



**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**

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Obtención de muestras biológicas

Para los estudios realizados se trabajó con globos oculares bovinos y humanos. Los ojos bovinos se obtuvieron en el matadero local mientras que los humanos del Instituto Barraquer, procedentes de donantes. Tras la enucleación fueron sumergidos en solución salina fisiológica sin calcio ni magnesio (Sigma, Madrid) con 100 U.I./ml penicilina (Sigma, Madrid), 100 Δ g/ml estreptomicina (Sigma, Madrid) y 2.5 Δ g/ml anfotericina B (Sigma, Madrid) y mantenidos a 4°C durante el transporte. El tiempo transcurrido entre la enucleación y la disección fue de entre 1 y 1.5 horas.

3.2. Disección del tejido

La disección del ojo se realizó en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo horizontal Micro-H (Telstar, Barcelona) con material esterilizado con etanol y llama.

En primer lugar se eliminaron las estructuras accesorias del globo ocular (grasa, músculos, conjuntiva, etc). Una vez limpios, los globos oculares se sumergieron en etanol 70° durante 1 minuto para su desinfección y seguidamente se hicieron dos lavados de un minuto en PBS. Con un bisturí se realizó un corte ecuatorial que sirvió como punto de inserción para introducir las tijeras y proceder a la separación del polo anterior del posterior. Este último fue descartado.

Con ayuda de unas pinzas fueron eliminadas las estructuras de la parte anterior del ojo (iris, cristalino, cuerpo ciliar y restos de humor vítreo) quedando un segmento anterior formado por la córnea, parte de la esclera, red trabecular y restos del cuerpo ciliar. De la misma manera se retiraron los restos del ligamento pectinado en el caso de los ojos bovinos (de color oscuro) que recorre, próximo al iris, la parte interior de la red trabecular (estructura más blanca y esponjosa). Con la ayuda de un bisturí se realizó una incisión circular con un ángulo de 30° por la línea de Schwalbe's, seguida de otra incisión con la misma inclinación en la parte límite de la red trabecular con el espolón escleral. De esta forma se obtuvieron secciones de tejido formadas exclusivamente por red trabecular.

3.3. Cultivos primarios de células trabeculares

El cultivo primario se llevó a cabo en una campana de flujo vertical TCA48 (Gelaire, Italia). La realización de cultivos primarios de células trabeculares a partir de ojos bovinos y humanos se llevó a cabo básicamente mediante la técnica descrita en la literatura (Stamer, 1995b) con ligeras modificaciones en el tiempo de digestión y en la concentración de enzima utilizado para la disgregación del tejido.

Tras la disección del tejido se obtuvieron pequeñas tiras de red trabecular. Dichas tiras fueron sometidas a tres lavados de 10 minutos a 4°C en PBS sin calcio ni magnesio con 100 U.I./ml penicilina, 100 Δ g/ml estreptomicina y 2.5 Δ g/ml anfotericina B.

Una vez finalizados los lavados se procedió a la digestión enzimática de las tiras de tejido con 1.25 mg/ml colagenasa tipo IA (Sigma, Madrid) y 0.5 mg/ml albúmina sérica bovina (Sigma, Madrid) en un volumen final de PBS con calcio y magnesio (Sigma, Madrid) de 4 ml durante 1.5 horas a 37°C. A continuación se procedió a una digestión mecánica. Para ello se utilizaron pipetas pasteur de vidrio previamente siliconadas con Sigmacote (Sigma, Madrid) que disponían de puntas de diferentes calibres.

La digestión enzimática se detuvo añadiendo una solución a 4°C de 10 mg/ml de albúmina sérica bovina en PBS con calcio y magnesio. La solución fue centrifugada durante 10 minutos a 1000 r.p.m. con una centrifuga 5702 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y tras descartar el sobrenadante se procedió a resuspender el pellet. La resuspensión se realizó en Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma, Madrid) con un 10 % de suero fetal bovino (FBS; Sigma, Madrid), 100 U.I./ml penicilina, 100 Δ g/ml estreptomicina, 2.5 Δ g/ml anfotericina B y 100 mg/ml L-glutamina (Sigma, Madrid). La resuspensión fue sembrada en frascos de cultivo celular de 25 ml Nunclon Surface (Nunc, Dinamarca) en los cuales no se realizó ningún tratamiento adicional para favorecer la adherencia. La densidad de siembra fue de entre 200,000 y 400,000 células por ml y se midió mediante un hemacitómetro de Neubauer (Sigma, St. Louis).

Los cultivos fueron mantenidos en un incubador 4000628 (P-Selecta, Barcelona) a 37°C y 5% CO₂ y en condiciones de humedad. El medio de cultivo de las células, de composición idéntica al utilizado en la resuspensión, se cambió cada 2-3 días.

El crecimiento celular se observó a los 2-4 días de la siembra, alcanzando las células la confluencia a los 12-15 días. Los distintos pases celulares se llevaron a cabo usando Tripsina–EDTA (Sigma, Madrid). Células procedentes de los pases primero a tercero fueron utilizadas para los registros electrofisiológicos, medidas de calcio intracelular y de liberación de ATP.

