



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Departament de Ciències Fisiològiques I
Laboratori de Neurofisiologia**

TESI DOCTORAL

***Caracterització electrofisiològica del canal de K^+
d'alta conductància dependent de Ca^{2+} (BK_{Ca}) a la
cèl·lula trabecular: modulació per l'stretch i la
hipòxia***

Elisa Ferrer i Mallol

Caracterització electrofisiològica del canal de K⁺ d'alta conductància dependent de Ca²⁺ (BK_{Ca}) a la cèl·lula trabecular: modulació per l'*stretch* i la hipòxia

Tesi presentada per ELISA FERRER i MALLOL per optar al grau de Doctor en Farmàcia per la Universitat de Barcelona.

Barcelona,

Directors: Arcadi Gual i Sala, Xavier Gasull i Casanova

Agraïments

Durant el decurs d'aquesta tesi moltes han estat les persones que en un moment o altre m'han donat suport, bons consells o simplement m'han escoltat. Persones que en definitiva han estat al meu costat i sense les quals aquest treball hagués estat molt més difícil de realitzar. Seria impossible anomenar-les totes, per això només citaré les que han estat implicades de manera més directa en aquest treball.

En primer lloc el meu més sincer agraïment als meus directors de tesi, els doctors Xavier Gasull i Arcadi Gual. Els consells de l'Arcadi han significat un punt de referència per mi i m'han ajudat a prendre decisions en moments importants. Sincerament, moltíssimes gràcies.

Des del dia que vaig arribar al laboratori fins avui mateix, el Xavi ha estat al meu costat donant-me el suport necessari per tirar aquest treball endavant. T'agraeixo sobretot la confiança que sempre m'has demostrat i els bons moments que hem passat dins i fora del laboratori.

Els meus companys de laboratori, Artur, Núria, David, Miguel, Azu i el Dr. Jordi Palés, amb els quals he passat molt bones estones i he compartit les alegries i les penes de la recerca. Gràcies a tots perquè no hagués estat el mateix sense vosaltres, de debó.

Els meus amics tots sense excepció han demostrat una paciència infinita escoltant els meus maldecaps de la tesi. L'Anahí i el Carlos per una banda, i la Gemma, la Paloma i la Esther, per l'altre, han estat les meves principals "víctimes". Gràcies pels ànims i sobretot per la vostra amistat. Gràcies també al Xavier pel seu recolzament durant els anys compartits amb mi.

También quiero agradecer con mucho cariño a Marta el haber sido capaz de convivir conmigo (y haber sobrevivido en el intento) durante los últimos meses de la tesis, sin duda los más intensos. Eskerrik asko, neska.

I want to especially thank Dr. Edgar T. Walters for the encouragement provided during the latest stage of this thesis. Without his kind support and understanding would have been impossible to combine the work in the lab with the writing of this dissertation. Thanks so much, Terry.

Finalment, vull dedicar de tot cor aquest treball als meus pares i també a la meva padrina, que sempre han recolzat totes les tasques que m'he proposat i han confiat en les decisions que he prè al llarg de la meva vida.

A tots, moltes gràcies i molts petons.

