

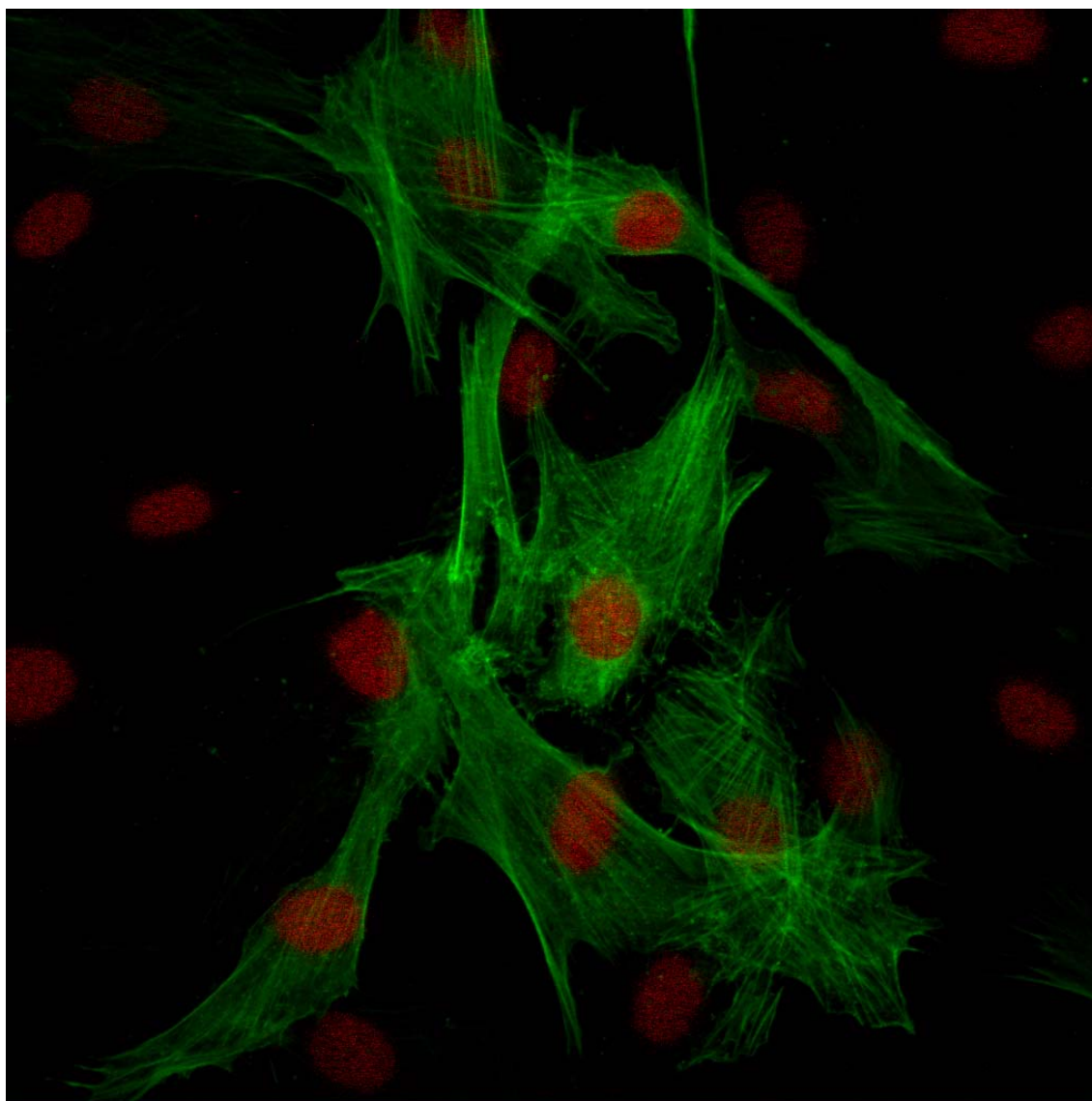
# **RESULTATS**

---

## 4 Resultats

### 4.1 Caracterització de la cèl·lula trabecular

Un cop establerts els cultius primaris de cèl·lules trabeculars es va procedir a la caracterització immunocitoquímica dels mateixos. D'acord amb la literatura, les cèl·lules de la xarxa trabecular, exhibeixen un patró de marcatge positiu per l'actina  $\alpha$  de múscul llis i negatiu per la desmina, proteïna del citoesquelet (Tamm *et al.*, 1996). En un 8% de les cèl·lules es va observar marcatge positiu per l'actina  $\alpha$  de múscul llis. El marcatge per la desmina va ser negatiu. Aquests resultats corroboren el descrit anteriorment i permeten considerar els cultius satisfactoris.



**Figura 4.1.** Expressió heterogènia de l'actina  $\alpha$  de múscul llis (en verd) a les cèl·lules de la xarxa trabecular bovina en cultiu. Els nuclis de les cèl·lules es van tenyir amb iodur de propidi (en vermell).

## 4.2 Caracterització electrofisiològica del BK<sub>Ca</sub>

En estudis previs en cèl·lules de la xarxa trabecular bovina o humana, s'havia demostrat la presència del BK<sub>Ca</sub>, de manera indirecta mitjançant mesures del potencial de membrana (Coroneo *et al.*, 1991; Lepple-Wienhues *et al.*, 1994) o de manera directa, mitjançant la tècnica de *patch-clamp* (Stumpff *et al.*, 1997).

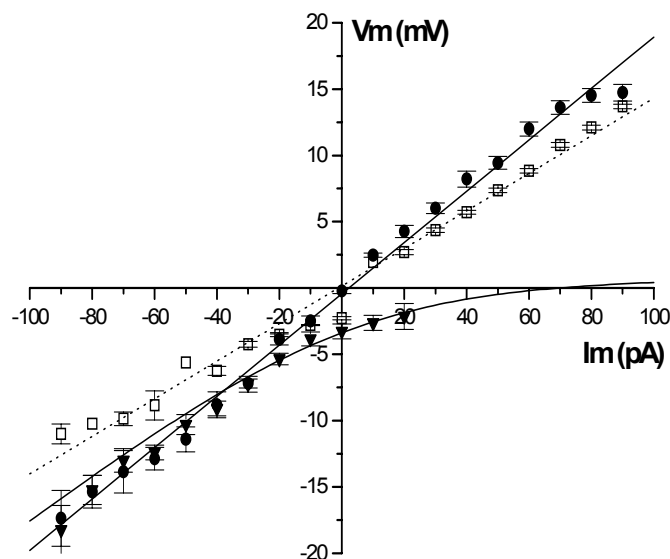
### 4.2.1 Voltatge-dependència

Per identificar la presència del canal BK<sub>Ca</sub> a les cèl·lules de la xarxa trabecular bovina, es van realitzar experiments de *patch-clamp* en configuració de canal únic, bé en el mode *cell-attached* o en el mode *inside-out*, el qual permet modificar el contingut citosòlic doncs la cara citoplasmàtica de la membrana queda exposada al medi extracel·lular. Els experiments en *cell-attached* es van realitzar amb una concentració de potassi a la pipeta ( $[K^+]_o$ ) 140 mM i solució fisiològica al bany. En aquestes condicions la relació corrent-voltatge és lineal amb una conductància de  $142 \pm 4$  pS ( $n=31$ , Fig 4.2A). Donat que en la configuració *cell-attached* es desconeix la concentració de K<sup>+</sup> a l'interior de la cèl·lula, la conductància és en aquest cas aproximada. En els experiments en *inside-out*, la concentració de K<sup>+</sup> era la mateixa a ambdós costats de la membrana ( $[K^+]_{o,i}$  140 mM), el que va permetre calcular una conductància de  $193 \pm 3$  pS ( $n=10$ ; Fig 4.2A). Aquests valors són inferiors als descrits per altres autors (Stumpff *et al.*, 1997) i es poden explicar perquè aquells experiments es van dur a terme a 37°C.

