



**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**

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Durante mucho tiempo se ha considerado a la red trabecular como una estructura de carácter pasivo que actuaba simplemente como filtro, sin participar activamente en la modulación del paso del humor acuoso. Sin embargo, en los últimos años se han encontrado multitud de evidencias funcionales que demuestran que la red trabecular posee un papel activo en la dinámica de evacuación del humor acuoso (Llobet, 2003). Así pues, ya que esta estructura es importante en el drenaje del humor acuoso, el mal funcionamiento de la red trabecular o de las vías de evacuación en general puede desembocar en la acumulación de humor acuoso dentro de las cámaras oculares y en un aumento de la presión intraocular (IOP). Este aumento de la IOP supone un factor de riesgo muy elevado para el desarrollo de la patología del glaucoma (Kass, 1980). Dentro de los diferentes tipos de glaucoma existentes, los glaucomas primarios de ángulo abierto (POAG) suponen la forma más común (Sarfarazi, 1997). En ellos, a diferencia de otros glaucomas, las vías de evacuación no se encuentran obstruidas y la morfología del ángulo iridocorneal es normal. Sin embargo, la funcionalidad de la red trabecular parece estar de alguna manera alterada.

Mecanismos de regulación de la red trabecular

Hoy en día, todavía se desconocen los mecanismos exactos mediante los cuales la red trabecular modula el paso del humor acuoso a su través, pero está claro que las características funcionales de la red trabecular vienen determinadas por las propiedades de las células que la conforman juntamente con las interacciones de éstas con la matriz extracelular. En estos últimos años han sido numerosos los estudios realizados, tanto en cultivos celulares como sobre el tejido trabecular, encaminados a entender el funcionamiento de la red trabecular. Son varios los mecanismos que se han estudiado como candidatos a regular la función trabecular: contracción/relajación del tejido trabecular y del músculo ciliar, regulación del volumen celular o regulación de la matriz extracelular entre otros (Wiederholt, 2000; Mitchell, 2002; Borrás, 2003).

Las propiedades contráctiles de la red trabecular vienen establecidas por las células que la conforman. Se han descrito al menos dos tipos de células en la red trabecular con distintas características: un primer tipo de carácter endotelial y un segundo

tipo con características musculares (Coroneo, 1991). Estas células de tipo muscular poseen las isoformas de la miosina y la Ω -actina de la musculatura lisa (de Kater, 1990; de Kater, 1992), lo cual les conferiría características contráctiles semejantes a las que poseen las células musculares lisas y les permitiría la modulación del drenaje del humor acuoso mediante la contracción y relajación de la red trabecular (Wiederholt, 1998; Wiederholt, 2000). La matriz extracelular que conforma junto con las células la red trabecular, también es importante en la función de la estructura. Existe un balance entre la síntesis y la degradación de esta matriz extracelular, el cual viene también determinado por las propiedades de las mismas células trabeculares (Borrás, 2003). Cambios en la composición de la matriz pueden afectar a la facilidad de evacuación (Lütjen-Drecoll, 1986). La forma de las células también juega un papel importante en la regulación del paso del humor acuoso, ya que factores que producen alteraciones en el citoesqueleto de actina, y por tanto en la forma de las células localizadas en las vías de drenaje, provocan variaciones en la facilidad de evacuación (Tian, 2000; Tumminia, 1998). Asimismo, el volumen de las células trabeculares y la capacidad de regulación del propio volumen influyen de manera importante en la permeabilidad de la red trabecular (Gual, 1997; Al-Aswad, 1999). Otros factores parecen modular también la función trabecular como por ejemplo el *stretch* (Gasull, 2003), la expresión diferencial de genes (Borrás, 2003) o la formación de poros en la pared interna del canal de Schlemm (Johnson, 2002).

Existen muchos estudios en los que se ha demostrado que todos estos mecanismos están involucrados en mayor o menor medida en la función de la red trabecular y que el mal funcionamiento o la desregulación de algunos de ellos se correlacionan con disminuciones en la facilidad de evacuación, aumentos de la IOP o incluso con la fisiopatología del glaucoma (Alvarado, 1984; Borrás, 2003; Grierson, 1997; Li, 2004; Lütjen-Drecoll 1986; Lütjen-Drecoll, 1989; Putney 1999b). Cuanto mayor conocimiento se posea de la fisiología de la red trabecular y los mecanismos que gobiernan el paso del humor acuoso, mayores serán las perspectivas de encontrar dianas farmacológicas específicas para el tratamiento del glaucoma.

En este trabajo se ha estudiado la existencia de receptores purinérgicos y los efectos de su estimulación por el ATP u otros agonistas sobre las células trabeculares, así como sus efectos sobre la modulación de la facilidad de evacuación. Son varios los motivos por los cuales se ha estudiado este aspecto de la función trabecular. En primer lugar, en el humor acuoso se ha descrito la presencia tanto de ATP como de otros nucleótidos como el ADP, el AMP o la adenosina (Howard, 1998; Pintor, 2003a), además

de ciertos dinucleótidos polifosfato, como el Ap₄A y el Ap₅A (Pintor, 2003a). En segundo lugar, se ha demostrado que tanto los nucleótidos como los dinucleótidos producen importantes efectos sobre la IOP (Pintor, 2001; Pintor, 2003a). El ATP presente en el humor acuoso puede ejercer acciones sobre la red trabecular, modulando de alguna manera su función en el filtrado de humor acuoso ya que el ATP extracelular desempeña múltiples funciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas. El ATP actúa sobre una gran variedad de receptores purinérgicos situados en la superficie de las células para mediar funciones como la transmisión sináptica, la percepción de tacto y de dolor, el control de respuestas vasomotoras, la agregación plaquetaria, la liberación de sustancias vasodilatadoras por parte del endotelio, la participación en la respuesta inmune, la proliferación celular y mitosis, la apoptosis o la regulación del volumen celular, entre otras (Novak, 2003). Así pues, se ha querido estudiar la señalización purinérgica y el papel del ATP en la función de la red trabecular.

Expresión de receptores purinérgicos en las células trabeculares

En este trabajo se ha demostrado la expresión, mediante técnicas de inmunocitoquímica y *western blot*, de receptores purinérgicos metabotrópicos del tipo P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₄ en cultivos primarios de células trabeculares bovinas (Figura 4.20). Existen trabajos previos en los que mediante técnicas de PCR también se han detectado, en cultivos de células trabeculares bovinas, receptores purinérgicos P2Y₁ y P2Y₂ (Cui, 2001). Los resultados aquí mostrados concuerdan con este trabajo al igual que los de otro estudio de reciente publicación en el cual, experimentos de inmunocitoquímica realizados sobre cortes de ojo de rata, revelan que la red trabecular muestra la expresión de receptores P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₄ (Pintor, 2004a). En este trabajo realizado con el modelo murino, en el que el perfil de expresión se muestra idéntico al nuestro, el origen comercial de los anticuerpos es el mismo que en los utilizados en esta tesis. Por otra parte, existe un tercer estudio realizado sobre una línea celular humana en el que se demuestra la presencia de RNAm de los receptores P2Y₁, P2Y₄ y P2Y₁₁ (Crosson, 2004). Este patrón, ligeramente distinto al obtenido en la presente tesis, podría deberse a diferencias interespecíficas o a cambios en el patrón de expresión de la línea celular humana respecto a los cultivos primarios. De todas estas consideraciones se puede concluir que la expresión de ciertos tipos de receptores purinérgicos, como el P2Y₁ parece ser bastante constante en todas las especies analizadas mientras que la expresión de otros receptores

como el P2Y₂, el P2Y₄ o el P2Y₁₁ dependen del origen de las células trabeculares utilizadas en los estudios.