Elisa

ÍNDEX

ÍNDIX

1	Introducció.....	19
1.1	Anatomia i fisiologia oculars	19
1.1.1	Parts del globus ocular.....	19
1.1.2	Anatomia de les cambres oculars	21
1.1.3	L'angle iridocornial	23
1.1.3.1	La xarxa trabecular.....	24
1.1.3.2	El canal d'Schlemm.....	25
1.2	Humor aquós.....	26
1.2.1	Composició de l'humor aquós.....	27
1.2.2	Formació de l'humor aquós	28
1.2.3	Evacuació de l'humor aquós.....	33
1.3	La pressió intraocular (IOP).....	37
1.3.1	Regulació de la IOP.....	38
1.3.2	Alteracions de la IOP: Glaucomes.....	38
1.3.2.1	El glaucoma primari d'angle obert.....	39
1.3.2.2	El glaucoma primari d'angle tancat	41
1.3.2.3	Bases genètiques del glaucoma	44
1.4	La cèl·lula trabecular	45
1.4.1	Poblacions cel·lulars de la xarxa trabecular.....	45
1.4.2	Contractilitat de la cèl·lula trabecular	46
1.4.3	Regulació del volum cel·lular.....	49
1.4.4	Canals identificats a les cèl·lules de la xarxa trabecular	50
1.5	Canal de K⁺ d'alta conductància dependent de Ca²⁺ (BK_{Ca}).....	53
1.5.1	Característiques electrofisiològiques del BK_{Ca}.....	54
1.5.2	Moduladors del BK_{Ca}.....	55
1.5.2.1	Activadors i bloquejants del BK _{Ca}	55
1.5.2.2	Augment de tensió de la membrana (<i>stretch</i>)	56
1.5.2.3	Hipòxia	57
1.6	Hipòxia.....	60
1.6.1	Efectes sobre el calci intracel·lular	61
1.6.2	Efectes sobre el citoesquelet d'actina	62
2	Objectius.....	67
3	Material i mètodes	71
3.1	Cultiu primari de cèl·lules trabeculars	71
3.2	Registres electrofisiològics	72
3.3	Registre del calci intracel·lular	75
3.4	Immunocitoquímica	77
3.5	Anàlisi de dades i mètodes estadístics	77
4	Resultats	83

4.1	Caracterització de la cèl·lula trabecular	83
4.2	Caracterització electrofisiològica del BK _{Ca}	84
4.2.1	Voltatge-dependència	84
4.2.2	Activació pel calci intracel·lular.....	86
4.3	Modulació del BK _{Ca}	88
4.3.1	Augment de la tensió de la membrana (<i>stretch</i>)	88
4.3.1.1	Efecte de l' <i>stretch</i> mecànic sobre el BK _{Ca}	88
4.3.1.2	Efecte de l' <i>stretch</i> sobre la sensibilitat al voltatge del BK _{Ca}	90
4.3.1.3	Efecte de l' <i>stretch</i> sobre l'activació del BK _{Ca} pel calci.....	92
4.3.2	Estimulació mecànica per xoc hipotònic	94
4.3.2.1	Efecte del medi hipotònic sobre els corrents totals	94
4.3.2.1.1	Efecte del medi hipotònic sobre la constant d'activació (τ).....	98
4.3.3	Modulació del BK_{Ca} per la hipòxia	99
4.3.3.1	Efecte de la hipòxia sobre els corrents totals.....	99
4.3.3.1.1	Cèl·lules normòxiques	99
4.3.3.1.2	Cèl·lules hipòxiques	103
4.3.3.1.3	Cèl·lules normòxiques vs cèl·lules hipòxiques	105
4.3.3.2	Efecte de la hipòxia sobre la constant d'activació (τ).....	106
4.4	Efecte de la hipòxia sobre el calci intracel·lular	109
4.4.1	Efecte de la hipòxia sobre el calci basal.....	109
4.4.2	Efecte de la hipòxia sobre la resposta a bradikinina.....	112
4.4.3	Efecte de la hipòxia sobre la resposta a endotel·lina-1.....	116
4.4.4	Efecte de la hipòxia sobre la resposta a BK i ET-1 a les cèl·lules trabeculars humanes.....	119
4.5	Efecte de la hipòxia sobre el citoesquelet d'actina	124
5	Discussió	129
6	Conclusions.....	143