3.4. Registros del calcio intracelular

Para los experimentos de medida del calcio intracelular se utilizaron células procedentes de cultivos primarios que fueron sembradas en cubreobjetos redondos de 25 mm de diámetro (VWR Scientific Inc.; Philadelphia, PA) a baja densidad y se dejaron crecer entre 72 y 96 horas. El motivo por el cual se dejó transcurrir este espacio de tiempo entre la siembra y los experimentos fue doble. Por un lado, tras este periodo las células presentaban un grado de confluencia óptimo para la realización de los experimentos. En segundo lugar, se permitía a las células expresar de nuevo aquellos receptores de membrana que pudieran haber sido destruidos durante el proceso de tripsinización.

Previamente a los experimentos, los cubreobjetos se lavaron con solución tamponada: 122 mM NaCl, 4.74 mM KCl, 1.18 mM KH_2PO_4 , 1.18 mM MgSO_4 , 5 mM NaHCO_3 , 10 mM HEPES, 10 mM Glucosa, 2 mM CaCl_2 y 0.01% BSA a pH 7.4 y osmolaridad 295 mOsm/Kg, tres veces para eliminar los restos de medio y suero y posteriormente se incubaron las células en la misma solución tamponada a 37°C durante 45 minutos en agitación suave con Fura-2 acetoximetilester (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) a una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ procedente de una solución madre de 5 mg/ml disuelta en DMSO (Sigma, Madrid).

Tras el periodo de incubación se realizaron dos lavados con solución tamponada para eliminar el exceso de Fura-2 no incorporado por las células y se procedió a montar el cubreobjetos en una cámara abierta de 1 ml de capacidad para la realización de los registros que fue situada sobre una placa termostaticada que mantenía una temperatura constante de 37°C durante todo el experimento. La placa se montó en un microscopio invertido de epifluorescencia Diaphot 300 (Nikon, Tokio, Japan) y se utilizó para los experimentos un objetivo de inmersión UV-F20 (20x) (Nikon, Tokio, Japan).

Las imágenes de fluorescencia fueron captadas por una cámara CCD CH250 (Photometrics, Tucson, AZ) y almacenadas en un ordenador Apple Macintosh 840AV (Apple Inc, Cupertino, CA) dónde posteriormente se realizó el análisis de los datos.

Las células se dejaron estabilizar durante 10 minutos antes de la monitorización. Transcurrido este tiempo la muestra fue excitada a las longitudes de onda (Ω) de 340 y 380 nm (filtro de excitación de ancho de banda de 10 nm) a una frecuencia de 0.25 Hz durante un máximo de 15 minutos. Se obtuvieron pares de imágenes a cada una de las longitudes de las Ω . El tiempo de exposición de las células fue de 100 ms por imagen. De esta forma se excitaron las formas unidas y libres de calcio del Fura-2 respectivamente. La Ω de emisión del Fura-2 de 510 nm fue filtrada por un filtro de emisión de 120 nm y la señal de fluorescencia captada por la cámara. Los píxeles individuales fueron convertidos a superpixels 2x2 en la salida de la CCD cámara para mejorar el ruido de la señal.

Los cálculos del calcio intracelular se realizaron sobre cada una de las células individuales a partir de la relación de los valores de fluorescencia obtenidos a las Ω de 340 y 380 nm (F_{340} / F_{380}), los valores de fluorescencia máxima y mínima del Fura-2 calculados en condiciones saturantes de calcio (5 mM) y cero calcio (10 mM EGTA) respectivamente y la constante de disociación ($K_d = 224$ nM) para el Fura-2 (Grynkiewicz, 1985). En los experimentos se midió el calcio intracelular en condiciones basales durante 1 minuto. Tras la aplicación de la sustancia se monitorizó hasta un tiempo máximo de 15 minutos. Los aumentos de calcio intracelular se consideraron significativos cuando el incremento fue superior al 100% de los niveles basales de calcio que presentaban las células.

Con los resultados de estos experimentos se evaluó el porcentaje de respuesta frente a diferentes sustancias, la amplitud de los incrementos de calcio intracelular y las características de dichos incrementos así como la ausencia o presencia de diferentes oscilaciones en los niveles de calcio intracelular. Un parámetro en particular que se estudió fue el T_{70} , que representa el tiempo transcurrido entre el máximo incremento de calcio y el momento en el que los valores de incremento de calcio disminuyen un 70%.