Receptores P2X

Las células trabeculares parece que no expresan receptores ionotrópicos P2X, como se ha demostrado con el uso de agonistas selectivos como el $\Omega\Omega$ meATP o $\Omega\Omega$ meATP, los cuales no producen incrementos en el Ca²⁺ intracelular (Figura 4.4). Este hecho se ve apoyado por los experimentos en los que se elimina el Ca²⁺ extracelular y en los cuales los agonistas ATP y ATP- Ω S (Figura 4.8 y Tabla 4.5) no producen variaciones en el porcentaje de respuesta o en la amplitud inicial del pico de Ca²⁺, descartando, una vez más, la existencia de receptores P2X funcionales en los cultivos de células trabeculares. Un estudio simultáneo a la realización de este trabajo está en total acuerdo con los resultados aquí obtenidos de la no existencia de receptores P2X en las células trabeculares (Crosson, 2004). Así pues, se puede concluir, que en este trabajo, la activación por al ATP de los receptores purinérgicos en las células trabeculares es de carácter exclusivamente metabotrópico.

Estudios funcionales del Ca²⁺ intracelular

Los registros del Ca²⁺ intracelular demuestran la funcionalidad de los receptores P2Y expresados en las células trabeculares. En estos estudios con diferentes agonistas purinérgicos se pone de manifiesto que la estimulación del receptor P2Y₁ produce un tipo de respuesta diferente de la que se observa tras la estimulación de los receptores purinérgicos P2Y₂ y P2Y₄. En ambos tipos de respuesta se produce un aumento en la [Ca²⁺]_i, pero el patrón de movilización del Ca²⁺ es diferente.

P2Y₁

La estimulación del receptor P2Y₁ provoca un tipo de respuesta en la que se producen incrementos de Ca²⁺ rápidos de entre 300-400 nM, con un retorno también rápido a los niveles basales en la gran mayoría de los experimentos, transcurridos 2-3 minutos de la estimulación. Esta respuesta se observa frente a compuestos como el ADP,

el 2-MeS-ATP o el 2-MeS-ADP (Figura 4.26 y Tablas 4.3 y 4.9), los cuales son buenos agonistas del P2Y₁ (Ralevic, 1998), indicando que los aumentos de Ca²⁺ se producen tras la activación de este receptor. El estudio más detallado con antagonistas específicos del P2Y₁ (Figura 4.27) confirma, efectivamente, que estos agonistas activan el P2Y₁. Existen otros compuestos utilizados en este estudio, los cuales no activan selectivamente receptores P2Y₁ pero que, sobre las células trabeculares provocan respuestas similares a las encontradas tras la activación del P2Y₁. Se sabe que ciertos dinucleótidos polifosfato como el Ap₃A o el Ap₄A estimulan el receptor P2Y₁ con diferente selectividad dependiendo del tejido (Pintor, 1996; Pintor, 2000). Otros como el Ap₅A, en general son menos efectivos sobre este receptor (Schachter, 1996). Todos ellos muestran movilizaciones del Ca²⁺ intracelular muy similares a las que se desencadenan con el agonista selectivo del P2Y₁, 2-MeS-ADP.

P2Y₂ y P2Y₄

La estimulación con agonistas de los receptores P2Y_{2/4} como son los nucleótidos trifosfato ATP, UTP, ATP- Ω S o el dinucleótido Up₄U, provocan aumentos en la [Ca²⁺]_i diferentes a los mostrados por agonistas que activan el receptor P2Y₁ (Figuras 4.2, 4.5 y 4.21). Este patrón de movilización se caracteriza por presentar picos iniciales de Ca²⁺ ligeramente superiores (400-500 nM), siendo los incrementos de Ca²⁺ más sostenidos a lo largo del tiempo. Los niveles de Ca²⁺ tardan, en la mayoría de las ocasiones, más de 5 minutos en regresar a los niveles basales. Simultáneamente a la realización de este trabajo se ha publicado un estudio del efecto del ATP y el UTP sobre los niveles de Ca²⁺ intracelular en células trabeculares tanto humanas como bovinas (Crosson, 2004). Los resultados de Crosson *et al.* muestran incrementos en el Ca²⁺ intracelular sostenidos que siguen el mismo patrón que los encontrados en el trabajo de esta tesis para estos mismos nucleótidos trifosfato.

Las movilizaciones sostenidas de Ca²⁺ observadas tras la activación con nucleótidos trifosfato encajan con el tipo de respuesta mediada por la activación de receptores para pirimidinas P2Y₂ y P2Y₄ en diferentes tipos celulares (Shahidullah, 1997; Srinivas 1998; Viana 1998; Junankar, 2002). Tanto el ATP como el UTP activan ambos subtipos de receptor (Ralevic, 1998), así que, debido a la falta de agonistas y antagonistas específicos, la distinción del receptor que resulta activado por cada uno de estos agonistas es complicada, aunque probablemente tanto el P2Y₂ como el P2Y₄ resulten estimulados

por los agonistas. El perfil de respuesta encontrado en las células trabeculares para estos compuestos ($ATP = UTP > ATP-\Omega S$) encaja según los descritos en la literatura tras la activación del receptor $P2Y_2$, sin embargo también coincide con la activación del receptor $P2Y_4$ de ciertas especies (Ralevic, 1998). El compuesto Up_4U tampoco discrimina entre el $P2Y_2$ y el $P2Y_4$ ya que actúa con similar potencia sobre ambos receptores (Pendergast, 2001).

Sin embargo, el uso del antagonista no específico suramina previene en un 30% la respuesta frente al ATP de las células (Figura 4.7; Tabla 4.4). Esto es indicativo de la activación del receptor $P2Y_2$ ya que, mientras que han sido descritos multitud de ejemplos de receptores $P2Y_2$ sensibles a la suramina, el receptor $P2Y_4$ es insensible a este antagonista (Ralevic, 1998). Este bajo porcentaje de inhibición de la respuesta de la suramina puede ser debido a la baja potencia que muestra este antagonista en el bloqueo de los receptores P2 (Ralevic, 1998).

