

MATERIAL I MÈTODES

3 Material i mètodes

3.1 *Cultiu primari de cèl·lules trabeculars*

Aquest estudi s'ha realitzat utilitzant ulls de vedella de 3 a 6 mesos d'edat, enucleats a l'escorxador, entre 1 i 3 hores després del sacrifici de l'animal. Un cop enucleats, els ulls se submergeixen en solució salina (PBS, Phosphated Buffered Saline) a 4°C i pH 7.42, que conté antibiòtics i antifúngics per evitar contaminacions (penicil·lina 50 UI/ml, estreptomina 50 µg/ml i amfotericina B 5 µg/ml).

Abans de procedir al cultiu primari, els globus oculars es disseccionen a la cabina de flux horitzontal eliminant tant la conjuntiva com els músculs oculars externs del globus ocular. Després es biseccionen equatorialment per extreure el trabècul de la part anterior. El segment posterior es descarta i s'utilitza el segment anterior d'on s'eliminen les estructures de la úvea (iris i cos ciliar) i el cristal·lí. El segment anterior ocular conté intactes les estructures d'evacuació de la via convencional (xarxa trabecular i canal d'Schlemm).

El cultiu de les cèl·lules trabeculars es va realitzar mitjançant una modificació de la tècnica descrita anteriorment per Stamer i col·laboradors (Stamer *et al.*, 1995). Un cop disseccionat el globus ocular, s'extreuen tires de teixit trabecular de 0.3 a 0.5 mm d'ample i es renten 3 vegades durant 10 minuts en solució salina en fred (PBS: Phosphated Buffered Saline, 4°C) amb antibiòtics: penicil·lina 100 UI/ml, estreptomina 100µg/ml i amfotericina B 2.5 mg/ml (Sigma). Un cop rentades, es procedeix a la digestió enzimàtica amb col·lagenasa 2 mg/ml i albúmina sèrica bovina 0.5 mg/ml (BSA) (Sigma) a 37°C durant 2 hores. Posteriorment es realitza una digestió mecànica amb pipetes Pasteur de diferents diàmetres. El sobrenedant es recull, se centrifuga durant 10 minuts a 1000 r.p.m. i es resuspèn en medi de cultiu (DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium) amb sèrum boví fetal al 10%, antibiòtics (penicil·lina 100 UI/ml, estreptomina 100 µg/ml i amfotericina B 2.5 mg/ml) i L-glutamina 100 mg/ml (Sigma). La solució resuspesa es col·loca en flascons o plaques de cultiu a un incubador a 37°C i 5% CO₂ en aire, on generalment s'observa creixement als 2 a 4 dies i confluència als 12-15 dies. En els experiments on es mesurava l'efecte de la hipòxia crònica, les cèl·lules trabeculars es feien créixer en un incubador amb un 5% O₂. Pels passes de cultiu es va utilitzar tripsina-EDTA. Pels registres electrofisiològics, registres de calci intracel·lular i immunocitoquímica es van utilitzar cèl·lules des del primer fins el tercer passe.

3.2 *Registres electrofisiològics*

Pels registres electrofisiològics amb la tècnica de *patch-clamp*, les cèl·lules trabeculars es van cultivar en petits cobreobjectes (1 x 0.5 cm) i es van estudiar durant les 24-48 hores següents. Els cobreobjectes es van col·locar en una cambra de 0.2 ml de volum a la platina d'un microscopi invertit (IX70; Olympus), equipat amb perfusió continua per gravetat amb un flux de 3-4 ml/min. Els registres es van realitzar a temperatura ambient (21-23 °C). Les pipetes de *patch* es van elaborar a partir de capil·lars de vidre, mitjançant un estirador de pipetes (P-97; Sutter Instruments), que proporciona resistències d'entre 3 i 6 MΩ. Tant l'elèctrode de registre com el de referència són fil·laments de Ag/AgCl. Abans d'introduir la pipeta al bany, s'aplica pressió positiva fins que aquesta entra en contacte amb la cèl·lula. Per formar la unió d'alta resistència o *gigaseal* s'aplica pressió negativa (succió) i un cop formada es neutralitza la capacitància de la pipeta.