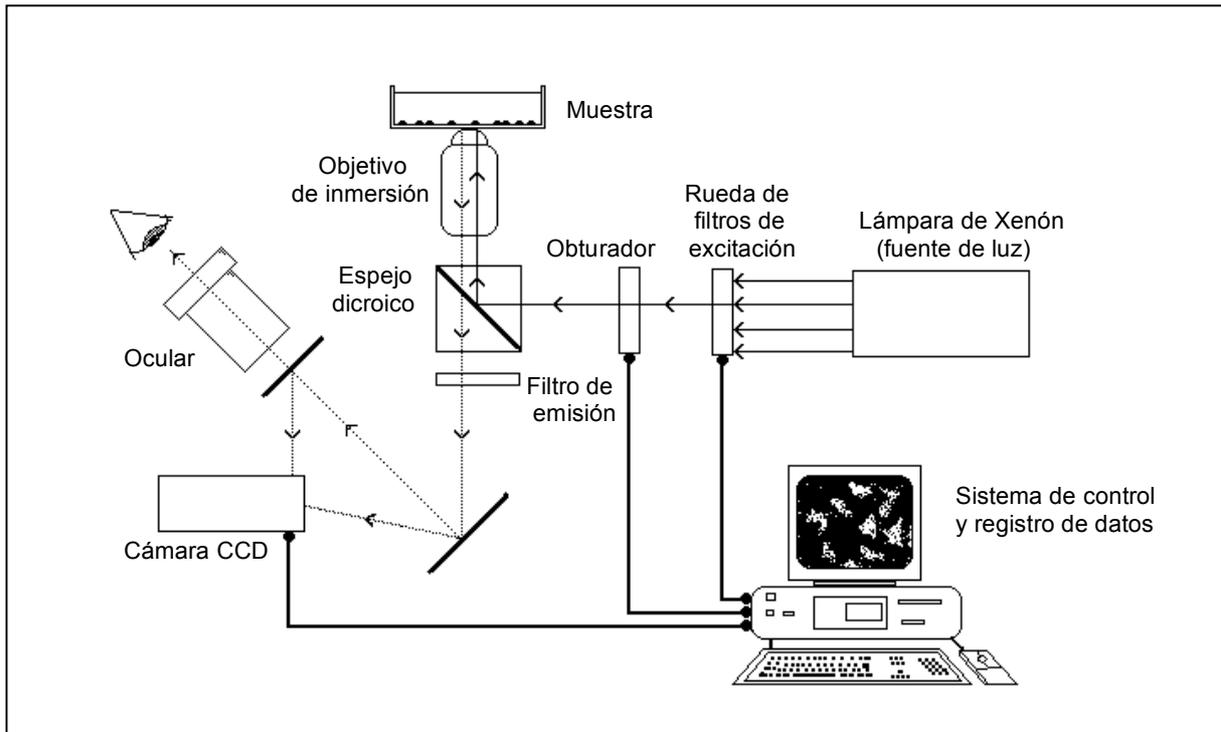


Figura 3.1. Esquema del sistema de registro de las $[Ca^{2+}]_i$.

3.5. Registros electrofisiológicos

Para los registros electrofisiológicos se sembraron células en pequeños trozos de cubreobjetos entre 48-72 horas previas a los experimentos. Los cubres se transfirieron a una cámara abierta de 0.2 ml de capacidad que se situó sobre la placa de un microscopio invertido Diaphot (Nikon, Tokio, Japan) donde se realizaron los registros a temperatura ambiente de 26°C en sesiones de 1 a 1.5 horas. Las soluciones extracelulares se aplicaron al baño mediante un sistema de perfusión por gravedad a una velocidad de 3 ml por minuto.

Las corrientes de membrana se midieron en condiciones de fijación de voltaje, usando la técnica de *patch-clamp* descrita por Hamill (Hamill, 1981) y usando la configuración de *whole-cell* con parche perforado (Falke, 1989).

Las micropipetas se fabricaron a partir de capilares de borosilicato de 1.5 mm y 0.86 mm de diámetro externo e interno respectivamente (Harvard Apparatus, Kent, U.K.)

mediante un estirador de pipetas horizontal P-97 (Sutter Instruments, Novato, CA) y tuvieron una resistencia de entre 3 y 6 M Ω . En el baño se utilizó un electrodo de Ag/AgCl.

Las corrientes macroscópicas se registraron mediante un amplificador de *patch-clamp* L/M-EPC7 (Heka, Alemania) a una velocidad de adquisición de 4 KHz. La adquisición de datos y el control de los parámetros utilizados se realizaron con el software WinWCP 3.2 (John Dempster, University of Strathclyde, U.K.) y se utilizó un interface CED1401 (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, U.K.).