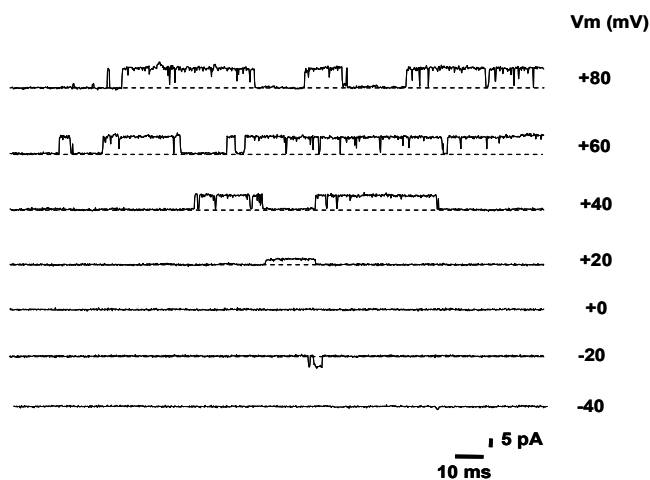
El potencial de reversió del canal en condicions de potassi simètric era pròxim a zero, l'esperat en condicions simètriques de potassi si el canal és selectiu per aquest ió. Mantenant la mateixa configuració, però canviant la solució del bany per solució fisiològica, la relació  $[K^+]_o : [K^+]_i$  era 140:4.3 mM. En aquestes condicions el canal mostrava una rectificació constant que es corresponia amb la corba generada amb l'equació de Goldman-Hodgkin-Katz ( $n=3$ , Fig 4.2A). Aquest fet mostrava que el canal era altament selectiu pel K<sup>+</sup> i exclouïa la participació d'altres ions, com el Cl<sup>-</sup>.

En conjunt, els experiments presentats aquí mostren que el canal identificat en la membrana de les cèl·lules trabeculars és un canal voltatge-dependent que s'obre en condicions fisiològiques per despolarització del potencial de membrana, que té una conductància lineal en concentracions simètriques de potassi i que mostra una rectificació de Goldman quan les concentracions no són simètriques. Aquestes característiques estan d'acord amb la bibliografia prèvia i permeten concloure que el canal identificat és un canal de potassi voltatge-dependent d'alta conductància.

**A**



**B**



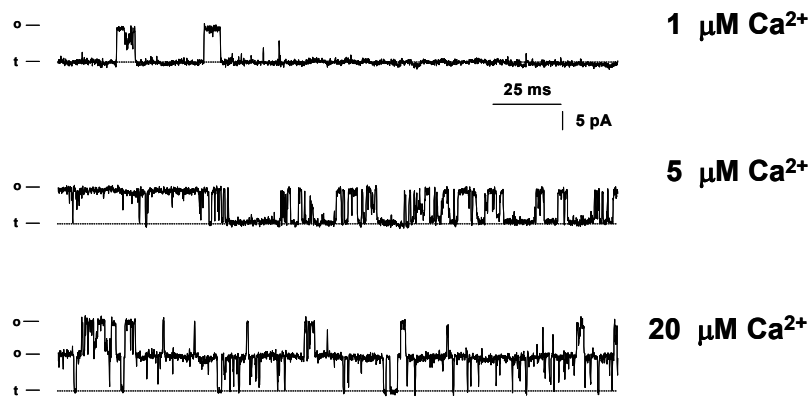
**Figura 4.2.** Característiques biofísiques del canal  $BK_{Ca}$  a les cèl·lules de la xarxa trabecular. **A:** Relació corrent-voltatge pel canal  $BK_{Ca}$  a diferents  $[K^+]$ . Ens els experiments en *cell-attached* es va utilitzar una  $[K^+]_o$  de 140 mM (□) (n=31) a la pipeta i solució fisiològica al bany. La línia de punts representa la regressió lineal dels experiments en *cell-attached*. Els experiments en la configuració *inside-out* es van realitzar amb 140 mM  $[K^+]_{o,i}$  (●) (n=10) o 4.3 mM  $[K^+]_i$  (▼) (n=3). Les línies contínues mostren els experiments en *inside-out* en forma de regressió lineal i ajustats a l'equació de Goldman-Hodgkin-Katz. **B:** Corrents del  $BK_{Ca}$  en la configuració *cell-attached* a diferents voltatges en les mateixes condicions descrites a A. Els voltatges es representen com  $-V_p$  ( $V_p$ : voltatge de la pipeta). El nivell zero de corrent està representat per la línia de punts. Es pot observar que el canal s'obre "cap amunt", que es com es visualitzen els corrents de  $K^+$  dirigits cap a l'interior de la pipeta (sortida de  $K^+$  a través de la membrana de la cèl·lula).

#### **4.2.2 Activació pel calci intracel·lular**

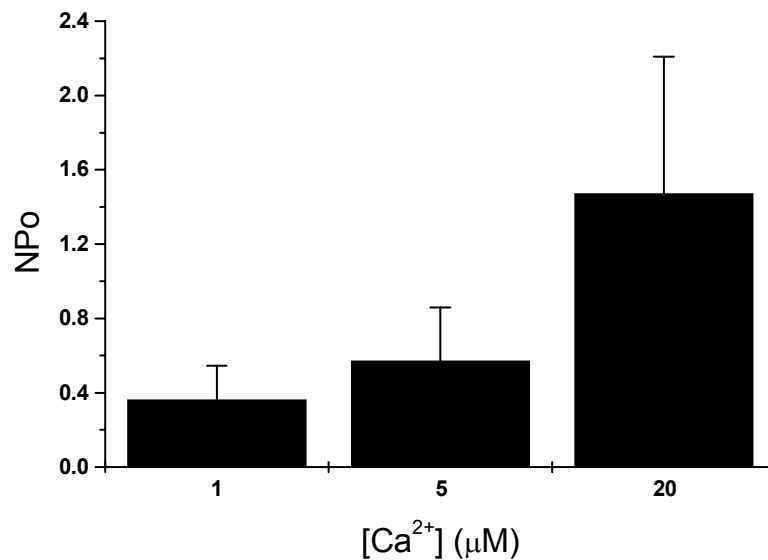
Degut a que el canal BK<sub>Ca</sub> s'ha descrit com un canal de K<sup>+</sup> regulat per la concentració de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular, es va estudiar si la variació en la concentració de Ca<sup>2+</sup> modifica l'obertura del canal mitjançant el registre de la NPo en presència de diferents concentracions de Ca<sup>2+</sup> a la banda citoplasmàtica del canal. Per avaluar la dependència del calci es va utilitzar una despolarització de només +40 mV per sobre del potencial de membrana. Si s'utilitzen despolaritzacions molt elevades l'efecte del voltatge emmascara l'efecte del calci.

Per determinar la sensibilitat del canal al calci, es van utilitzar concentracions creixents de Ca<sup>2+</sup> a la cara intracel·lular de la membrana, que en la configuració *inside-out* correspon al bany. En aquestes condicions el canal s'activava a mesura que la concentració de Ca<sup>2+</sup> augmentava. Així, quan la concentració de Ca<sup>2+</sup> era 1 μM i a +40 mV per sobre del potencial de repòs, la probabilitat d'obertura (NPo) del canal era 0.36±0.18 (n=4) (Fig 4.3 A i B). La NPo va incrementar fins a 0.57±0.28 amb una concentració de 5 μM i fins a 1.47±0.73 amb 20 μM de Ca<sup>2+</sup> al bany (p<0.05 per 5 i 20μM vs 1μM Ca<sup>2+</sup>) indicant la dependència del canal pel calci. Aquests resultats concorden amb els prèviament descrits per altres autors (Stumpff *et al.*, 1997).

A



B



**Figura 4.3. A:** Corrents del BK<sub>Ca</sub> en configuració de canal únic (*inside-out*) registrades a diferents [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> amb concentració simètrica de K<sup>+</sup> a ambdós costats de la membrana, [K<sup>+</sup>]<sub>o,i</sub> 140 mM (n=4). Les cèl·lules es van despolaritzar +40 mV (-V<sub>p</sub>) per sobre del potencial de repòs. Es mostren els estats obert (o) i tancat (t) del canal. **B:** Probabilitat d'obertura (NPO) del canal a diferents [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (n=4 per cada concentració). La NPO incrementava amb la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mostrant la típica resposta del canal BK<sub>Ca</sub>. Els valors de NPO es mostren com la mitja±SEM (n=4) obtinguts de registres de 2 minuts de durada a +40 mV (-V<sub>p</sub>) per sobre del potencial de repòs.