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1.1	Parts de l'ull	20
Figura 1.2	Cambres oculars	22
Figura 1.3	L'angle iridocornial.....	23
Figura 1.4	La xarxa trabecular.....	24
Figura 1.5	Fluxe de l'humor aquós	26
Figura 1.6	Formació i evacuació de l'humor aquós	32
Figura 1.7	Pas de l'humor aquós a través de la via convencional.....	34
Figura 1.8	Tipus de glaucoma	43
Figura 3.1	Configuracions dels registres de <i>patch-clamp</i>	73
Figura 4.1	Expressió heterogènica de l'actina α de múscul llis a les cèl·lules trabeculars	83
Figura 4.2	Característiques biofísiques del canal BK _{Ca} a les cèl·lules trabeculars...	85
Figura 4.3	Activació del canal BK _{Ca} pel Ca ²⁺ intracel·lular.....	87
Figura 4.4	Activació del canal BK _{Ca} per l' <i>stretch</i> mecànic	89
Figura 4.5	Efecte de l' <i>stretch</i> sobre la sensibilitat al voltatge del BK _{Ca}	91
Figura 4.6	Efecte de l' <i>stretch</i> sobre l'activitat del BK _{Ca} a una concentració de Ca ²⁺ constant	93
Figura 4.7	Corrents de sortida del BK _{Ca} en configuració de cèl·lula sencera	96
Figura 4.8	Efecte de la hipotonicitat sobre els corrents del BK _{Ca}	97
Figura 4.9	Efecte de la hipotonicitat sobre la constant d'activació del BK _{Ca}	98
Figura 4.10	Efecte de la hipòxia sobre els corrents del BK _{Ca} a les cèl·lules trabeculars normòxiques	100
Figura 4.11	Efecte de la hipòxia sobre la densitat de corrent del BK _{Ca} a les cèl·lules trabeculars normòxiques.....	102
Figura 4.12	Efecte de la hipòxia sobre els corrents del BK _{Ca} a les cèl·lules trabeculars hipòxiques.....	104
Figura 4.13	Efecte de la hipòxia crònica sobre els corrents basals del BK _{Ca}	105
Figura 4.14	Efecte de la hipòxia sobre la constant d'activació del BK _{Ca} a les cèl·lules trabeculars normòxiques.....	107
Figura 4.15	Efecte de la hipòxia sobre la constant d'activació del BK _{Ca} a les cèl·lules trabeculars normòxiques.....	108
Figura 4.16	Efecte de la hipòxia sobre la concentració basal de Ca ²⁺ intracel·lular...	111
Figura 4.17	Efecte de la hipòxia sobre la resposta a bradikinina 10 ⁻⁶ M a les cèl·lules trabeculars bovines	115

Figura 4.18 Efecte de la hipòxia sobre la resposta a endotel·lina-1 10^{-8} M a les cèl·lules trabeculars bovines	118
Figura 4.19 Efecte de la hipòxia sobre la resposta a bradikinina 10^{-6} M a les cèl·lules trabeculars humanes	121
Figura 4.20 Efecte de la hipòxia sobre la resposta a endotel·lina-1 10^{-8} M a les cèl·lules trabeculars humanes	123
Figura 4.21 Efecte de la hipòxia sobre el citoesquelet d'actina de les cèl·lules trabeculars	125

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1.1 Composició de l'humor aquós	28
Taula 4.1 Efecte de la hipòxia sobre la mobilització del $[Ca^{2+}]_i$ en resposta a bradikinina 10^{-6} M a les cèl·lules de la xarxa trabecular bovina	114
Taula 4.2 Efecte de la hipòxia sobre la mobilització del $[Ca^{2+}]_i$ en resposta a endotel·lina-1 10^{-8} M a les cèl·lules de la xarxa trabecular bovina.....	117
Taula 4.3 Efecte de la hipòxia sobre la mobilització del $[Ca^{2+}]_i$ en resposta a bradikinina 10^{-6} M a les cèl·lules de la xarxa trabecular humana.....	120
Taula 4.4 Efecte de la hipòxia sobre la mobilització del $[Ca^{2+}]_i$ en resposta a endotel·lina-1 10^{-8} M a les cèl·lules de la xarxa trabecular humana	122