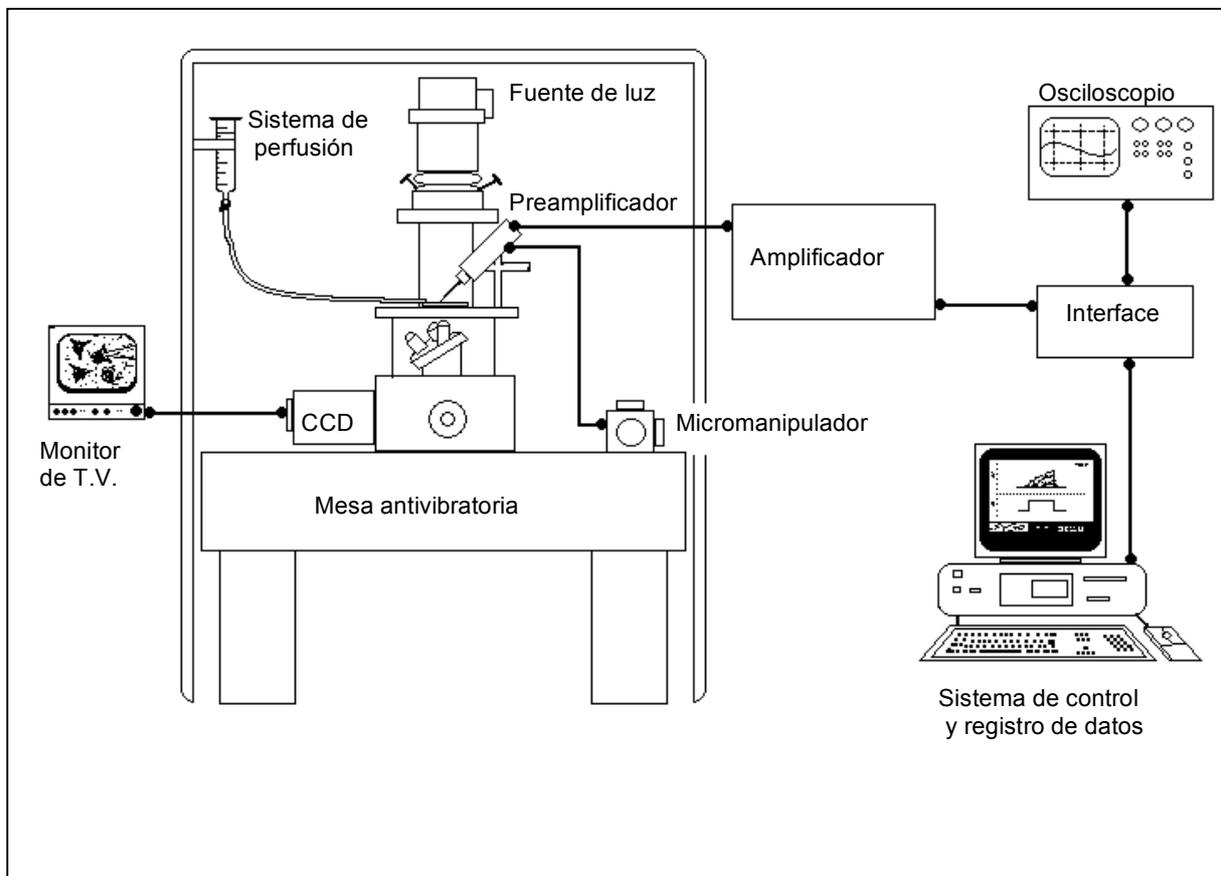


Figura 3.2. Esquema del sistema de registro electrofisiológico.

Antes del inicio de los registros el medio fue sustituido por solución fisiológica de registro: 140 mM NaCl, 4.3 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES a pH 7.4 ajustado con NaOH y 301.5 mOsm/Kg.

La solución intracelular utilizada fue: 100 mM K-acetato, 40 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1.38 mM EGTA, 10 mM Hepes a pH 7.2 ajustado con KOH en la cual se había disuelto el ionóforo nistatina (150 µg/ml; Sigma, Madrid). La solución con nistatina se preparó fresca antes de cada registro a partir de una solución madre de 50 mg/ml en DMSO y se sonicó con un sonicador Franke en631 1/4 (P-Selecta, Barcelona) antes de su utilización para disolverla completamente. La punta de las micropipetas fue introducida durante 2 segundos en esta solución intracelular sin nistatina para evitar la interferencia del ionóforo en la unión de la pipeta con la membrana. A continuación las micropipetas se rellenaron por la parte posterior con solución intracelular con nistatina.

Tras alcanzar un sello de alta resistencia (Gigasello) entre la pipeta y la membrana de la célula se neutralizó el transiente capacitativo de la pipeta. Se esperó un periodo de tiempo de entre 5 y 10 minutos durante el cual se permitía a la nistatina difundir hasta la punta del electrodo y producir su efecto. Se controló la resistencia de acceso hasta que los transientes lentos capacitativos indicaban el establecimiento de la configuración de *whole-cell* en parche perforado. Durante todo el experimento se controló la resistencia en serie para evitar variaciones repentinas en este parámetro, lo cual indicaría la rotura de la membrana y el establecimiento de una configuración de *whole-cell*. Sólo se consideraron válidas para el análisis aquellas células en las cuales la resistencia en serie fue constante durante todo el experimento.

El voltaje de las células se fijó a -60 mV y se aplicó un protocolo de pulsos de 20 mV desde -80 mV hasta +100 mV para estimular las corrientes de potasio. Se utilizó un protocolo de substracción de corriente P/N donde N era -4 antes de la aplicación de cada pulso despolarizante para eliminar la corriente de *leak* así como la corriente residual capacitativa.

3.6. Medidas de la liberación de ATP

Para las medidas de la liberación de ATP se sembraron células en placas de petri de poliestireno redondas de 35 mm de diámetro (Iwaki, Japan) entre 48 y 72 horas antes de la realización del experimento.

Tras este periodo se lavaron las células con tampón fisiológico de registro (140 mM NaCl, 4.3 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES y 10 mM Glucosa a pH 7.4

ajustado con NaOH y osmolaridad 291 ± 2.9 mOsm/Kg) en tres ocasiones para eliminar los restos de medio y suero.