### 4.3 Modulació del BK<sub>Ca</sub>

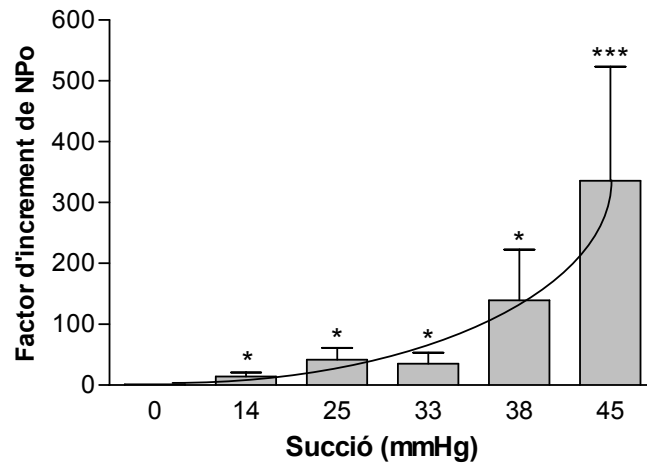
Tal i com s'ha descrit anteriorment, l'activitat del canal BK<sub>Ca</sub> pot ser modulada per diferents factors (Beech, 1997). Aquest treball es concentra en estudiar, per una banda la modulació del canal per augments de tensió de la membrana (*stretch*) provocats per diferents estímuls mecànics i per l'altra, en la resposta del canal enfront la hipòxia. Per estudiar l'efecte d'aquests dos factors es van mesurar els canvis en la probabilitat d'obertura del canal i canvis sobre els corrents de sortida de K<sup>+</sup>, tal i com es descriu en la secció 3.2 del capítol de Material i mètodes.

#### 4.3.1 Augment de la tensió de la membrana (*stretch*)

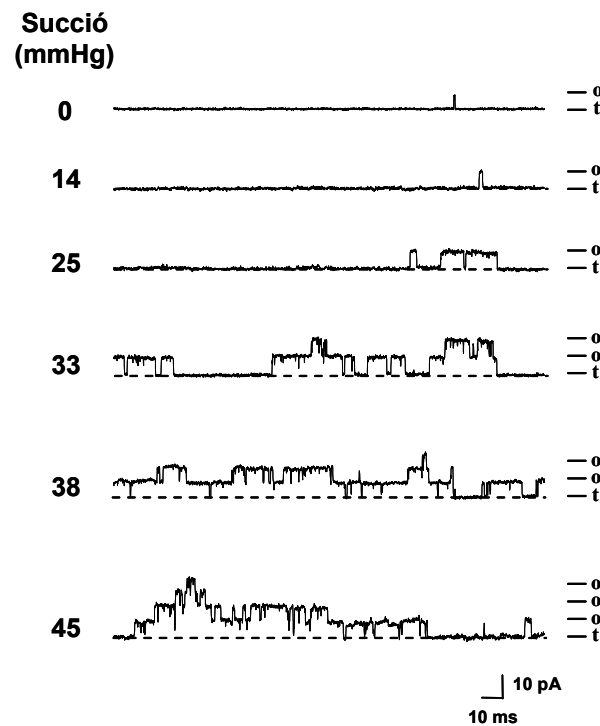
##### 4.3.1.1 Efecte de l'*stretch* mecànic sobre el BK<sub>Ca</sub>

Estudis previs de diferents grups van observar que el canal BK<sub>Ca</sub> s'activava enfront a l'*stretch* mecànic en diferents tipus cel·lulars (Kirber *et al.*, 1992; Davidson, 1993; Dopico *et al.*, 1994; Mienville *et al.*, 1996; Mallouk & Allard, 2000). Un dels mètodes descrits a la literatura per estudiar si un canal és sensible a la tensió de la membrana (*stretch*), es aplicar pressió negativa (succió) mentre es realitza el registre dels corrents del canal mitjançant la tècnica del *patch-clamp* (Sackin, 1995; Hamill & Martinac, 2001). Els estudis preliminars van mostrar que el canal s'obria amb més freqüència a l'aplicar pressió negativa a través de la pipeta de *patch*. Per estudiar aquest fenomen, es van fer registres en la configuració de canal únic, *cell-attached*, a +40 mV (-V<sub>p</sub>) per sobre del potencial de membrana (Figura 4.4 A i B) i es va veure que la NPo del canal augmentava exponencialment amb els valors de pressió aplicats (Fig. 4.4A). Les diferències entre els registres control, amb valors de pressió de 0 mm Hg, i la resta de grups entre 14-45 mm Hg, eren estadísticament significatives (ANOVA, p<0.001). La figura 4.4B mostra un experiment significatiu on la succió va incrementar la NPo del canal. Amb freqüència es va observar l'obertura simultània de dos o més canals. Per confirmar que el canal activat per l'*stretch* de la membrana era efectivament el BK<sub>Ca</sub> al final de cada registre s'escindia el *patch* en solució fisiològica ([K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>: [K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>, 140:4.3 mM) observant-se la rectificació de Goldman-Hodging-Katz (Fig.4.2A). La conductància unitària del canal no es va veure modificada significativament per l'augment de tensió de la membrana, segons l'anàlisi dels corrents en la configuració de canal únic.

**A**



**B**

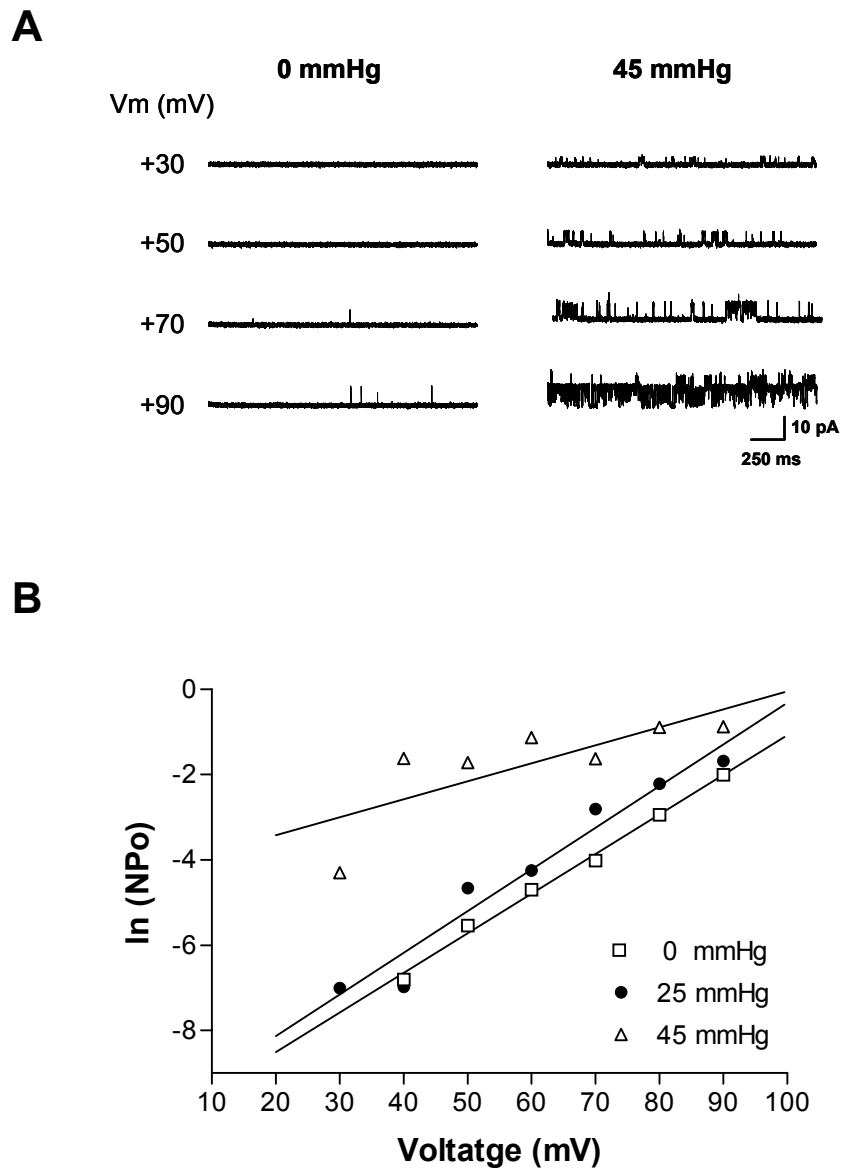


**Figura 4.4.** Activació del canal BK<sub>Ca</sub> per l'augment de tensió de la membrana (*stretch*) en la configuració *cell-attached* a les cèl·lules de la xarxa trabecular. **A:** Es mostra el factor d'increment de la NPo vs la pressió de succió aplicada (mm Hg) a +40 mV (-V<sub>p</sub>) per sobre del potencial de membrana amb una concentració de K<sup>+</sup> a la pipeta de 140 mM. Tots els valors de NPo estan normalitzats a la NPo en absència de succió (0 mm Hg): \* P <0.05 i \*\*\* P <0.001. **B:** Exemple de registres obtinguts amb els experiments realitzats en A. Es mostren els estats obert (o) i tancat (t) del canal.