Els corrents en configuració de canal únic es van registrar seguint el procediment de Hamill i col·laboradors (Hamill *et al.*, 1981) utilitzant un amplificador de *patch clamp* Heka L/M-EPC7 (Heka), en les configuracions *cell-attached* i *inside-out* (Figura 3.1). L'adquisició de dades i els potencials de membrana es van controlar amb el software WinWCP 2.1 i PAT 7.4 (John Dempster, University of Strathclyde, UK) utilitzant una targeta digitalitzadora A/D CED1401 (Cambridge Electronic Design Ltd.). Els corrents de canal únic es van registrar a 20kHz, filtrar a 3kHz (*low pass*) i emmagatzemar en un ordinador per analitzar-ho posteriorment. El potencial de membrana es va fixar a 0 mV (això correspon al potencial de repòs de la cèl·lula) i es van aplicar polsos despolaritzants o hiperpolaritzants. Els potencials fixats que es refereixen en aquest estudi són els valors originals que es mostraven a l'amplificador i no es van corregir pel *liquid junction potential*, degut a que l'error introduït per aquest paràmetre és molt petit a l'efectuar-se el registre en solucions que contenen Cl⁻ i elèctrodes Ag/AgCl. En aquestes configuracions, els corrents d'entrada a la pipeta es consideren positius (sortida d'ions positius a través de la membrana).