Debido a que los lavados pueden producir una liberación de ATP por el movimiento de líquido sobre la membrana (*shear stress*) en diferentes tipos celulares (Grierson, 1995), las células se dejaron reposar durante 30 minutos antes del experimento. De esta forma se permitía que los valores de ATP extracelular retornaran a sus niveles basales evitando lecturas erróneas.

Para la detección de ATP se utilizó el ensayo de la luciferina luciferasa en el cual una molécula de D-luciferina se oxida a la forma de oxiluciferina utilizando el enzima luciferasa y el ATP como coenzimas y produciendo en dicha reacción un fotón a la Ω de 560 nm. La luz producida de esta forma es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente.

Para la preparación de los reactivos se utilizó un vial de extracto de luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* (Sigma, Madrid) que fue diluido en 1 ml de solución fisiológica o agua destilada y enriquecida con 5 mg/ml D-luciferina (Sigma, Madrid). La suspensión resultante fue centrifugada durante 30 segundos en una centrifuga 5417R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y el sobrenadante resultante se hizo pasar por una columna de cromatografía con bolas de acrilamida con límite de exclusión de 6,000 daltons de 10 ml 10 DG Bio-Rad (Hercules, California) equilibrada con solución de registro.

Sobre un volumen de solución fisiológica en la placa de petri se añadió un volumen de agua para conseguir la hipotonicidad deseada. Las soluciones resultantes hipotónicas del 20% y 40% tenían una osmolaridad de 242 ± 2 y 206 ± 2 mOsm/Kg (Media \pm desviación estándar) respectivamente. Tanto la solución fisiológica como el agua añadida para provocar hiposmolaridad tenían la misma cantidad de los reactivos necesarios para la detección del ATP.

Las medidas se realizaron a temperatura ambiente (22°C) y sobre las placas se situó un tubo fotomultiplicador R464 (Hamamatsu, Japan) conectado a un amplificador EPC-9 (Heka, Lambrecht, Germany) y utilizando el software de registro X-Chart (Heka, Lambrecht, Germany). La señal resultante se filtró a 1 kHz.

Antes y después de los experimentos se midió la actividad del enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) presente en el medio extracelular mediante un método enzimático estándar (Vassault, 1981) para comprobar que la adición de agua a la camarita no hubiera provocado una lisis de las células debido a un excesivo *swelling* de las mismas. Se puso 100 μ l de muestra procedente del medio extracelular con una mezcla de reacción compuesta por Tris 80 mM, NaCl 200 mM, NADH 0.2 mM y piruvato 1.6 mM y se midió la absorbancia del NADH⁺ a 340 nm mediante un espectrofotómetro DV 640 (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

Para la calibración se realizó una recta patrón añadiendo dosis conocidas de ATP (1, 3, 4, 6 pmol) a las soluciones isotónica e hipotónicas. A pesar de que existe una diferencia en la fuerza iónica entre las soluciones isotónicas e hipotónicas utilizadas, lo cual podría influir en la reacción de la luciferina luciferasa, no se encontraron diferencias entre las curvas de calibración en el rango de 1 a 6 pmol de ATP.

3.7. Inmunocitoquímica y Western Blot

3.7.1. Inmunocitoquímica

Para los estudios de inmunocitoquímica se utilizaron células trabeculares procedentes de los pases primero a tercero y resembradas en cubreobjetos redondos de 25 mm de diámetro (VWR Scientific Inc.; Philadelphia, PA) tratados con poly-L-Lisina (Sigma, Madrid). La siembra se realizó a baja densidad y se dejaron crecer entre 72 y 96 horas para permitir a las células expresar de nuevo receptores de membrana que pudieran haber resultado dañados durante la tripsinización.

Transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados de 5 minutos a temperatura ambiente de las células en PBS con Ca²⁺ y Mg²⁺. Para el proceso de fijación de las células se trataron los cubreobjetos con paraformaldehído al 4% (peso/volumen) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después del periodo de fijación se realizaron 2 lavados más en las mismas condiciones que las previas a la fijación. Se permeabilizaron las células en una solución en PBS al 0.1% de saponina y 1% BSA durante 15 minutos.

Las células se incubaron *overnight* a temperatura ambiente en PBS con 1% de BSA y anticuerpo primario anti-P2Y (Alomone Labs, Israel). Las diluciones de los

anticuerpos primarios fueron: anti-P2Y₁, 1/200; anti-P2Y₂, 1/500; anti-P2Y₄, 1/500; anti-P2Y₆, 1/200; anti-P2Y₁₁, 1/1000. Transcurrida la incubación con el anticuerpo primario se realizaron tres lavados en PBS con el 3% de BSA y se incubó durante 1 hora con un anticuerpo secundario diluido también en una solución de PBS/BSA. Este anticuerpo anti IgG contra conejo, procedente de cabra y conjugado con rodamina (TRITC) (Sigma, Madrid), fue utilizado a una concentración final de 40 µg/ml. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS y seguidamente se procedió al montaje en portaobjetos con Mowiol (Calbiochem, Germany). Los controles se realizaron siguiendo los mismos procedimientos pero sustituyendo el anticuerpo primario por un volumen igual de solución de PBS/BSA.