#### **4.3.1.2 Efecte de l'*stretch* sobre la sensibilitat al voltatge del BK<sub>Ca</sub>**

Una de les possibilitats que s'han postulat per explicar l'efecte de l'*stretch* sobre l'activitat del canal és que l'augment de la tensió de la membrana modifiqui la sensibilitat al voltatge del canal (Singer & Walsh, 1987). Per aquest motiu, es va estudiar l'efecte del voltatge sobre l'activitat del canal en la presència i absència de pressió per avaluar la relació entre els diferents activadors del canal, el voltatge i l'*stretch* (Fig 4.5 A i B). L'activació del canal pel voltatge es descriu mitjançant l'equació de Boltzmann, on la representació del logaritme neperià del producte del nombre de canals presents en el *patch* (N) i la probabilitat de que un únic canal estigui obert (P<sub>o</sub>) en funció del voltatge, ha de ser lineal a valors baixos de P<sub>o</sub> (Singer & Walsh, 1987). El recíproc del pendent, que es considera una mesura de la sensibilitat al voltatge, es el potencial necessari per produir un increment d' e vegades (*e-fold*) en la P<sub>o</sub> a valors baixos de P<sub>o</sub>. Es van comparar dos valors de pressió de succió, 25 i 45 mm Hg amb l'absència de succió (0 mm Hg). A 25 mm Hg, l'activació mitjançant succió no va afectar la sensibilitat al voltatge del canal (10.24 mV vs 10.77 mV) per un augment d'e vegades en la NP<sub>o</sub> en presència i absència de 25 mm Hg de succió, (Fig 4.5B) però va incrementar l'activitat del canal per un factor multiplicatiu constant. La sensibilitat al voltatge del canal, però, es va veure afectada per l'*stretch* quan es van aplicar 45 mm Hg de pressió (Fig 4.5B) essent de 23.72 mV per un augment d'e vegades en la NP<sub>o</sub>. Aquest resultat es pot atribuir a que a 45 mm Hg la NP<sub>o</sub> és alta i a que es perd la linearitat de la NP<sub>o</sub> versus el voltatge. A la Fig.4.5A es mostra un experiment on el nombre d'obertures del canal augmenta tant per la succió aplicada com pels voltatges despolaritzants.

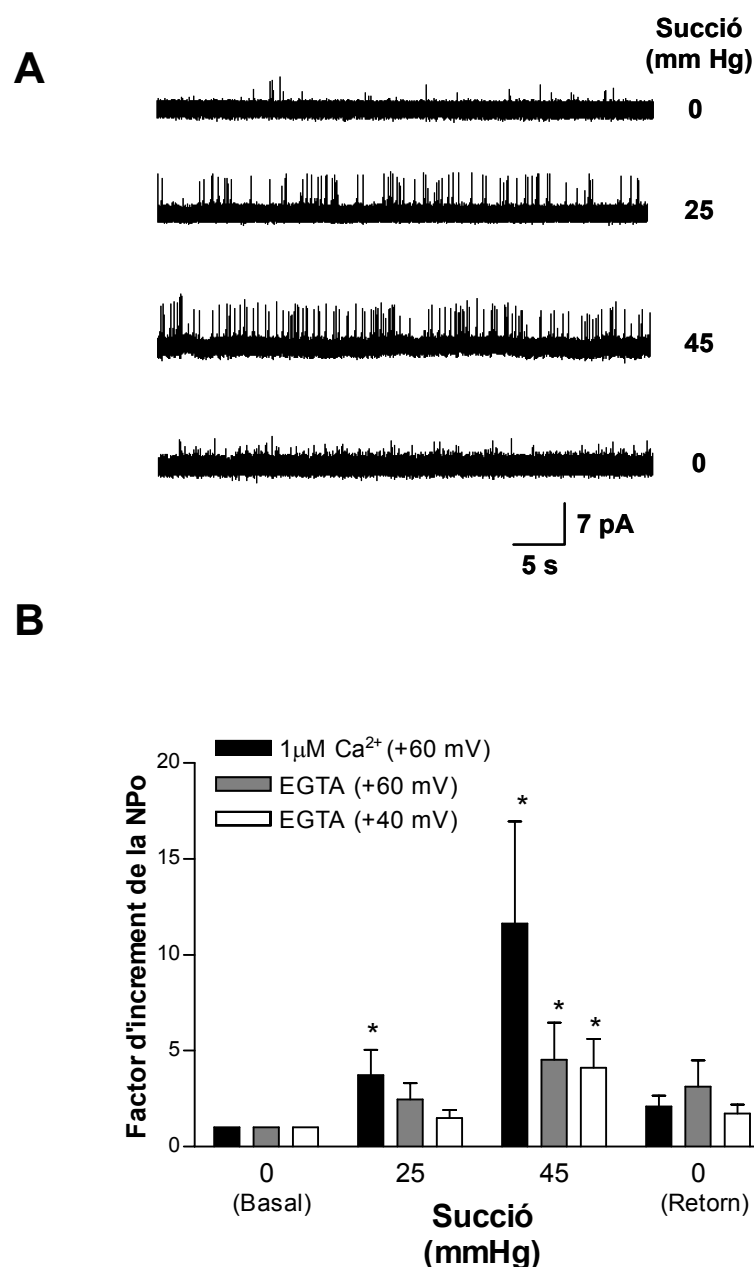


**Figura 4.5.** Efecte de l'*stretch* sobre la sensibilitat al voltatge. **A:** Registres a quatre voltatges (+30 a +90 mV) a 0 mmHg (control) i a 45 mmHg. El voltatge es mostra com  $-V_p$ . En aquests registres la succió es va mantenir constant durant l'aplicació dels polsos de voltatge. En les condicions control es va registrar com el canal s'obria breument. A 45 mmHg el nombre d'obertures augmenta significativament. **B:** En ordenades es mostra logaritme neperià de la NPo vs el voltatge aplicat en abcises ( $-V_p$ ). Cada punt representa la mitja dels diferents registres de cada grup. ( $\square$ )  $n=12$ ; ( $\bullet$ )  $n=12$ ; ( $\triangle$ )  $n=6$ .

#### **4.3.1.3 Efecte de l'*stretch* sobre l'activació del BK<sub>Ca</sub> pel calci**

Com es sabut, l'activitat del canal BK<sub>Ca</sub> es veu incrementada pel Ca<sup>2+</sup>, per tant calia descartar que l'activació observada per l'*stretch* de la membrana fos deguda a una possible activació del canal per un augment en la concentració del Ca<sup>2+</sup> intracel·lular (provinent dels dipòsits intracel·lulars o del medi extracel·lular). Es van realitzar experiments en la configuració *inside-out* per així poder mantenir constant la concentració intracel·lular de Ca<sup>2+</sup> i avaluar si la sensibilitat a l'*stretch* es manté quan la concentració de Ca<sup>2+</sup> no varia. Un cop assolida la configuració de *cell-attached* el *patch* s'escindia en la mateixa solució de la pipeta, que contenia 1 µM Ca<sup>2+</sup>, amb o sense EGTA (2 mM).

