del BK _{Ca} en células trabeculares	120
Fig. 4.16	Efecto del BAPTA sobre las movilizaciones de la [Ca ²⁺] _i producidas por el ATP en las células trabeculares	122
Fig. 4.17	Liberación de ATP frente a estímulos hiposmóticos en las células trabeculares	124
Fig. 4.18	Efecto de la inhibición de las ectonucleotidasas sobre las movilizaciones de la [Ca ²⁺] _i producidas por el estímulos hiposmóticos en las células trabeculares.....	126
Fig. 4.19	Efecto del ATP sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso	128
Fig. 4.20	Expresión de receptores purinérgicos en las células trabeculares	131
Fig. 4.21	Movilizaciones de la [Ca ²⁺] _i producidas por los dinucleótidos polifosfato en las células trabeculares	133
Fig. 4.22	Curva dosis-respuesta para los dinucleótidos polifosfato en las células trabeculares	135
Fig. 4.23	Medida del T ₇₀ para los diferentes nucleótidos polifosfato	136
Fig. 4.24	Efecto de los dinucleótidos polifosfato Ap ₃ A y Ap ₄ A sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso	139
Fig. 4.25	Efecto de los dinucleótidos polifosfato Ap ₅ A y Up ₄ U sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso	140
Fig. 4.26	Movilizaciones de la [Ca ²⁺] _i producidas por agonistas P2Y ₁ en células trabeculares	142
Fig. 4.27	Efecto de antagonistas purinérgicos sobre las movilizaciones de la [Ca ²⁺] _i producidas por la activación del receptor P2Y ₁ en células trabeculares	143
Fig. 4.28	Bloqueo de los efectos del Ap ₄ A sobre la de evacuación del humor acuoso	145
Fig. 4.29	Efecto de agonistas y antagonistas P2Y ₁ sobre la evacuación del humor acuoso	147

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1.	Anticuerpos utilizados.....	92
Tabla 3.2.	Sustancias utilizadas.....	93
Tabla 4.1	Efecto del ATP sobre la $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes concentraciones en las células trabeculares bovinas.....	99
Tabla 4.2	Efecto del ATP sobre la $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes concentraciones en las células trabeculares humanas.....	100
Tabla 4.3	Efecto de agonistas sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en las células trabeculares	104
Tabla 4.4	Efecto de antagonistas sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en las células trabeculares.....	107
Tabla 4.5	Mecanismos intracelulares de los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ en las células trabeculares.....	113
Tabla 4.6	Efectos del ATP sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso	129
Tabla 4.7	Efecto de los dinucleótidos polifosfato sobre la $[Ca^{2+}]_i$ a diferentes concentraciones en las células trabeculares.....	137
Tabla 4.8	Efecto de los dinucleótidos polifosfato sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso.....	141
Tabla 4.9	Efecto de antagonistas y antagonistas P2Y ₁ sobre las movilizaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ en células trabeculares.....	144
Tabla 4.10	Efecto de agonistas y antagonistas P2Y ₁ sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso.....	148