Mecanismos intracelulares activados por ATP

Como se ha comentado anteriormente, los incrementos de Ca^{2+} producidos por el ATP siguen una cinética como la mostrada en la Figura 4.2, de tipo sostenido. La totalidad del Ca^{2+} que se libera al citoplasma en los primeros segundos siguientes a la estimulación con el agonista, procede de los depósitos intracelulares como queda demostrado en los experimentos en presencia de tapsigargina (Figura 4.8 y Tabla 4.5). En otros tejidos oculares, como en el epitelio ciliar, el ATP actúa del mismo modo, movilizandando Ca^{2+} de los depósitos intracelulares vía receptores $P2Y_2$ (Shahidullah, 1997). El aumento del Ca^{2+} intracelular se produce por la activación de una proteína $G_{q/11}$ que activa la PLC- Ω . A pesar de que no se han medido niveles de IP_3 en este estudio, es sabido que la activación de la PLC- Ω implica la generación de IP_3 (Berridge, 1993). Además se ha demostrado que el vaciamiento de los depósitos citoplasmáticos se produce por la activación de receptores IP_3 y no de receptores de rianodina (Figura 4.8).

Tras el pico inicial de Ca^{2+} procedente de los depósitos, la fase de recuperación de los niveles intracelulares de este ión es más rápida en los experimentos realizados sin Ca^{2+} en el medio extracelular que en condiciones de Ca^{2+} fisiológicas (Figura 4.9). Esto se ha analizado mediante el índice T_{70} . Este índice señala el tiempo que transcurre desde el pico máximo hasta que los valores de Ca^{2+} vuelven a recuperarse en un 70%. Así pues, un

valor alto del T_{70} indica un retorno lento a los niveles de Ca^{2+} basales, mientras que un valor bajo indica un retorno rápido. Tras la estimulación con ATP, los resultados del T_{70} son de 62 segundos en presencia de Ca^{2+} extracelular y de 35 segundos con 0 Ca^{2+} nominal en el tampón de lectura, demostrando de esta manera que los incrementos iniciales de Ca^{2+} provocan, en condiciones normales, una segunda entrada capacitativa de Ca^{2+} , inexistente si se elimina el Ca^{2+} extracelular.

Esta entrada de Ca^{2+} capacitativa se ha observado en otros tipos celulares, como las células de la musculatura lisa vascular, donde sustancias como el ATP, la endotelina, la histamina o el carbacol producen picos semejantes a los obtenidos en las células trabeculares (McFadzean, 2002), y donde la entrada de Ca^{2+} se da por canales SOCCs (*Store-operated calcium channels*; canales de Ca^{2+} que se activan tras la liberación de Ca^{2+} intracelular permitiendo una entrada de Ca^{2+} del exterior). Sobre las células trabeculares también se conoce la actuación de sustancias que provocan incrementos sostenidos del Ca^{2+} intracelular como por ejemplo la bradikinina (Llobet, 1999), la histamina (WoldeMussie, 1992), el carbacol (Tanihara, 1991), la endotelina-1 (Tao, 1998) o la adenosina (Fleischhauer, 2003). Estos incrementos de Ca^{2+} también tienen una componente de entrada de Ca^{2+} capacitativa.

El canal o los canales implicados en esta entrada capacitativa se desconocen. Se ha descrito la existencia de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes de tipo L (Steinhausen, 2000) en células trabeculares, los cuales podrían activarse por una posible despolarización producida por el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, permitiendo una entrada de Ca^{2+} desde el exterior de la célula. Cada vez existen más evidencias que los canales TRP (*transient receptor potencial*) están involucrados en la entrada capacitativa de Ca^{2+} en las células no excitables (Parekh, 2005), y cabe la posibilidad que en las células trabeculares, la fase sostenida o de *plateau* de la $[Ca^{2+}]_i$ observada tras estimular con ATP pudiera ser debida a la actividad de estos canales.

Presencia de oscilaciones en el Ca^{2+} tras la estimulación purinérgica

En los experimentos de registro de la $[Ca^{2+}]_i$, es muy común que, tras el primer pico de Ca^{2+} , se desencadenen más picos durante los siguientes minutos de experimento. Estas oscilaciones en el Ca^{2+} intracelular podrían darse de manera fisiológica fruto de la activación repetida del receptor como ocurre en otras células no excitables (Jacob, 1991;

Thomas, 1996). De hecho, en nuestros experimentos, la gran mayoría de compuestos presentan al menos un 20-30% de segundas señales, lo que indica que estas segundas movilizaciones de Ca^{2+} son frecuentes en las células trabeculares tras estimular los receptores P2Y. En otros tipos celulares se ha observado también que el ATP provoca patrones de oscilación en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Hanley, 2004; Fanchaouy, 2005). Sin embargo, es interesante subrayar que ciertos compuestos muestran un mayor número de segundos picos y oscilaciones que otros. Esto se observa con agonistas cuyos productos de degradación pueden activar receptores de las células trabeculares. El ATP y el ADP producen segundos picos en el 76% y 54% de las ocasiones a 10^{-6}M , respectivamente. La degradación de estos compuestos por las ectonucleotidasas presentes en las superficies celulares generan ADP, AMP y adenosina (Zimmermann, 1999) los cuales podrían activar otros receptores en las células trabeculares. La presencia de ectoATPasas ha sido demostrada en este mismo trabajo mediante el uso del inhibidor ARL67156 (Figura 4.18), así como la presencia de receptores P2Y₁ que se estimulan por ADP (Figura 4.26), y en otros estudios se ha visto que las células trabeculares poseen receptores de adenosina A₁, A2_A y A₃ cuya estimulación provoca incrementos en el Ca^{2+} intracelular (Fleischhauer, 2003). Así pues, compuestos de degradación como el ADP o la adenosina podrían producir en parte los incrementos de Ca^{2+} subsiguientes al primer pico. Por otro lado, el dinucleótido polifosfato Ap₄A, cuya hidrólisis por las ectonucleotidasas da lugar a ATP (Vollmayer, 2003), muestra un 60% de segundos picos (Figura 4.21).

Por el contrario, se ha observado que los compuestos poco susceptibles a ser degradados muestran un menor número de segundos picos. Concretamente, el ATP- ΩS o el 2-MeS-ADP, análogos purinérgicos de degradación lenta, tan sólo muestran dobles picos en un 31% y un 25% de las ocasiones respectivamente. De igual modo, los compuestos cuyos productos de degradación no se comportan como agonistas en las células trabeculares tienen menos porcentaje de segundos picos comparados con el ATP: el UTP, cuya degradación produce UDP, presenta un 31% de segundos picos.

El Ap₃A, tras ser hidrolizado, produce ADP como producto de degradación (Vollmayer, 2003) y ya que las células trabeculares presentan receptores P2Y₁, cabría esperar una alta frecuencia de oscilaciones al estimular con el Ap₃A. Sin embargo, tan sólo se producen segundos picos en un 26% de las ocasiones a 10^{-5}M , lo cual podría explicarse por una baja concentración de ADP resultante de la hidrólisis del Ap₃A. Por último, el Up₄U presenta un 22% de segundas respuestas, y no se puede descartar su degradación de manera similar a la del Ap₄A, la cual produciría UTP. El bajo porcentaje de

respuestas oscilatorias podría ser explicado, igualmente, por una baja concentración del producto de degradación del Up_4U , en este caso el UTP.