A una concentració constant de Ca<sup>2+</sup>, l'aplicació de pressió a 25 i 45 mm Hg incrementava el nombre d'obertures (Fig. 4.5A). L'activació del canal per l'*stretch* era reversible i l'absència de pressió retornava la NPo als valors basals (0 mm Hg) (Fig. 4.6 A i B). Quan la concentració de Ca<sup>2+</sup> (en presència d'EGTA) era baixa, la NPo era també baixa, però l'activitat del canal encara es veia induïda per l'*stretch*.



**Figura 4.6.** Activació del canal BK<sub>Ca</sub> per l'*stretch* de la membrana en *patches inside-out* amb concentració simètrica de K<sup>+</sup> (140 mM) a ambdós costats de la membrana. **A:** Exemple de registres realitzats a +60 mV per sobre del potencial de repòs (-V<sub>p</sub>: voltatge de la pipeta) on la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> era constant (Ca<sup>2+</sup> nominal era zero més EGTA 2mM). Els registres mostren com el canal s'obre "cap amunt". Des del registre superior a l'inferior es van aplicar succesivament valors de pressió de 0, 25, 45 i 0 mmHg. **B:** En ordenades es mostra el factor d'increment de la NPo versus la succió aplicada per les diferents condicions experimentals: +40 mV o +60 mV (per sobre del potencial de repòs). Cada columna representa el promig (mitja ± SEM) de cinc *patches inside-out* per cada grup: Ca<sup>2+</sup> 1μM a +60 mV, Ca<sup>2+</sup> nominal zero més EGTA 2mM a +60 mV i Ca<sup>2+</sup> nominal zero més EGTA 2mM a +40 mV. Tots els resultats es van normalitzar amb el valor de la NPo a 0 mmHg.

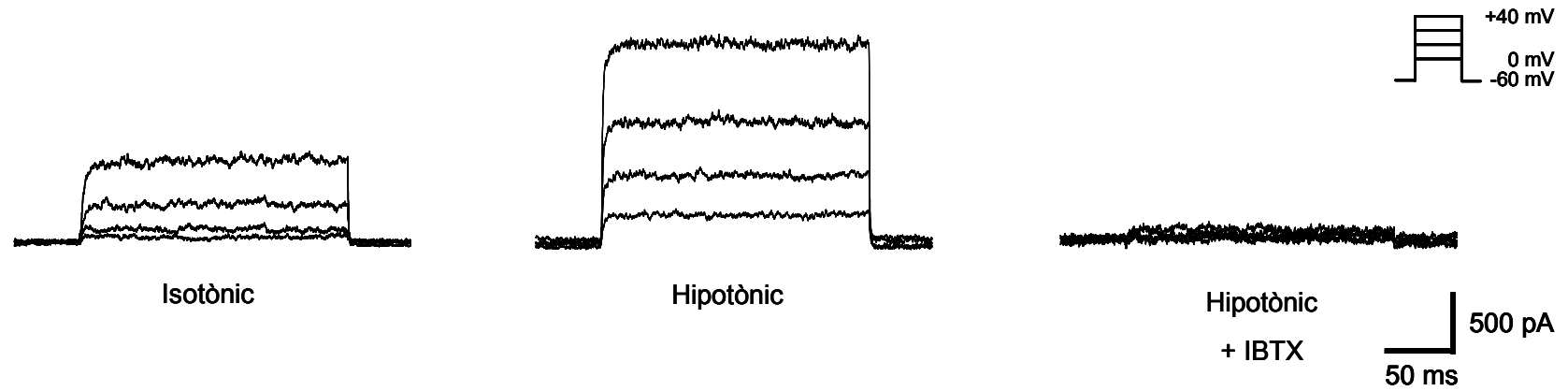
### 4.3.2 Estimulació mecànica per xoc hipotònic

Un altre mètode per estimular mecànicament la membrana es basa en sotmetre les cèl·lules a un xoc hipotònic, mitjançant el qual la cèl·lula s'infla i això produeix un augment de la tensió de la membrana. Aquest mètode s'ha utilitzat anteriorment en altres tipus cel·lulars (Christensen & Hoffmann, 1992; Davidson, 1993; Vanoye & Reuss, 1999). A les cèl·lules de la xarxa trabecular es va investigar l'efecte del xoc hipotònic sobre els corrents totals mitjançats pel BK<sub>Ca</sub>. El xoc hipotònic pot augmentar la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> i activar així el BK<sub>Ca</sub>. Per excloure aquesta possibilitat es van dur a terme experiments de mobilització del calci intracel·lular. Es van incubar les cèl·lules amb el reactiu fluorescent Fura-2, tal i com s'ha descrit en el capítol Material i mètodes. Les cèl·lules es van col·locar a la cambra de registre i es van monitoritzar les [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> durant set minuts després de perfundir-les amb la solució tampó isotònica (control; 287±2 mOsm/kg; mitja ± SD) o amb tampó hipotònic (205±3 mOsm/kg; mitja ± SD). En les condicions control (tampó isotònic) només un 3% de les cèl·lules (n=73) van incrementar la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> de 57±3 a 138±5 nM (mitja ± SEM), mentre que la resta (97%) no va modificar el calci basal significativament. Pel que fa a la solució tampó hipotònica, la perfusió va produir un increment de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en un 9% de les cèl·lules (n=85) de 58±3 a 147±5 nM, que no va ser significatiu quan es va comparar amb la resposta de les cèl·lules a la solució control. Amb aquests resultats es va poder descartar que els efectes del xoc hipotònic sobre el canal BK<sub>Ca</sub> es produïssin per l'activació del canal pel calci intracel·lular.

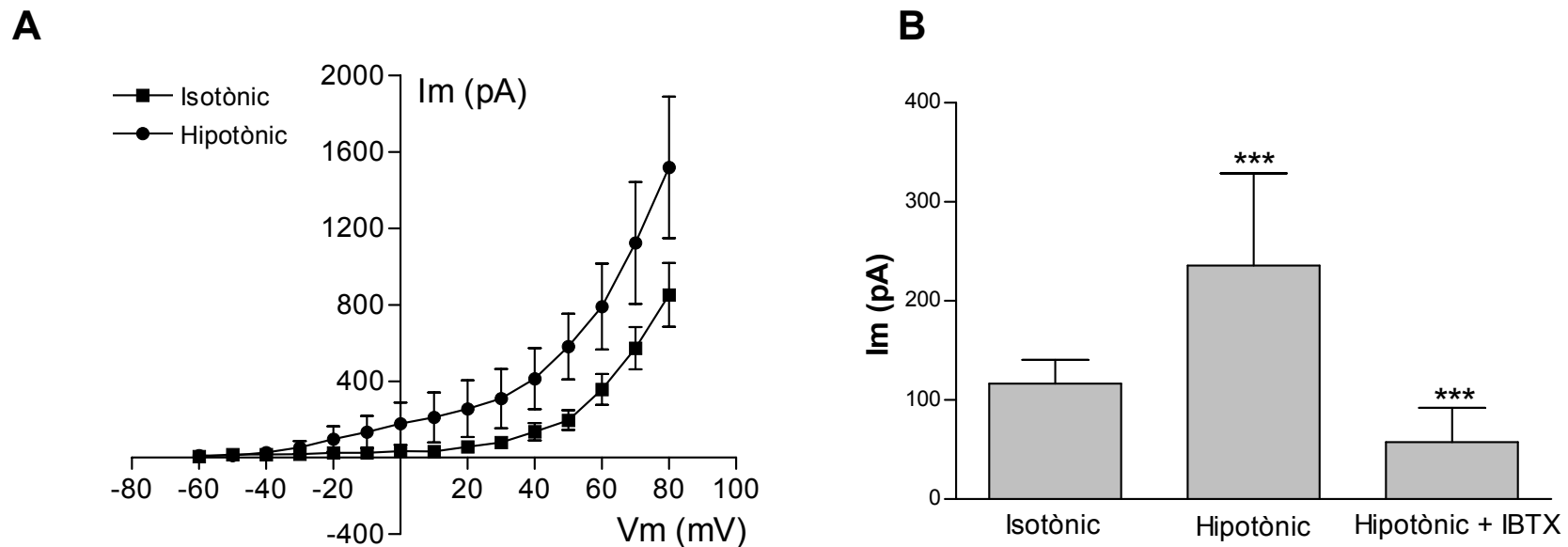
#### 4.3.2.1 Efecte del medi hipotònic sobre els corrents totals