Las células se analizaron mediante microscopía confocal con un microscopio Zeiss Axiovert 200M equipado con un módulo confocal LSM 5 Pascal (Zeiss, Germany). La observación de las células trabeculares se realizó con un objetivo de inmersión en aceite Zeiss 63X con una apertura numérica de 1.40. El TRICT fue monitorizado mediante excitación a la longitud de onda de 543 nm. La imagen de contraste diferencial de interferencia (DIC Nomarski) se realizó con el mismo objetivo 63X y se pasó por los correspondientes polarizadores y analizadores. Todas las imágenes se trataron y analizaron con el software LSM 5 Pascal.

3.7.2. Western Blot

Para los análisis de western blot, las células trabeculares fueron homogeneizadas con tampón de lisis (50 mM HEPES pH 7.5, tritón al 2.5% (peso/volumen), 10 mM EDTA, 0.2mM PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) y 5 µg/ml leupeptina). Tras la homogenización, se realizó una cuantificación de proteínas mediante el método Bradford. Muestras de proteínas de 40 µg se separaron mediante SDS-PAGE en un gel al 10% de acrilamida utilizando el sistema Bio-Rad Mini-Protein® 3-Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que posteriormente fue lavada con PBS y bloqueada durante 1 hora a temperatura ambiente con un 5% (peso/volumen) de leche en polvo en PBS. A continuación se incubó a 4°C *overnight* con los anticuerpos primarios en una solución de PBS con un 5% de leche en polvo y 0.5% (volumen) de detergente Tween 20. Las diluciones de los anticuerpos primarios fueron las siguientes: anti-P2Y₁, 1/200; anti-P2Y₂, 1/500; anti-P2Y₄, 1/200; anti-P2Y₆, 1/200; anti-P2Y₁₁, 1/1000. El anticuerpo primario se extrajo y se lavaron las membranas con PBS/Tween 20. Seguidamente se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo

secundario fabricado en ratón, un anti IgG contra conejo acoplado al enzima peroxidasa de rábano (Sigma, Madrid) a una dilución 1/1000 en PBS/Tween con un 5% de leche en polvo. Tras quitar el anticuerpo secundario las membranas se lavaron abundantemente y fueron reveladas mediante un sistema de detección quimioluminiscente (Amersham).

3.8. Perfusión de segmentos anteriores *in vitro*

Para los experimentos de perfusión a presión constante se utilizó la técnica descrita por Erickson-Lamy (Erickson-Lamy, 1988) y modificada posteriormente en nuestro laboratorio (Gual, 1997). En esta técnica se perfunden segmentos anteriores de ojo a presión constante en condición de cultivo de órganos con medio de cultivo y se mide la facilidad de evacuación a través de la vía convencional.

Se utilizaron ojos de ternera de 3 a 6 meses de edad procedentes del matadero local. Desde la muerte del animal a la enucleación transcurrió un tiempo de entre 0.5 y 2 horas y los ojos fueron mantenidos en tampón salino (PBS) a 4°C durante el proceso de transporte, que nunca fue superior a 1.5 horas.

En primer lugar se diseccionaron los ojos para obtener los segmentos anteriores que se colocaron y fijaron en una cámara de perfusión fabricada en plexiglas (polimetil metacrilato) especialmente diseñada mediante un anillo que ejercía presión por debajo del limbo esclerocorneal, permitiendo de esta manera la evacuación de medio únicamente por la vía trabecular.

La cámara de perfusión está diseñada de manera que los segmentos anteriores bovinos encajan perfectamente sin existir distorsiones en la posición de la esclera. La cámara está abierta por dos conductos de pequeño calibre situados en la base que mediante un sistema de tubos de polietileno que permiten la difusión de gases (O₂ y CO₂) a su través se ensamblan a un reservorio de medio y a un transductor de presión respectivamente. El espacio comprendido entre la cámara y el segmento anterior semeja la cámara anterior del ojo y permite un volumen de 1.8 ml de medio aproximadamente.

El reservorio de medio de perfusión está situado a cierta altura para mantener dentro del segmento anterior una presión de aproximadamente 10 mm Hg durante todo el experimento. Este reservorio de medio se encuentra acoplado a un transductor de fuerza

(Letica, Barcelona), el cual se conecta a un amplificador AMP 016/2 (Letica, Barcelona). Mediante una *interface* LE60-100 L/4 (Letica, Barcelona), el amplificador se conecta a un ordenador IBM-PC, que utiliza un software especial diseñado por Letica para la obtención de los datos. De esta manera se controla el volumen de medio que entra en el ojo, que será directamente proporcional a la disminución de peso del reservorio de medio.

Por otro lado, la cámara de perfusión donde se encuentra el segmento anterior, también se halla conectada a un transductor de presión (Maxxim Medical, Athens, TX, USA) que mide a lo largo del tiempo la presión en el interior de la cámara.