Posibles funciones del ATP en la red trabecular

La activación en las células trabeculares de diferentes tipos de receptores purinérgicos con distintos patrones de respuesta, podría ser indicativo de la existencia de diferentes funciones moduladas por la señalización purinérgica. En otros tipos celulares, distintos tipos de oscilaciones provocan diferentes efectos en las células gracias a la versatilidad del Ca^{2+} como señal intracelular (Berridge 2000). Existen estudios en los que se demuestra que el ATP en las células trabeculares produce la activación de la vía de señalización ERK (Crosson, 2004). Esta vía está involucrada en un aumento de la mitosis, del crecimiento y tiene funciones antiapoptóticas, además de regular la secreción de metaloproteinasas de la matriz extracelular (Shearer, 2001). Así, puede que una de las funciones desempeñadas por el ATP en la red trabecular sea proliferativa o que actúe a nivel de la regulación de la matriz extracelular. Otros trabajos demuestran la capacidad contráctil del ATP sobre la red trabecular (Choritz, 2004), lo que podría conferirle un papel en los mecanismos de contracción/relajación que la red trabecular utiliza en la modulación del humor acuoso. Otro posible papel que podría desarrollar el ATP sería la inducción en la liberación de sustancias por parte de las células trabeculares. En células endoteliales, el ATP provoca la liberación de sustancias vasodilatadoras como el NO (Kotsis, 2003) o de prostaciclina (Pojoga, 2002). Estas sustancias liberadas por el ATP podrían modular tanto la propia función trabecular como la de otras estructuras relacionadas con la facilidad de evacuación como el endotelio del canal de Schlemm.

Modulación de corrientes de K^+ por el ATP

En este trabajo de tesis, se han estudiado los efectos del ATP sobre las corrientes iónicas de K^+ mediadas por el canal de K^+ de alta conductancia dependiente de Ca^{2+} (BK_{Ca}). El ATP extracelular estimula las corrientes de K^+ mediadas por el canal BK_{Ca} (Figura 4.11), y el incremento producido sobre dichas corrientes implica, al menos en parte, al receptor $P2Y_2$ (Figuras 4.13 y 4.14). Se ha descrito que en células trabeculares las corrientes de K^+ mediadas por el BK_{Ca} se activan también por la adenosina y esta activación parece depender de los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ (Fleischhauer, 2003). La

activación del canal BK_{Ca} por la estimulación de receptores P2Y₂ se ha observado también en otros tipos celulares, como células de musculatura lisa (Strobaek, 1996; Lemon, 2005) o células gliales de retina (Bringmann, 2002). La activación de este receptor implica un incremento de la [Ca²⁺]_i, el cual puede ser la posible causa de la activación del canal. Se ha descrito también la existencia de la interacción directa con ciertos canales de K⁺ por parte de la subunidad Ω de las proteínas G tras la estimulación de receptores P2Y (Ikeuchi, 1995a), sin embargo, la falta de efecto sobre las corrientes en los experimentos con BAPTA demuestran la implicación directa del ión Ca²⁺ en la modulación del canal. La dependencia del Ca²⁺ del BK_{Ca} en las células trabeculares se ha demostrado en otros estudios anteriores, en los cuales se ha descrito el aumento de la actividad del canal al incrementar el Ca²⁺ en la parte citosólica del canal (Stumpff, 1997; Gasull, 2003).

A pesar de demostrar que el Ca²⁺ es el responsable de los incrementos de corriente del canal BK_{Ca}, su implicación directa en este aumento de corriente no se ha estudiado con más detalle en este trabajo. La modulación por parte del Ca²⁺ probablemente se produzca al actuar sobre la subunidad Ω del canal BK_{Ca}, la cual le confiere la sensibilidad por el Ca²⁺ intracelular (Orio, 2002). Otra posibilidad es la actuación a través de la modulación de la PKC por parte del Ca²⁺ (Bell, 1986), siendo este enzima el que finalmente activaría el canal. En este sentido, a pesar que se ha descrito que la PKC inhibe el canal BK_{Ca} en músculo liso (Schubert, 2001), existen estudios en los que se produce la activación del canal BK_{Ca} por la PKC (Barman, 2004). Es más, respuestas inducidas por ATP vía P2Y o por la adenosina sobre las corrientes de K⁺, se producen por la activación de una PKC (Ikeuchi, 1995b; Nishizaki, 1996). Así pues, los mecanismos que activan las corrientes del BK_{Ca} en las células trabeculares tras la estimulación purinérgica necesitan de un mayor grado de investigación y en este momento no se puede descartar ninguna opción, incluida una hipótesis combinada que involucre directamente Ca²⁺ y también la PKC.

Activación purinérgica del BK_{Ca}: Implicación en la contracción/relajación

El canal BK_{Ca} está involucrado en el control del grado de despolarización e hiperpolarización de la membrana plasmática y en procesos de relajación en diferentes tejidos (Nelson, 1995). Este canal incrementa su actividad con la despolarización de la membrana o los incrementos en el Ca²⁺ para amortiguar los estímulos excitatorios (Orio, 2002). A nivel de la red trabecular, la contracción del tejido y los incrementos de Ca²⁺

implicarían la activación del BK_{Ca} para relajar el tejido y controlar de esta manera el grado de contracción. Existen trabajos en los que se ha visto que la bradikina, tras a un incremento del Ca²⁺ intracelular, provoca un aumento en la contracción de las células trabeculares (Llobet, 1999) además de activar el BK_{Ca} (Llobet, 1998), probablemente como mecanismo compensatorio para relajar el tejido. La activación de receptores purinérgicos provoca un aumento de la [Ca²⁺]_i (Crosson, 2004 y el presente estudio) de manera similar a la bradikina y se ha visto que el ATP provoca la contracción de tiras de red trabecular (Choritz, 2004). Por tanto, la activación del BK_{Ca} por el ATP podría ocurrir también de manera secundaria como mecanismo para retornar el potencial de membrana a los valores originales y regular, así, el grado de contracción del tejido.

El aumento de la actividad del BK_{Ca} se ha correlacionado en diferentes estudios con la relajación de la red trabecular. El ácido flufenámico estimula la actividad del BK_{Ca} (Stumpff, 2001) y el mismo compuesto provoca la relajación de tiras de tejido trabecular que han sido previamente contraídas (Wiederholt, 1997). De la misma manera, un incremento en el GMPc intracelular induce la activación del canal BK_{Ca} (Stumpff, 1997) y esto se correlaciona con la relajación del tejido trabecular que se produce tras la aplicación del análogo 8-Br-GMPc (Wiederholt, 1994).