Com s'ha dit anteriorment, el xoc hipotònic es una altra manera d'augmentar la tensió de la membrana. En aquestes condicions es van estudiar els corrents de sortida de K<sup>+</sup> mitjançades pel BK<sub>Ca</sub> amb registres electrofisiològics en la configuració de cèl·lula sencera (Figura 4.7). Les característiques electrofisiològiques dels corrents registrats a les cèl·lules trabeculars en configuració de cèl·lula sencera, coincideixen amb les descrites anteriorment pels canal tipus BK<sub>Ca</sub> (Stumpff *et al.*, 1997). L'activació d'aquests canals produeix corrents de sortida de K<sup>+</sup> al despolaritzar la membrana cel·lular, que s'activen de forma exponencial fins a assolir un *plateau*. A més, els corrents mediat pel BK<sub>Ca</sub> no s'inactiven mentre es manté el potencial despolaritzant. Aquestes característiques trobades en els corrents registrats a les cèl·lules trabeculars fan pensar que la majoria del corrent registrat està mitjançat per aquest canal. Tal i com es mostra a la figura 4.7, primer es van registrar els corrents totals en solució

isotònica (control), després la solució del bany es va canviar per solució hipotònica i posteriorment es va afegir iberiotoxina 50 nM (IBTX), bloquejant específic del canal  $BK_{Ca}$ , al medi hipotònic. Per evocar els corrents de sortida de  $K^+$ , el potencial de les cèl·lules es va fixar a -60 mV i es van aplicar polsos despolaritzants fins a +80 mV en increments de 10 mV. En 14 de 17 dels experiments realitzats en aquesta configuració (82% de les cèl·lules) el corrents totals de sortida van incrementar significativament (ANOVA  $P < 0.001$ ) en el medi hipotònic respecte del medi isotònic per tot el rang de voltatges. Es va aplicar la correcció de Bonferroni i es van veure diferències significatives a +70 i +80 mV ( $P < 0.05$  i  $P < 0.001$ , respectivament) entre el grup isotònic i l'hipotònic. Les 3 cèl·lules restants no van mostrar canvis significatius. La figura 4.8 mostra la relació corrent-voltatge en condicions isotòniques i hipotòniques. Els corrents de  $K^+$  en condicions hipotòniques s'activen a voltatges més baixos que en condicions control. Per una mesura més acurada de les diferències entre ambdós grups, es van normalitzar els valors de corrent per la capacítància de la cèl·lula. Els resultats van ser els mateixos que pels valors de corrent sense corregir ( $P < 0.001$ , two-way ANOVA).



**Figura 4.7.** Experiment representatiu en configuració *whole-cell* on es mostren els corrents de sortida del  $BK_{Ca}$  a les cèl·lules de la xarxa trabecular. Es van aplicar polsos de voltatge de 200 ms de durada des de -60 mV (voltatge fixat) en increments de 10 mV. Es mostren els polsos de 0 a + 40 mV. En condicions hipotòniques els corrents de sortida augmenten significativament.

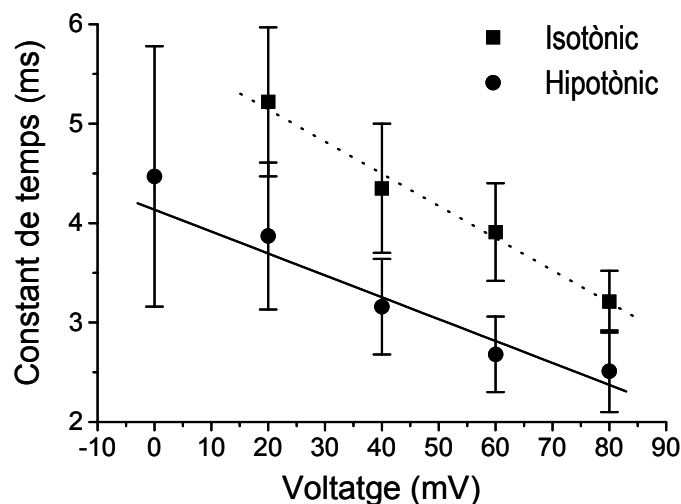


**Figura 4.8. A:** Corbes corrent-voltatge que mostren els corrents de sortida de  $K^+$  en la configuració de cèl·lula sencera. En abcises es mostra el voltatge de la membrana ( $V_m$ ) i en ordenades el corrent de la membrana ( $I_m$ ). El potencial de membrana de la cèl·lula es va mantenir a  $-60$  mV ( $V_m$ ). Els experiments es van dur a terme amb solució fisiològica al bany i solució d'alt potassi ( $140$  mM  $K^+$ ) a la pipeta. Les osmolaritats del medi isotònic i de l'hipotònic eren respectivament,  $301$  mOsm/kg ( $n=11$  cèl·lules) i  $213$  mOsm/kg ( $n=11$ ). Els corrents de sortida del  $BK_{Ca}$  en medi hipotònic van incrementar significativament respecte els corrents en medi isotònic ( $P<0.001$ , two-way ANOVA). **B:** Efecte del medi isotònic ( $n=17$ ) i del medi hipotònic sol ( $n=17$ ) o amb IBTX  $50$  nM ( $n=6$ ), sobre els corrents de sortida del  $BK_{Ca}$  a  $+10$  mV.



#### 4.3.2.1.1 Efecte del medi hipotònic sobre la constant d'activació ( $\tau$ )

Tal i com s'ha descrit a la literatura (McManus, 1991; Yazejian *et al.*, 2000), es poden utilitzar dos paràmetres per caracteritzar els corrents mitjançats pel BK<sub>Ca</sub>: 1) la fracció de canals en una població donada que s'obren en resposta a un potencial determinat i 2) les constants de temps a la qual els canals s'activen i es desactiven. Donat que el nombre de canals es difícil d'estimar, es va mesurar l'efecte de la hipotonicitat sobre els corrents de K<sup>+</sup> mitjançant la constant d'activació ( $\tau_{act}$ ) (Figura 4.9). Per obtenir la  $\tau_{act}$  s'ajusta la fase ascendent dels corrents totals a una funció exponencial simple, tal i com s'especifica al capítol Material i mètodes. A la gràfica es mostren els voltatges als quals s'activen els corrents, des de 0 a +80 mV i les regressions lineals d'ambdós grups (isotònic,  $r^2 = 0.99$  i hipotònic,  $r^2 = 0.96$ ). La regressió lineal per la  $\tau_{act}$  en el medi hipotònic era significativament més ràpida que en el medi isotònic ( $P < 0.01$ , two-way ANOVA) per tots els voltatges mesurats (+20 a +80 mV). No es van obtenir dades a 0 mV en el medi isotònic, perquè gairebé no es va veure activació del corrent per aquest voltatge. L'augment de tensió de la membrana provocat pel xoc hipotònic va tenir el mateix efecte sobre la  $\tau_{act}$  que un increment en la  $[Ca^{2+}]_i$  a la cara citoplasmàtica del canal (McManus, 1991; Yazejian *et al.*, 2000).



**Figura 4.9.** Constants d'activació dels corrents del BK<sub>Ca</sub> en medi isotònic i en medi hipotònic. Es mostren les regressions lineals per la  $\tau_{act}$  en forma de línia de punts pel medi isotònic ( $r^2 = 0.99$ ) i en línia contínua per l'hipotònic ( $r^2 = 0.96$ ). Cada punt mostra les mitjanes  $\pm$  SEM per un total de 15 cèl·lules.