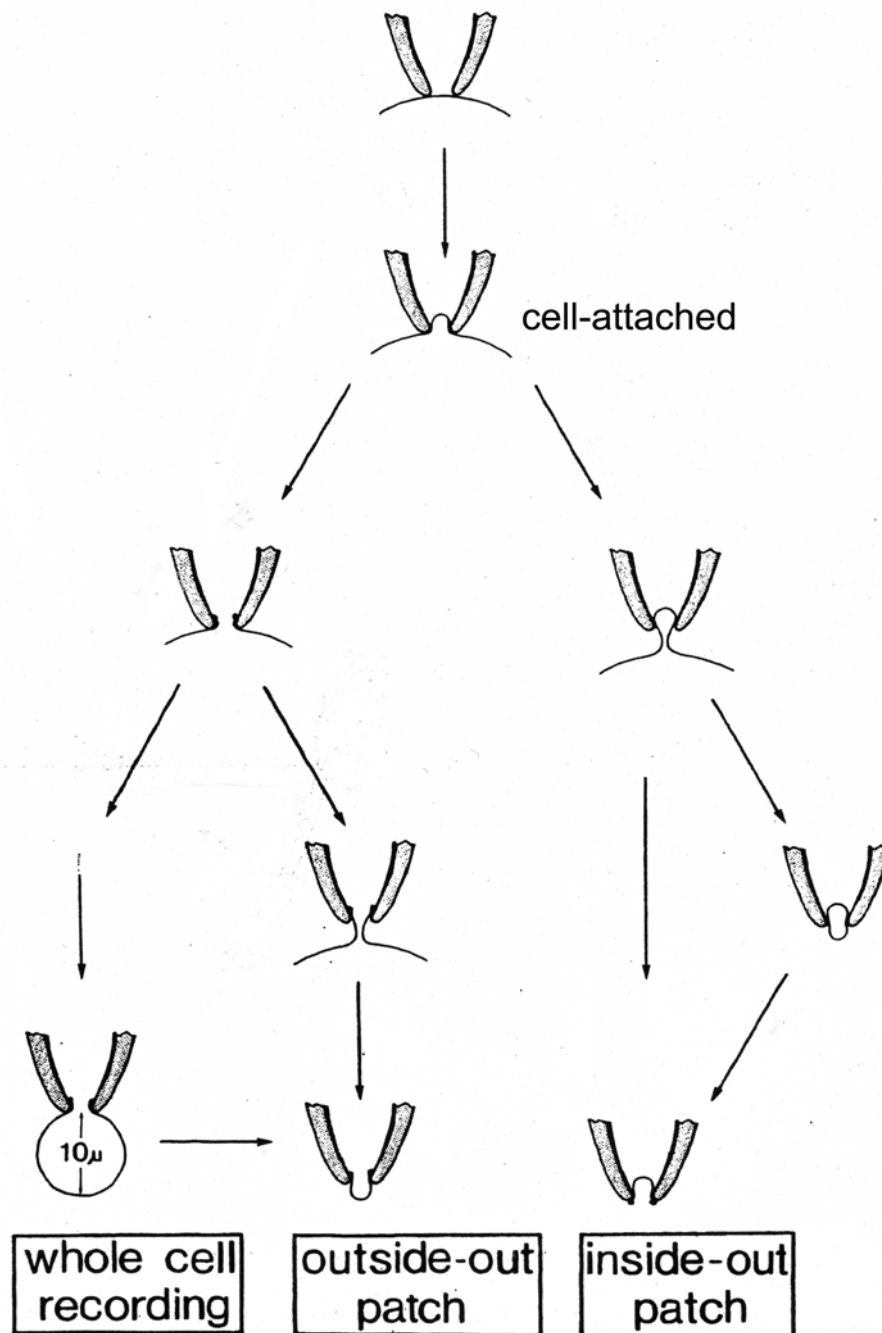


Figura 3.1. Esquema de les configuracions dels registres de *patch-clamp*. Un cop la pipeta està en contacte amb la cèl·lula, l'aplicació d'una lleugera pressió negativa forma la unió d'alta resistència o *gigaseal*, arribant a la configuració *cell-attached*, que és el punt de partida per arribar a les altres configuracions. L'aplicació de succió porta al trencament del *patch* assolint-se la configuració de cèl·lula sencera (*whole-cell*). En canvi, l'escissió del *patch* de la membrana, condueix a la configuració *inside-out* on la cara interior de la membrana està exposada a la solució de registre del bany. Modificat de Hamill i col·laboradors (Hamill *et al.*, 1981).

L'amplitud del canal en estat obert es va calcular per cada potencial utilitzant histogrames. La probabilitat d'obertura del canal (NP₀) es va calcular mitjançant la següent expressió:

$$NP_0 = \frac{(A_1 + 2A_2 + 3A_3 + \dots + NA_N)}{(A_0 + A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_N)}$$

on A₀ es l'àrea sota la corba de l'histograma d'amplituds corresponent al corrent en estat tancat i A₁...A_N representa l'àrea sota la corba dels histogrames dels diferents nivells de corrent del canal en estat obert per 1 fins a N canals presents en el *patch*. L'anàlisi de les dades recollides es va realitzar mitjançant el programa PAT 7.4, amb el qual podem obtenir els histogrames de freqüències corresponents als diferents estats del canal. A partir dels histogrames, ajustem les dades a una regressió gaussiana per obtenir l'àrea sota la corba dels diferents estats del canal.

En els experiments en configuració de canal únic (mode *cell-attached*), la solució fisiològica del bany tenia la següent composició (mM): NaCl 140, KCl 4.3, CaCl₂ 1.3, MgCl₂ 1, HEPES 10 a pH 7.4 ajustat amb NaOH. La solució de la pipeta de *patch* era una solució d'alt K⁺ (mM): KCl 140, MgCl₂ 2, EGTA 2, HEPES 12 a pH 7.4 ajustat amb KOH. Quan s'escindien els *patches* en el mode *inside-out*, on la cara interior de la membrana està en contacte amb el bany, la solució del bany es bescanviava per solucions de la mateixa composició que la de la pipeta però on l'EGTA se substituïa per diferents concentracions de CaCl₂ (1, 5 i 20 μM). Quan la solució de la pipeta s'utilitzava com a solució del bany (amb EGTA o amb les diferents concentracions de CaCl₂), la concentració de K⁺ era igual a ambdós costats de la membrana (simètrica).

Els experiments en configuració de cèl·lula sencera (*whole-cell*) es van realitzar sota les mateixes condicions experimentals que els experiments en configuració de canal únic. Un cop establerta la configuració de *cell-attached* es va aplicar succió per trencar el *patch* de membrana i assolir la configuració de cèl·lula sencera. L'aparició de transients capacitius corresponents a la capacítància de la membrana plasmàtica indiquen aquesta configuració. Els transients capacitius es van compensar mitjançant el sistema de compensació de l'amplificador. El valor de capacítància indicat a l'amplificador es va anotar per utilitzar-lo posteriorment per la normalització de les corrents, doncs és proporcional al tamany de la cèl·lula. La succió aplicada per trencar el *patch* es va mesurar i va ser sempre menys de 10 mm Hg (6±2

mm Hg). Un cop en la configuració de cèl·lula sencera, les cèl·lules es deixaven dialitzar i estabilitzar durant 3-4 minuts abans de començar el registre. Els corrents totals es registraven a 10 kHz. El corrent de *leak* i el corrent capacitatiu residual se sostreien utilitzant un protocol P/N on N era igual a -4. El potencial de membrana es fixava a -60 mV i s'aplicaven polsos despolaritzants en increments de 10 mV per evocar els corrents de sortida de K⁺. En els registres de *whole-cell*, la solució a la pipeta era la següent (mM): KCl 140, MgCl₂ 2, EGTA 0.1, HEPES 10 a pH 7.2 ajustat amb KOH. La solució del bany era la mateixa solució fisiològica utilitzada en els experiments de *cell-attached* (301±5.1 mOsm/Kg; mitja±SD). La solució hipotònica (213±4.8 mOsm/Kg; mitja±SD) es va preparar amb concentracions reduïdes de NaCl i KCl (mM): NaCl 100, KCl 2, CaCl₂ 1.3, MgCl₂ 1, HEPES 10 (pH 7.4 ajustat amb NaOH). Els corrents de sortida de K⁺ es bloquejaven amb iberiotoxina (IBTX 50 nM), bloquejant específic dels canals BK_{Ca}.