Activación purinérgica del BK_{Ca}: Implicación en el volumen celular

Otro posible papel de la activación de corrientes de K⁺ mediadas por el BK_{Ca} tras la estimulación purinérgica es una función de regulación del volumen celular. El ATP, los receptores purinérgicos y las corrientes de K⁺ se encuentran íntimamente relacionados con las variaciones de volumen celular (Wang, 1996; Weskamp, 2000; Feranchak, 2000; Braunstein, 2001; Okada, 2001; Sheader, 2001; Fernández-Fernández, 2002; Okada, 2004). El canal BK_{Ca} está implicado en la regulación del volumen celular en diversos tipos celulares (Weskamp, 2000; Sheader, 2001; Fernández-Fernández, 2002). El volumen de las células está altamente regulado para que éstas funcionen correctamente y para ello, todas las células poseen mecanismos de regulación del propio volumen celular que varían según el tipo celular pero que en general incluyen la activación de canales iónicos, bombas y transportadores de membrana (Okada, 2001). El flujo de iones a través de la membrana, acompañado de un movimiento pasivo de agua, permite a las células recuperar su volumen original mediante un proceso que puede ser llevado a cabo gracias

a una disminución del volumen celular (*regulatory volume decrease*; RVD) o a un incremento en el volumen celular (*regulatory volume increase*; RVI).

La importancia de la activación de estas corrientes de K^+ en el proceso del RVD que poseen las células trabeculares también ha sido demostrada (Mitchell, 2002). El RVD que se desencadena tras un aumento del volumen y en el que intervienen conjuntamente corrientes de Cl^- y K^+ se dificulta al bloquear las corrientes de K^+ con TEA (Mitchell, 2002; Srinivas 2004), demostrando así la gran importancia de la corriente de K^+ en este proceso regulador. Además, como se ha observado en experimentos realizados en nuestro laboratorio, el bloqueo del canal BK_{Ca} interfiere en la recuperación de la facilidad de evacuación de la red trabecular tras la disminución que se produce después de un choque hipotónico en la perfusión de segmentos anteriores *in vitro* (Soto, 2004). En estos mismos experimentos, un aumento en la actividad del canal BK_{Ca} mediante el activador específico NS1619 provoca una recuperación más rápida de la facilidad de evacuación tras un choque hipotónico. Estos experimentos demuestran la importancia de este canal en el RVD.

Liberación de ATP: Implicación en el volumen celular

Como se ha comentado anteriormente, en las células trabeculares se han podido observar cambios de volumen por variaciones en la tonicidad del medio extracelular (Mitchell, 2002; Srinivas, 2004) o inducidos por diferentes sustancias (O'Donnell, 1995). El volumen de las células trabeculares es importante para la función de la red trabecular (Gual, 1997; Al-Aswad 1999), ya que aumentos en el volumen de las células pueden disminuir los espacios intercelulares, dificultando así el paso de humor acuoso. Dentro de los mecanismos involucrados en los procesos de RVD, la liberación de ATP por parte de las células es un mecanismo que se da con frecuencia en diferentes tipos celulares (Feranchak, 2000; Braunstein, 2001; Okada, 2004). De hecho, el ATP extracelular es importante en la recuperación de volumen tras un aumento en dicho volumen celular, ya que si se bloquean los receptores purinérgicos, la regulación de volumen no se produce o está muy dificultada (Wang, 1996; Okada 2001). En las células trabeculares, este mecanismo de RVD podría involucrar, como sucede en otros tipos celulares, una liberación de ATP y la posible activación de receptores purinérgicos.

En el presente estudio se ha demostrado que las células trabeculares liberan ATP frente a un estímulo hiposmótico (Figura 4.17), lo que concuerda con otros trabajos que muestran la capacidad de liberación de ATP por parte de estas mismas células frente a diferentes estímulos (Cui, 2001; Fleischhauer, 2003). El mecanismo exacto por el cual se produce la liberación de ATP en diferentes tipos celulares es bastante controvertido. Existen varios candidatos responsables para la liberación de ATP como los canales de cloro, los canales aniónicos, las connexinas o la liberación por vesículas (Stout, 2002; Novak, 2003), pudiendo coexistir varios de ellos (Reigada, 2005). En el caso de las células trabeculares, se necesitan más estudios para dilucidar el mecanismo de liberación, pero experimentos previos parecen descartar canales de ATP mecanosensibles ya que la liberación de ATP por las células trabeculares no se bloquea con gadolinio (Gd^{3+}), a diferencia de otros trabajos en que están involucrados este tipo de canales (Boudreault, 2002). El ATP liberado por las células trabeculares en cultivo tras estímulos hipotónicos es degradado rápidamente como se pone de manifiesto en los experimentos con el inhibidor de las ectonucleotidasas presentes en la superficie celular (Figura 4.18). Esto indica que posiblemente la estimulación del ATP sobre los receptores de la membrana se circunscribe a un lugar delimitado y a un periodo corto en el tiempo. En astrocitos ha sido descrita la colocalización de los lugares de liberación de ATP con sitios con actividad ectonucleotidasa y se ha atribuido este hecho a una estrategia para restringir las acciones del ATP liberado a una acción autocrina-paracrina (Joseph, 2003). Teniendo esto en cuenta, en las células trabeculares la acción de las ectonucleotidasas degradando la molécula señalizadora podría evitar una estimulación excesiva por parte del ATP, regulando de esta manera su función.

Se ha demostrado en este estudio que el ATP extracelular es capaz de activar receptores purinérgicos y que la activación de éstos modula corrientes de K^+ mediadas por el BK_{Ca} . Por lo tanto, el ATP liberado como consecuencia de un aumento de volumen celular, ya sea por un estímulo hipotónico o por efecto de alguna sustancia, sería capaz de activar receptores purinérgicos que modularían las corrientes de K^+ involucradas en la regulación del volumen celular. El papel de la liberación de ATP y posterior activación de receptores purinérgicos en la regulación del volumen, se ha demostrado en diferentes trabajos, donde resulta muy importante en el proceso de RVD (Wang, 1996; Light, 2001). Además de liberar ATP frente a un estímulo hipotónico, tal y como se ha demostrado en esta tesis, otros estudios demuestran que las células trabeculares liberan ATP por estímulos osmóticos y mecánicos (Cui, 2001; Fleischhauer, 2003). Tampoco se puede descartar la posibilidad de que el ATP sea liberado por el efecto de otras sustancias como

se ha visto en otros tipos celulares (Joseph, 2003), por hipoxia (Gourine, 2005) o incluso que el ATP pueda ser liberado en condiciones patológicas, por ejemplo por una inflamación aguda, como ocurre en ciertos tejidos (Bodin, 1998). Por otro lado, el ATP también podría alcanzar la red trabecular procedente del humor acuoso, dónde se ha demostrado que puede ser liberado desde otros tejidos como el epitelio ciliar (Mitchell, 1998) o a partir de terminales nerviosos (Maul, 1979). En todas estas situaciones, el ATP liberado por las propias células trabeculares o proveniente de otros tejidos bañados por el humor acuoso podría regular la facilidad de evacuación mediante cambios de volumen de las células trabeculares en respuesta a factores que alterasen dicho volumen y manteniendo así la homeostasis. En este sentido se tiene conocimiento que ciertas drogas como la desmopresina provocan disminuciones en la osmolaridad del humor acuoso (Viggiano, 1993), lo cual podría desencadenar procesos de RVD en las células trabeculares.