Los segmentos anteriores fueron perfundidos con Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) con 5 mg/ml glucosa, 50 IU/ml penicilina, 50 μ g/ml estreptomicina, 5 μ g/ml anfotericina B y 10 mM HEPES a 300 mOsm/Kg y pH 7.4 que fue preparado en condiciones estériles. Los experimentos se realizaron dentro de un incubador (P-Selecta, 4000602, Barcelona) a 37°C, 5% de CO₂.

El parámetro estudiado en estos experimentos fue la Facilidad de evacuación (C). Los valores obtenidos de flujo de evacuación (μ l /minuto) en un espacio de tiempo concreto fueron corregidos con los valores de presión en dicho periodo obteniendo valores de facilidad de evacuación (C) (μ l/min/mmHg). La facilidad de evacuación se obtuvo como un valor medio de las facilidades en periodos de 15 minutos haciendo el promedio de 180 puntos.

La facilidad basal (C_0) se calculó durante los primeros 90 minutos de perfusión, descartando aquellos ojos cuya facilidad no fuera estable durante este periodo de tiempo. Los criterios utilizados fueron que los valores de facilidad dentro de los primeros 90 minutos se situasen en un rango de entre 0.4 y 1.3 μ l/min/mmHg. y no variasen más de un 10%.

Cuando se añadía una droga al medio de perfusión, todo el sistema de tubos y la cámara anterior artificial se vaciaba y se rellenaba con el nuevo medio. Esto se hacía abriendo la aguja de salida de la camarita y permitiendo el paso de un volumen mayor del 200% (5 ml). Este cambio de medio se realizaba siempre a una presión inferior a 10 mm de Hg. Tras cerrar el circuito de nuevo, se esperaba un periodo de entre 5 y 10 minutos para empezar a monitorizar hasta que el flujo de evacuación se reestablecía.

El protocolo utilizado para los experimentos constaba de tres periodos: perfusión control con DMEM (300 mOsm/Kg), que comenzaba tras la estabilización de la facilidad, durante 90 minutos para establecer la C_0 , perfusión durante 90 minutos con droga para determinar los cambios en la facilidad de evacuación y 90 minutos de perfusión sin droga con DMEM (300 mOsm/Kg) en lo que se denomina periodo de retorno.

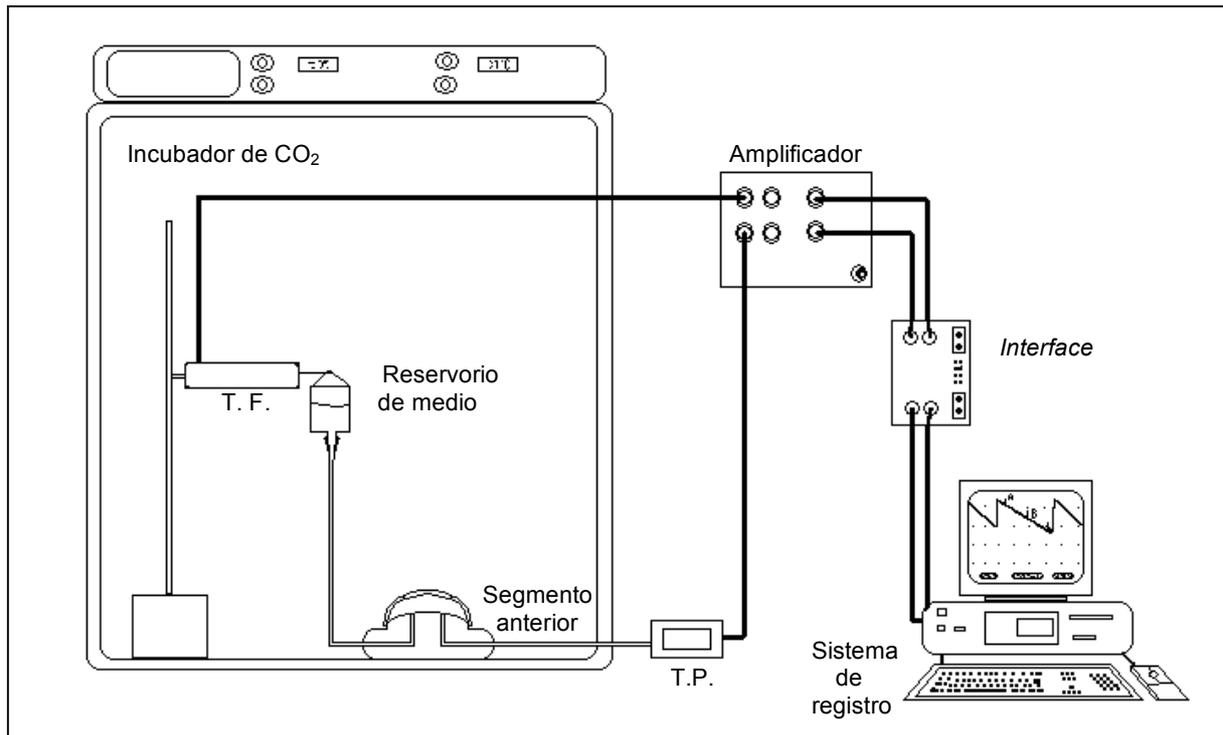


Figura 3.3. Sistema de registro de la facilidad de evacuación en segmentos anteriores bovinos. T.F.= transductor de fuerza (o peso); T.P.= transductor de presión.