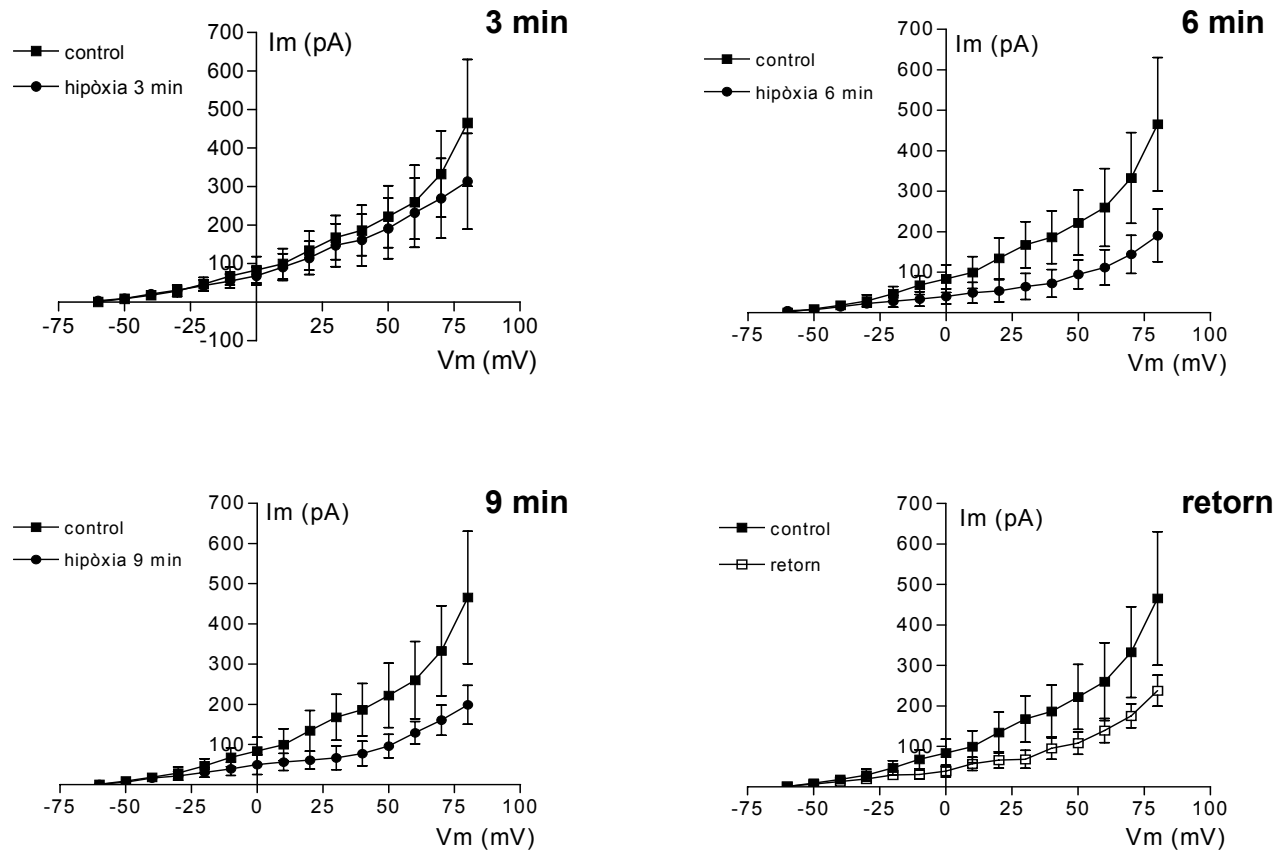
### 4.3.3 Modulació del BK<sub>Ca</sub> per la hipòxia

#### 4.3.3.1 Efecte de la hipòxia sobre els corrents totals

Diferents estudis han demostrat la modulació del BK<sub>Ca</sub> per la hipòxia, bé augmentant l'activitat del canal (Gebremedhin *et al.*, 1994) o bé disminuint-la (Liu *et al.*, 1999; Riesco-Fagundo *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2002; Olschewski *et al.*, 2002b). En els següents experiments es va voler determinar l'efecte de la hipòxia sobre els corrents totals de sortida de K<sup>+</sup> mitjançats pel BK<sub>Ca</sub> en la configuració de cèl·lula sencera. Donat que a l'humor aquós els valors de PO<sub>2</sub> són més baixos (≈55 mmHg) que a la sang o altres teixits amb major oxigenació (≈95 mmHg), qualsevol procés que produeixi hipòxia a la cambra anterior podria tenir un efecte més acusat. Per aquesta raó, es van utilitzar dos models experimentals: 1) cèl·lules trabeculars crescudes en un incubador convencional (5% CO<sub>2</sub> en aire, [21% O<sub>2</sub>]) i cèl·lules crescudes en ambient hipòxic (5% O<sub>2</sub>). En ambdós casos es mesuraven els corrents de K<sup>+</sup> en condicions control (normòxia) i posteriorment es bescanviava la solució fisiològica del bany per solució fisiològica hipòxica. Per evocar els corrents de sortida de K<sup>+</sup>, el potencial de les cèl·lules es va fixar a -60 mV i s'aplicaven polsos despolaritzants fins a +80 mV en increments de 10 mV. La solució a l'interior de la pipeta era solució d'alt K<sup>+</sup> amb una concentració de calci constant (5μM) per a tots els experiments.

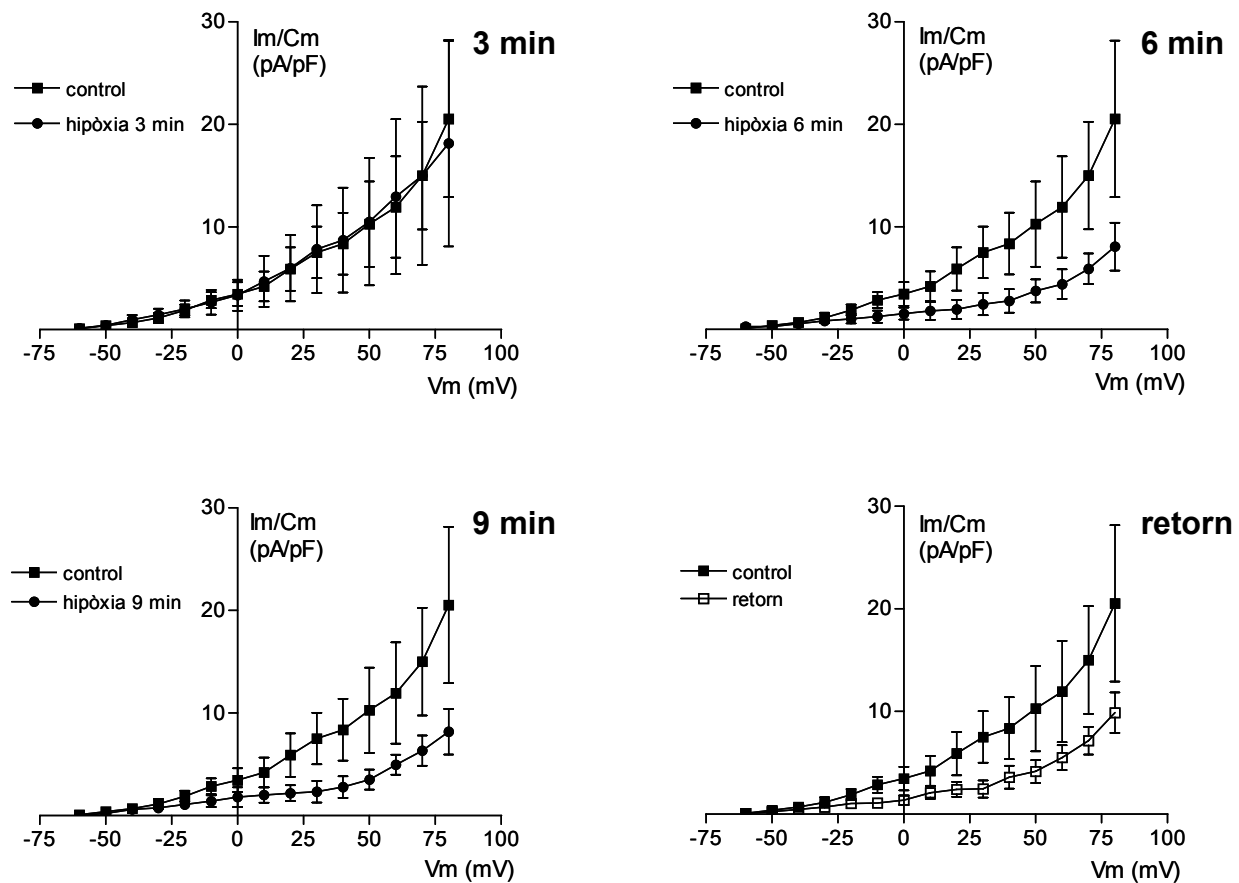
##### 4.3.3.1.1 Cèl·lules normòxiques

Tal i com s'observa a la figura 4.10, en el cas de les cèl·lules trabeculars normòxiques, 3 min després de l'addició de la solució hipòxica al bany, els corrents de K<sup>+</sup> disminuïen, respecte els corrents en condicions control, essent aquesta disminució significativa als 6 min (P<0.001, n=5, two-way ANOVA) respecte la solució fisiològica normòxica. La disminució es mantenia fins 9 min després de l'addició de la solució hipòxica (P<0.001, n=4). Es va aplicar la correcció de Bonferroni i es van veure diferències significatives a +80 mV entre el grup control i l'hipòxic, tant als 6 (P< 0.01) com als 9 min (P<0.05). El retorn a les condicions control no revertia l'efecte de la hipòxia (P<0.001), però la correcció de Bonferroni no mostrava cap diferència significativa per cap voltatge.