Efectos de la activación purinérgica sobre la facilidad de evacuación

En nuestros estudios se ha evaluado la acción del ATP como agonista natural de los receptores purinérgicos sobre la facilidad de evacuación (C), para así estudiar el efecto de este compuesto sobre las células trabeculares en el tejido trabecular *in situ*. Sin embargo, el ATP no muestra ningún efecto sobre la facilidad de evacuación (Figura 4.19). En la falta de efecto del ATP sobre la C existe la posibilidad de una degradación de este nucleótido por la acción de las ectonucleotidasas extracelulares (Figura 4.18). Además, cabe la posibilidad que los compuestos de degradación del ATP, ya sea el ADP o la adenosina puedan estimular múltiples receptores de la red trabecular con efectos contrarios. De hecho, la adenosina tiene efectos importantes sobre la IOP. Los agonistas A_1 disminuyen la IOP (Crosson, 1995; Avila, 2003; Tian 1997), mientras que la activación de receptores A_3 y A_{2A} por la adenosina produce un aumento en la IOP (Crosson, 1995; Crosson, 1996; Avila 2001).

Experimentos con el ATP- Ω S, análogo más resistente a la degradación por ectonucleotidasas (Figura 4.19 y Tabla 4.6), tampoco resultan significativamente diferentes respecto a los experimentos control. En otros trabajos se ha demostrado que los nucleótidos ATP y ATP- Ω S producen incrementos en la IOP (Pintor, 2001) y parece que el perfil de respuesta coincide con una actuación sobre receptores P2Y. La acción del ATP y el ATP- Ω S en los estudios de Pintor *et al.* puede producirse tanto a nivel de drenaje como

de formación del humor acuoso, donde se han descrito receptores P2Y capaces de ser estimulados por estos agonistas (Farahbakhsh, 2002), ya que estos estudios se realizan sobre animales *in vivo*. En nuestros experimentos, el epitelio del cuerpo ciliar ha sido diseccionado (Gual 1997; Llobet, 1999), lo cual descarta una actuación de las drogas perfundidas (ATP y ATP- Ω S) sobre la vía de formación del humor acuoso.

La utilización del compuesto Up₄U, selectivo de los receptores P2Y₂ y P2Y₄, tampoco provoca cambios en la C, al igual que el ATP. El dinucleótido Up₄U provoca incrementos de Ca²⁺ sostenidos a lo largo del tiempo semejantes a los del ATP y en las células trabeculares se ha demostrado que aquellas sustancias que movilizan Ca²⁺ intracelular de manera sostenida, como el carbacol (Shade, 1996), la endotelina-1 (Tao, 1998) o la bradikina (Llobet, 1999), provocan una disminución de la facilidad cuando son testadas sobre el sistema de evacuación (Wiederholt, 1995, Llobet, 1999). En el caso del Up₄U, los incrementos de Ca²⁺ que provoca son semejantes a los de estas drogas y sin embargo, no produce variaciones en la C. Como ya se ha dicho, el Up₄U ejerce su acción sobre receptores P2Y₂ y P2Y₄ con una potencia equiparable al UTP y el ATP (Pendergast, 2001). Parece, pues, que la activación de los receptores P2Y₂ y P2Y₄ por el ATP y el Up₄U en las condiciones experimentales de este trabajo de tesis no modifican la C.

A pesar de esta falta de efecto sobre la C de estos compuestos purinérgicos, la existencia de diferentes tipos de receptores purinérgicos en las células trabeculares plantea la implicación que pueda tener su activación a nivel de la C. De este modo se han estudiado los efectos sobre la C de otros agonistas purinérgicos capaces de activar los receptores P2Y₁, los cuales se expresan funcionalmente en las células trabeculares. En este trabajo se demuestra que la estimulación del receptor P2Y₁ en los experimentos de perfusión con la utilización del agonista 2-MeS-ADP activa mecanismos que aumentan la C (Figura 4.29). El claro efecto del antagonista específico MRS2179 inhibiendo los efectos del 2-MeS-ADP confirma la participación del receptor P2Y₁.

Curiosamente, el bloqueo del receptor P2Y₁ con el MRS2179, provoca una disminución por sí sólo en la facilidad de evacuación (Figura 4.29). Esto podría ser indicativo de una activación permanente del receptor. En el humor acuoso las concentraciones de ATP y ADP están en el rango μ M (Pintor, 2003a) y estos compuestos, en especial el ADP (Ralevic, 1998), podrían estar activando el receptor P2Y₁ de forma que su activación modularía de manera positiva la C. Es lógico pensar que si esto ocurre de este modo, el bloqueo del receptor provoque una disminución de la facilidad.

Por otro lado, se ha visto que ciertos receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) pueden activarse de manera “constitutiva” sin necesidad de su unión a un agonista. Esto significa que en condiciones basales y en ausencia de agonista, existe un equilibrio entre la forma activa del receptor (la subunidad G_{Ω} de la proteína G se encuentra disociada y activando efectores celulares) y la forma inactiva (la subunidad G_{Ω} se encuentra unida a la $G_{\Omega\Omega}$ sin activar efectores). Se ha demostrado que tras la unión de un agonista, se estabiliza el GPCR en una forma activa y la unión de un antagonista (también llamado “agonista inverso”) a este mismo receptor lo estabiliza en su forma inactiva evitando así el efecto biológico (Strange, 2002). Se ha encontrado que algunos receptores tienden a permanecer parcialmente en su forma activa (actividad constitutiva) y el agonista los estabiliza para mantener este efecto de una forma más intensa y prolongada. En este caso, el 2-MeS-ADP estabilizaría el $P2Y_1$ en su forma activa incrementando los efectos sobre la C. La unión del MRS2179 estabilizaría el $P2Y_1$ en su forma inactiva, disminuyendo la activación espontánea y por tanto ejerciendo un efecto contrapuesto al agonista 2-MeS-ADP en la C. Este tipo de activación constitutiva se ha observado en varios tipos de receptores como por ejemplo los de histamina H_1 , H_2 y H_3 (Leurs, 2002) o receptores adrenérgicos Ω_{1A} y Ω_{1B} (Rossier, 1999). La activación permanente del $P2Y_1$ y sus posteriores efectos podrían desempeñar una función homeostática en la red trabecular, regulando la C al estar actuando de manera constitutiva.