En els experiments d'*stretch* mecànic, s'aplicava una pressió negativa de succió a la part posterior de la pipeta amb una xeringa calibrada. La succió es controlava amb un transductor de pressió (9162-0, Mallinckrodt), calibrat amb un manòmetre d'aigua.

En els experiments que mesuraven l'efecte de la hipòxia sobre el BK_{Ca}, les condicions d'hipòxia s'assolien bombollejant N₂ durant 30 minuts a la solució externa fisiològica. Els nivells d'hipòxia, 30-40 mm Hg, es mesuraven amb un elèctrode d'oxigen calibrat.

3.3 Registre del calci intracel·lular

Pels registres de calci intracel·lular, les cèl·lules es cultiven en cobreobjectes de 25 mm de diàmetre durant 48-72 hores, seguint el procediment explicat anteriorment. Posteriorment, es renten amb tampó d'incubació (NaCl 121 mM, HEPES 10 mM, NaHCO₃ 5 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2 mM, glucosa 10 mM i BSA 0.01% a pH 7.4, equilibrat amb NaOH) i s'incuben a 37°C durant 25 minuts amb el colorant ratiomètric Fura-2 acetoximetil éster 4 µM. Per eliminar el Fura-2 que les cèl·lules no incorporen, es renten els cobreobjectes amb tampó d'incubació i posteriorment es col·loquen a la cambra de registre, col·locada en un microscopi invertit d'epifluorescència (Nikon Diaphot). Durant el registre es va utilitzar un objectiu d'immersió de fluor (40x) i la cambra es va mantenir a 37°C. Les imatges de fluorescència es van obtenir amb una càmera CCD CH250 (Photometrics, Tucson, AZ), es van digitalitzar, emmagatzemar i analitzar mitjançant un ordinador.

Després d'un període d'estabilització de 10 minuts, els parells d'imatges es van obtenir cada 4 segons durant 8 minuts, a les longituds d'ona d'excitació de 340 i 380 nm (filtres d'ample de banda de 10 nm) per registrar el calci unit al colorant i el calci lliure respectivament. La longitud d'ona d'emissió va ser de 510 nm (filtre d'ample de banda de 120 nm). Les concentracions de calci intracel·lular ($[Ca^{2+}]_i$) es van calcular individualment per cada cèl·lula a partir de la relació dels valors de fluorescència a les longituds d'ona de 340 a 380 nm.

En aquestes condicions es van realitzar tres tipus de tractaments:

a) Xoc hipotònic: Després d'un minut en condicions isotòniques, la solució del bany es va canviar per una solució hipotònica, elaborada mitjançant una modificació de la solució tampó descrita amb anterioritat. Aquesta solució contenia: NaCl 80 mM, KCl 2.3 mM, $NaHCO_3$ 5 mM, HEPES 1.2 mM i BSA 0.01% (pH 7.4, amb NaOH; 205 ± 3 mOsm/kg). En els experiments control, les cèl·lules es van perfundir amb solució isotònica (287 ± 2 mOsm/kg). Tant en els controls com en els grups experimentals, es va registrar el Ca^{2+} durant el primer minut en condicions isotòniques. Posteriorment es va canviar la solució i es van registrar els nivells de Ca^{2+} durant 7 minuts.

b) Hipòxia aguda: La solució hipòxica utilitzada consistia en una solució fisiològica (mM): NaCl 140, KCl 4.3, $CaCl_2$ 1.3, $MgCl_2$ 1, HEPES 10 (a pH 7.4 ajustat amb NaOH) a la qual se li bombollejava N_2 durant 30 minuts. Després d'aquest temps, el grau d'hipòxia assolit era d'uns 30-40 mmHg, mesurats amb un elèctrode d'oxigen.

c) Addició de diferents drogues: Les drogues utilitzades en els registres de Ca^{2+} intracel·lular van ser les següents: bradikinina-acetat (10^{-6} M) i endotel·lina-1 (10^{-8} M). Es preparaven amb una concentració 50 vegades superior a la concentració final i s'afegien petites al·líquotes directament al bany. En aquests experiments es va avaluar el percentatge de resposta a cada droga, l'amplitud de l'increment de $[Ca^{2+}]_i$ i la presència d'oscil·lacions de calci. Un cop assolida la màxima $[Ca^{2+}]_i$ es va calcular el t_{70} , que representa la recuperació del 70% de l'increment de $[Ca^{2+}]_i$ assolit mitjançant l'addició de la droga. Aquestes dades es mostren com la mitja i l'error estàndard de la mitja (mitja \pm SEM).