3.9. Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando diferentes tests estadísticos.

En los experimentos de registro del calcio intracelular se utilizó la *t* de Student desapareada y el test de Fisher para la comparación entre dos grupos distintos. En los experimentos de liberación de ATP se usó la *t* de Student. En todos los casos las diferencias significativas se establecieron en $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (**).

En el caso del análisis de la facilidad en los experimentos de perfusión de segmentos anteriores y en el análisis de los registros electrofisiológicos se utilizó un test de análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas cuando se comparó con el periodo basal o un test de ANOVA estándar para la comparación respecto al grupo control a los cuales se les aplicó la corrección de Bonferroni para la comparación de puntos homólogos en protocolos distintos. Las diferencias significativas se establecieron en $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***)).

Tabla 3.1. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Sistema de detección	Diluciones utilizadas		Referencia	Obtención
		Inmuno	Western		
<i>Anticuerpos primarios</i>					
Anti-P2Y ₁	-	1/200	1/200	APR-009	Alomone Labs
Anti-P2Y ₂	-	1/500	1/500	APR-010	Alomone Labs
Anti-P2Y ₄	-	1/500	1/200	APR-006	Alomone Labs
Anti-P2Y ₆	-	1/200	1/200	APR-011	Alomone Labs
Anti-P2Y ₁₁	-	1/1000	1/1000	APR-015	Alomone Labs
<i>Anticuerpos secundarios</i>					
Anti-rabbit IgG de cabra	Rodamina (TRICT)	40 µg/ml	-	T-5268	Sigma Co.
Anti-rabbit IgG de ratón	Peroxidasa de rábano	-	1/1000	A-2074	Sigma Co.

Tabla 3.2. Sustancias utilizadas

Sustancia	Acción	Concentraciones usadas	Referencia	Obtención
<i>Fármacos agonistas</i>				
2-methylthio ADP	P2Y ₁	10 ⁻⁶ M	M-152	Sigma Co.
2-methylthio ATP	P2 no selectivo	10 ⁻⁶ M	A-023	Sigma Co.
Ω,Ω-methylene ATP	P2X	10 ⁻⁶ M	M-6517	Sigma Co.
ADP	P2Y ₁ / P2Y _{ADP}	10 ⁻⁶ M	A-6646	Sigma Co.
Ap ₃ A	P2 no selectivo	10 ⁻⁸ M - 10 ⁻³ M	D-1387	Sigma Co.
Ap ₄ A	P2 no selectivo	10 ⁻⁹ M - 10 ⁻³ M	D-1262	Sigma Co.
Ap ₅ A	P2 no selectivo	10 ⁻⁷ M - 10 ⁻³ M	D-6392	Sigma Co.
ATP	P2 no selectivo	10 ⁻¹³ M - 10 ⁻⁴ M	A-2383	Sigma Co.
ATP-ΩS	P2 no selectivo	10 ⁻⁶ M	A-1388	Sigma Co.
Ω,Ωmethylene ATP	P2X	10 ⁻⁶ M	M-7510	Sigma Co.
UDP	P2Y ₆	10 ⁻⁶ M	U-4125	Sigma Co.
Up ₄ U	P2Y ₂ / P2Y ₄	10 ⁻⁹ M - 10 ⁻⁴ M	-	Inspire Phar.
UTP	P2Y ₂ / P2Y ₄	10 ⁻⁶ M	U-6625	Sigma Co.
<i>Fármacos antagonistas</i>				
PPADS	P2 no selectivo	10 ⁻⁵ M	529620	Calbiochem
MRS2179	P2Y ₁	10 ⁻⁵ M	M-3808	Sigma Co.
Suramina	P2 no selectivo	10 ⁻⁴ M	S-2671	Sigma Co.
<i>Mediadores intracelulares</i>				
Ácido Ciclopiazónico	Inhibidor receptor IP ₃ Inhibidor receptor	10 ⁻⁶ M	C-1530	Sigma Co.
Rianodina	rianodina	10 ⁻⁶ M	R-6017	Sigma Co.
Tapsigargina	Inhibidor CaATPasa	10 ⁻⁶ M	T-9033	Sigma Co.
U73122	Inhibidor PLCΩ	10 ⁻⁶ M	U-6756	Sigma Co.
<i>Otras sustancias</i>				
ARL 67156	Inhibidor ectoATPasas	10 ⁻⁴ M	A-256	Sigma Co.
Bapta AM	Quelante de calcio	5 x 10 ⁻⁶ M	A-1076	Sigma Co.
D-luciferasa	Sustrato enzimático	5 mg / ml	L-6882	Sigma Co.
DMSO	Solvente orgánico	-	D-2650	Sigma Co.
Etanol	Solvente orgánico	-	983	Merck
Extracto de luciferina	Enzima	-	FLE-50	Sigma Co.
Fura-2 AM	Fluorocromo	5 x 10 ⁻⁶ M	F-1221	Mol. Probes
Nistatina	Ionóforo	150 µg / ml	N-4014	Sigma Co.