Los compuestos Ap_3A y el Ap_4A aumentan la C actuando sobre la vía trabecular. La pérdida de efecto sobre la facilidad de evacuación del Ap_4A al ser perfundido con el antagonista del receptor $P2Y_1$, el MRS2179 (Figura 4.28), parece indicar que los efectos del Ap_4A (y posiblemente del Ap_3A) están mediados, al menos en parte, por la activación de este receptor. Más aún, el hecho de que el Up_4U y el ATP, ambos buenos agonistas $P2Y_2$ y $P2Y_4$, no produzcan un efecto sobre la C, también señala que los incrementos producidos por el Ap_3A y el Ap_4A no son debidos a la actuación sobre receptores $P2Y_2$ o $P2Y_4$. A pesar de que ciertos trabajos sitúan al Ap_4A como un mal agonista del receptor $P2Y_1$ (Patel, 2001), los efectos del Ap_4A sobre este receptor se han podido observar en otros tejidos, dónde el Ap_4A provoca vasodilatación tras activar el receptor $P2Y_1$ (Steinmetz, 2002),

El aumento de la C por el Ap_3A y el Ap_4A sobre la vía trabecular, permite hipotetizar que los efectos hipotensores producidos por el Ap_4A que se han visto en otros trabajos realizados en conejos (Pintor, 2003a) podrían deberse en parte a un aumento de la C. Sin embargo, hay que tener en cuenta una serie de consideraciones a la hora de poder

comparar resultados. En dichos experimentos, en los que se aplican de manera tópica los dinucleótidos, éstos pueden estar actuando a diferentes niveles. Por un lado, a nivel de drenaje de humor acuoso, ya que se ha demostrado en este trabajo de tesis y en otros estudios la presencia de receptores purinérgicos funcionales a este nivel (Crosson, 2004). Por otra parte, podrían estar actuando a nivel del epitelio ciliar, tejido que posee también receptores P2Y₁ y P2Y₂ funcionales (Shahidullah 1997; Cullinane, 2001; Farahbakhsh, 2002), alterando de esta manera la producción de humor acuoso. En los experimentos de Pintor *et al.* tampoco se puede descartar una actuación de estos compuestos a nivel de terminales nerviosos, los cuales poseen receptores P2X, P2Y o receptores específicos de dinucleótidos P4 (Pintor, 1995). Por último, añadir que los experimentos realizados con dinucleótidos usados de manera tópica han sido realizados en conejo, mientras que los estudios de esta tesis han sido realizados con ojos y células bovinas y, por lo tanto, los resultados no pueden extrapolarse completamente. Aún y así, los incrementos de la facilidad encontrados en este trabajo se correlacionan bien con los efectos hipotensores del Ap₄A encontrados en los estudios sobre conejo (Pintor, 2003a).

Respecto al Ap₃A, el cual tiene un efecto de facilitación de la C, los resultados no se muestran en concordancia con los obtenidos sobre las medidas de IOP en conejos, dónde el Ap₃A se muestra como un compuesto hipertensor (Pintor 2003a). Estos diferentes resultados podrían explicarse debido a una distinta sensibilidad de los receptores purinérgicos estimulados por el Ap₃A en los sistemas de formación y drenaje del humor acuoso. Es posible que, el Ap₃A aplicado tópicamente sobre conejos, a pesar de tener un efecto de facilitación del drenaje de humor acuoso a nivel de red trabecular, tenga un mayor efecto estimulador a nivel de la producción de humor acuoso, y exista un desequilibrio de la balanza hacia un aumento de producción y, por tanto, un incremento de la IOP. También hay que tener en cuenta las diferencias mencionadas anteriormente entre las especies de estudio, y que la expresión, abundancia y función de los diferentes receptores en estas dos especies no tiene por qué ser la misma.

Cabe mencionar, dentro de los efectos sobre la C, que el Ap₅A, a pesar de producir incrementos de Ca²⁺ similares a los provocados por el Ap₄A y el Ap₃A, a diferencia de éstos no provoca variaciones significativas de la facilidad de evacuación. Hay que destacar que el Ap₅A se muestra como un compuesto susceptible a ser degradado con más facilidad por las células trabeculares que otros Ap_nAs. Estudios de nuestro grupo (Soto, 2005) han demostrado que tras 60 minutos de incubación con células trabeculares, el Ap₄A se degrada en un 18%, sin embargo la cantidad de Ap₅A se reduce en un 44%. El

hecho que el Ap₅A se degrade más rápidamente podría explicar la falta de efecto sobre la facilidad de evacuación. Otra posible explicación sería que el Ap₅A activase otras vías de señalización intracelular distintas a las del Ap₃A y el Ap₄A.

Las vías intracelulares que se activan por el Ap₃A, el Ap₄A y el 2-MeS-ADP no se han estudiado en profundidad en esta tesis y son necesarios más estudios para averiguar cuales son las vías de señalización involucradas en los aumentos de C tras la activación de el receptor P2Y₁.

El Ca²⁺ intracelular podría estar relacionado con los efectos de aumento de la C ejercidos por el 2-MeS-ADP y los dinucleótidos Ap₃A y Ap₄A. Los incrementos de la C producidos por el 2-MeS-ADP y los dinucleótidos Ap₃A y Ap₄A se pueden observar a la concentración de 10⁻⁶M, a la cual los incrementos en el Ca²⁺ intracelular que provocan sólo son en un porcentaje de las células. Es interesante comentar el hecho que en la musculatura lisa, incrementos generalizados de Ca²⁺ (como los provocados por el ATP) causan contracción, mientras que aumentos localizados de Ca²⁺ (*sparks*) tienen un efecto vasodilatador (Jaggar, 2000). En este sentido hay que recordar que los incrementos de Ca²⁺ generados por el 2-MeS-ADP, el Ap₃A y el Ap₄A son más discretos que los producidos por el ATP o el Up₄U. Por otro lado, en células no excitables, los incrementos de Ca²⁺ pueden modular componentes de la señalización por AMPc activando o inhibiendo ciertos tipos de adenilato ciclasa (AC) (Bruce, 2003), de manera que los incrementos de Ca²⁺ causados por el 2-MeS-ADP o los dinucleótidos podrían modular el sistema AC y ejercer un efecto sobre la C. En ciertos tejidos, como la musculatura lisa, los dinucleótidos polifosfato provocan un incremento de AMPc (Sumiyoshi, 1997), de manera que también existe la posibilidad que el Ap₄A provoque una acumulación de AMPc en las células trabeculares. De hecho, estudios recientes muestran que el aumento del AMPc en las células trabeculares provoca una disminución del volumen celular (Srinivas, 2004). Además, se ha demostrado que tanto las sustancias que elevan el AMPc en las células de la red trabecular así como aquellas que disminuyen el volumen celular de las mismas, provocan aumentos en la facilidad de evacuación (Erickson-Lamy, 1992; O'Donnell, 1995; Gilabert, 1997; Gual, 1997; Al-Aswad, 1999). Por otro lado, en otros tejidos se han descrito receptores P2Y₁ acoplados al sistema NO/GMPc donde, actuando sobre células endoteliales, median vasodilatación (Buvinic, 2002). Además se ha descrito activación de la NOS dependiente de Ca²⁺ en células endoteliales (Ralevic, 1998). Finalmente, los dinucleótidos polifosfato en ciertos tipos celulares provocan síntesis de NO (Hilderman,

1998). Cabe destacar que a nivel de la fisiología de la evacuación del humor acuoso, la activación del sistema NO/GMPc provoca un aumento de la C (Kotikoski, 2003).