En cada cas els increments de $[Ca^{2+}]_i$ es van considerar per anàlisi quan aquest increment era superior al 100% del calci basal. Si l'increment era inferior es considerava que la cèl·lula no responia al tractament.

3.4 *Immunocitoquímica*

La immunocitoquímica per la tinció de l'actina- α de múscul llis i la desmina es va fer seguint la tècnica descrita prèviament per altres autors (Flügel *et al.*, 1991). Les cèl·lules trabeculars es feien créixer fins a semiconfluència en cobreobjectes circulars, els quals es rentaven per un total de 15 minuts en tampó fosfat (PBS) pre-escalfat a 37°C. Posteriorment les cèl·lules es fixaven amb metanol 100% a -20°C durant 4 minuts i s'afegia l'anticòs primari, que s'incubava en cambra fosca i humida a la nevera durant 12 hores. L'anticòs primari per la desmina era un anticòs policlonal desenvolupat en conill (dil·lució 1:100 en PBS + BSA a l'1%) i per l'actina α de múscul llis es va utilitzar un anticòs monoclonal de ratolí (dil·lució 1:200 en PBS + BSA a l'1%). Passades les 12 hores, es rentaven els cobreobjectes amb PBS i es procedia a la fixació de l'anticòs secundari en cambra fosca i temperatura ambient durant una hora. L'anticòs secundari es rentava amb PBS i es fixaven els nuclis amb iodur de propidi (1 μ g/ml) dil·luït en una solució de PBS i BSA a l'1% durant un minut. Per evitar que el iodur de propidi s'uneixi inespecíficament a l'RNA citoplasmàtic, previ a la fixació es tractaven les cèl·lules amb RNAasa A (100 μ g/ml) en PBS i BSA a l'1%. Finalment les cèl·lules es rentaven amb PBS i es montaven en portaobjectes amb glicerina. Les preparacions es visualitzaven en un microscopi comfocal.

Per la tinció de l'actina total s'utilitzaven igualment cèl·lules trabeculars en semiconfluència crescudes en cobreobjectes circulars, els quals es rentaven per un total de 15 minuts en tampó fosfat (PBS) pre-escalfat a 37°C. La tinció es va dur a terme amb una falotoxina fluorescent, faloidina unida a rodamina a dil·lució 1:1000, en una solució amb 1% d'albumina sèrica bovina. Prèviament les cèl·lules es fixaven amb una solució de paraformaldehid a l'1% en tampó fosfat (PBS) durant 10 minuts a temperatura ambient. Els nuclis es tenyien amb DAPI a dil·lució 1:400 en la mateixa solució que contenia la falotoxina. La incubació es duia a terme en cambra humida i opaca a temperatura ambient durant 30 minuts. Després de rentar els cobreobjectes durant 15 minuts amb PBS, es van muntar en portaobjectes amb Mowiol al 50% en PBS. Les preparacions es visualitzaven en un microscopi de fluorescència.

3.5 *Anàlisi de dades i mètodes estadístics*

En els registres electrofisiològics, els resultats es donen com a mitja \pm SEM. Els resultats es van analitzar estadísticament amb la prova de la t d'Student aparellada o no aparellada. Per avaluar les diferències estadístiques entre els registres control i els efectes de la succió sobre l'activitat del canal i per comparar els efectes de les

solucions isotònica, hipotònica i hipòxica, es va utilitzar una prova d'anàlisi de la variança (ANOVA) i es va aplicar la correcció de Bonferroni. Les diferències significatives es van establir com: $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) i $P < 0.001$ (***)

Els registres de calci intracel·lular es van analitzar mitjançant el test de Fisher per calcular les diferències en la resposta a les diferents drogues i la *t* d'Student per avaluar les diferències entre els diferents grups. Els valors de significació són els detallats anteriorment.

La constant d'activació (τ_{act}) utilitzada per mesurar l'efecte de la hipotonicitat i de la hipòxia sobre els corrents mitjançats pel BK_{Ca} , es va calcular ajustant la fase creixent dels corrents totals a una funció exponencial simple: $y = y_0 + Ae^{-(x-x_0)/\tau}$, segons un mètode descrit anteriorment (McManus, 1991).