Independientemente de las vías intracelulares que se desencadenan en las células trabeculares al activarse el receptor P2Y₁, se plantea cual es el mecanismo fisiológico responsable de los cambios en la C. Como se ha explicado en la introducción, existen varios mecanismos que tienen un papel importante en la función trabecular como los cambios en la composición de la matriz extracelular (Tian, 2000), la variación de la expresión génica (Borrás, 2003), la modificación de la forma celular (Gills, 1998) o los involucrados en la regulación del volumen celular (Al-Aswad, 1999). Cabría la posibilidad de que tanto el 2-MeS-ADP, como el Ap₄A o el Ap₃A de una manera más lenta, actuasen sobre alguno de estos parámetros provocando los efectos sobre la C, por ejemplo actuando sobre el volumen celular tal y como se ha demostrado para otros compuestos. Los agonistas de adenosina reducen la IOP, en parte por un aumento en el drenaje de humor acuoso (Crosson, 2001) y la estimulación de receptores de adenosina A₁, A_{2A} y A₃ reduce el volumen de las células trabeculares (Fleischhauer, 2003). La posibilidad de que la estimulación del P2Y₁ por el 2-MeS-ADP o el Ap₄A desencadene un mecanismo de actuación similar no debe ser descartada.

Podría ser que la activación del P2Y₁ modulara ciertos sistemas efectores de la regulación del volumen celular presentes en las células trabeculares, como por ejemplo el sistema cotransportador Na⁺/K⁺/2Cl⁻. Este cotransportador es un determinante del volumen celular (Haas, 2000) y se ha visto que su actividad se encuentra inhibida en las células trabeculares por compuestos como la bumetanida o neurotransmisores como la noradrenalina o la acetilcolina (O'Donnell, 1995), habiéndose correlacionado la inhibición del cotransportador con aumentos en la C (Al-Aswad, 1999). Existen varios estudios dónde se ha demostrado en distintos tipos celulares que la activación purinérgica por parte de receptores P2Y provoca una inhibición del sistema cotransportador Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (Orlov, 1999, Brindikova, 2003). De esta manera, la activación del receptor purinérgico P2Y₁ presente en las células trabeculares podría participar en la regulación del volumen celular modulando la acción del cotransportador Na⁺/K⁺/2Cl⁻, aunque se necesitarían más estudios para ver si esto sucede y cuáles son los mecanismos exactos de actuación.

Extrapolación de resultados entre el modelo bovino y humano

En la mayoría de los estudios realizados en este trabajo de tesis, el modelo utilizado ha sido el bovino por la dificultad en la obtención de muestras humanas, sin embargo, también se han utilizado células trabeculares humanas (HTMs). Los estudios realizados sobre las HTMs son de gran importancia, ya que las diferencias interespecie hacen que los resultados no siempre pueden ser extrapolables. Es necesario comprobar si ciertos mecanismos y vías de señalización se encuentran conservados en las dos especies, pues cabe la posibilidad que el tejido trabecular humano tenga unas características, aunque muy parecidas, ligeramente diferentes en cuanto a la expresión de canales y receptores o en cuanto a sus afinidades. Estas diferencias deben ser tenidas en cuenta, sin duda, al extrapolar los resultados de un modelo a otro.

Al comparar los resultados obtenidos en los dos modelos se observan ciertas diferencias, como por ejemplo en el efecto del ATP sobre la $[Ca^{2+}]_i$. En HTMs, el porcentaje de respuesta y la cantidad de Ca^{2+} movilizada tras la aplicación de ATP son inferiores que los mostrados por las células BTMs a las mismas concentraciones (Figura 4.3 y Tablas 4.1 y 4.1). Esta menor respuesta por parte de las células HTMs puede ser atribuida a un envejecimiento de las células en cultivo. Las células HTMs utilizadas en estos estudios procedían de donantes de avanzada edad y se utilizaron en cultivo entre el pase tercero y quinto. Por lo tanto, la disminución de la respuesta que se observa podría ser debida a un descenso paulatino en la cantidad de receptores a lo largo de los días que las células permanecen en cultivo. Se ha descrito recientemente que la respuesta a agonistas purinérgicos se encuentra alterada en células trabeculares senescentes (Chow, 2005). La pérdida de receptores purinérgicos con los diferentes pases en cultivo puede causar la disminución de la señalización ERK, vía involucrada en la proliferación celular y estimulada en células trabeculares por activación de receptores P2Y (Crosson, 2004), lo que se traduciría en una disminución en la tasa de replicación celular y una limitación del potencial proliferativo, hecho que se produce en las células trabeculares humanas en cultivo (Schachtschabel, 1990). Otra posibilidad es que las células humanas dispongan de una respuesta cuantitativamente menor frente a los agonistas purinérgicos como se ha podido observar en estudios con células trabeculares humanas procedentes de una línea celular donde la respuesta máxima es menor en comparación con células bovinas (Crosson, 2004).

Respecto a las corrientes de K^+ moduladas por el ATP extracelular también se ven diferencias entre las células HTMs y las BTMs. Es interesante destacar que la densidad de corriente en las HTMs es la mitad aproximadamente que en las BTMs. En otros trabajos, la magnitud de las corrientes mediadas por el BK_{Ca} en BTMs son iguales a las encontradas en este trabajo (Stumpff, 1997) y al igual que ocurre aquí, estos mismos autores encuentran que las corrientes en células HTMs mediadas por el BK_{Ca} en condiciones control son menores que en BTMs (Stumpff, 2001). Más aún, tal y como ocurre en este trabajo de tesis, donde el porcentaje de activación del BK_{Ca} por ATP es menor en HTMs (148%) que en BTMs (216%), en otros trabajos sustancias que activan este mismo canal como el ácido flufenámico, provocan una menor activación en HTMs que en BTMs (Stumpff, 2001). En la misma línea hay que destacar que las corrientes de Cl^- mediadas por el canal $ClC-2$ son inferiores en HTMs que en BTMs (Comes, 2005b).

En resumen, en este trabajo se ha demostrado la existencia de diferentes tipos de receptores purinérgicos funcionales en las células de la red trabecular que activan vías de señalización distintas. A pesar de la caracterización de los receptores $P2Y_2$ y $P2Y_4$, el estudio detallado de las vías intracelulares que activan tras su estimulación con ATP y la modulación de corrientes iónicas, no se ha podido dilucidar un papel funcional detallado y se necesitan investigaciones posteriores para averiguar cual es el papel de estos receptores en la función trabecular. Sin embargo, en este trabajo se ha demostrado la importancia del receptor $P2Y_1$ presente en las células trabeculares en la modulación de la facilidad de evacuación. El hecho que diferentes sustancias incrementen la facilidad de evacuación mediante la estimulación de este receptor invita a un mayor estudio sobre sus implicaciones funcionales, para así, investigar las posibilidades del receptor como diana farmacológica en el tratamiento de enfermedades como el glaucoma.