**Figura 4.10. Cèl·lules normòxiques.** Es mostra la relació corrent-voltatge en condicions de normòxia i d'hipòxia en la configuració de cèl·lula sencera. En abcises es mostra el voltatge de la membrana ( $V_m$ ) i en ordenades el corrent de la membrana ( $I_m$ ). El potencial de membrana de la cèl·lula es va mantenir a -60 mV ( $V_m$ ). Els experiments es van dur a terme amb solució fisiològica al bany i solució d'alt potassi (140 mM  $K^+$ ) a la pipeta. S'assolien les condicions d'hipòxia bombollejant  $N_2$  durant 30 minuts. L'addició de la solució hipòxica al bany provoca una disminució dels corrents de sortida de  $K^+$  respecte la solució control als 6 min i 9 min (two-way ANOVA,  $P < 0.001$ ) i que es manté un cop es retorna a les condicions control.

Degut a que no totes les cèl·lules estudiades tenen el mateix tamany, es van normalitzar els valors de corrent per la capacitància de la cèl·lula, disminuint així la variabilitat intercel·lular. Aquesta mesura es coneix també com a densitat de corrent (pA/pF). Els resultats van ser els mateixos que pels valors de corrent sense corregir ( $P < 0.001$ , two-way ANOVA, pels 6 i 9 min) (Fig 4.11)

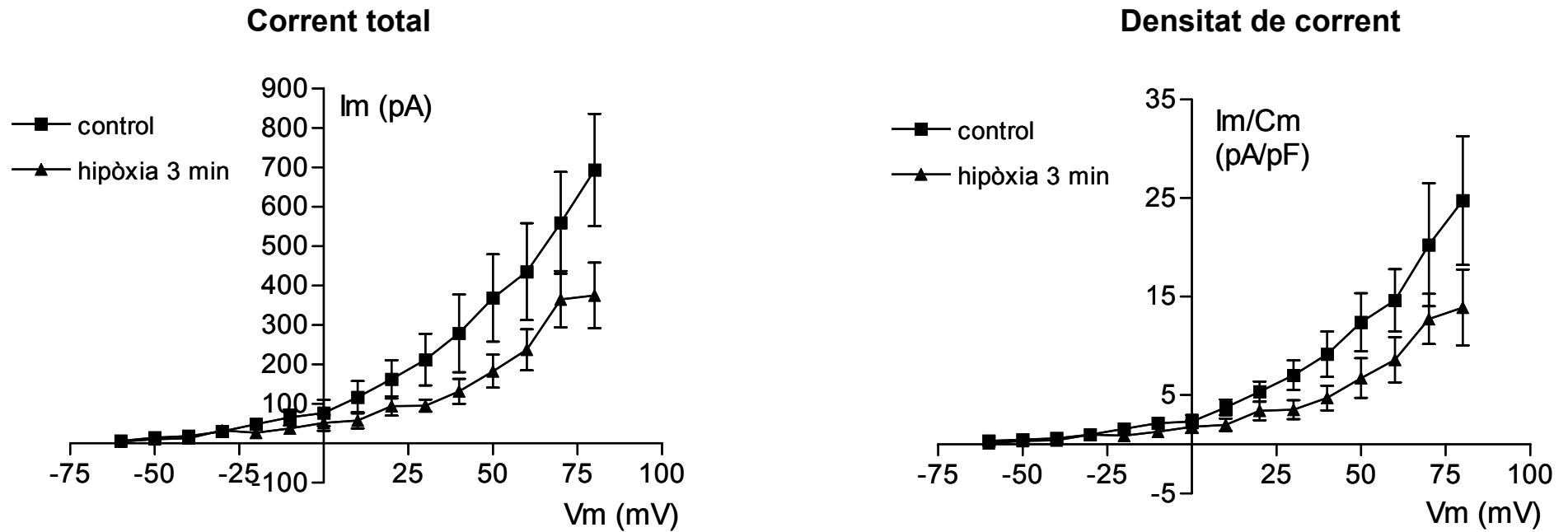


**Figura 4.11. Cèl·lules normòxiques.** Corbes corrent-voltatge en la configuració de cèl·lula sencera, on el corrent de cada cèl·lula s'ha corregit per la capacitança de la membrana, com a mesura de la densitat de corrent. Els resultats van ser els mateixos que pels valors de corrent sense corregir ( $P < 0.001$ , two-way ANOVA, pels 6 i 9 min).

#### 4.3.3.1.2 Cèl·lules hipòxiques

En aquest cas, les cèl·lules trabeculars bovines es col·locaven en un incubador amb un 5% d'O<sub>2</sub> després del primer passe i s'utilitzaven entre dos i tres dies després. La figura 4.12 mostra les corbes corrent-voltatge dels experiments en la configuració de cèl·lula sencera, pel grup control i pel grup hipòxic. La solució hipòxica s'afegia al bany després del registre control i es mesuraven els corrents de sortida de K<sup>+</sup> als 3, 6 i 9 min després de l'addició de la solució hipòxica. En aquest cas només es mostra l'efecte de la hipòxia aguda als 3 min, degut a que les cèl·lules estaven més malmeses als 6 i 9 min i resultava molt difícil fer bons registres. Els *patches* en les cèl·lules hipòxiques eren més dèbils i resistien pitjor el protocol de voltatges, perdent-se en algunes ocasions la unió d'alta resistència o *gigaseal*. Tal i com es pot veure a la gràfica, als 3 min ja hi ha una disminució significativa dels corrents de K<sup>+</sup> (P<0.001, two-way ANOVA, n=4), a diferència de les cèl·lules normòxiques, on l'efecte de la hipòxia no es feia palès fins els 6 min. La correcció de Bonferroni mostrava diferències significatives a +80 mV entre el grup control i l'hipòxia als 3 min (P<0.01).

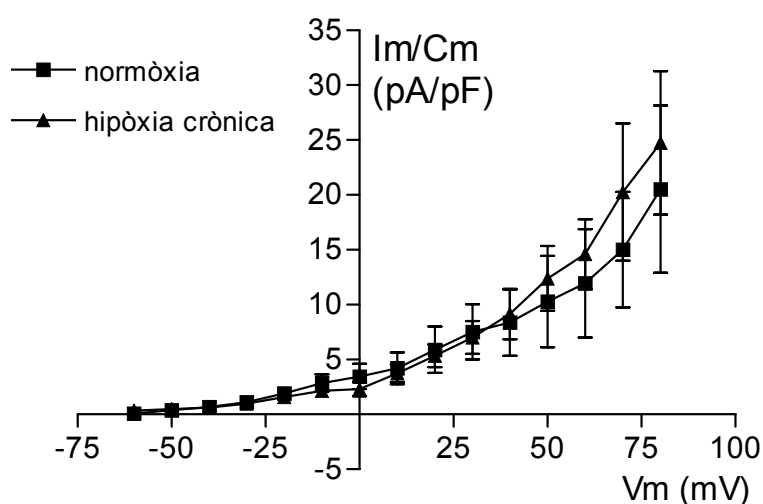
Es van calcular també les corbes corrent-voltatge normalitzant la corrent de sortida per la capacitància de la membrana de la cèl·lula i els resultats són els que es mostren a la figura 4.12. S'observa una disminució significativa de la densitat de corrent als 3 min (P<0.001, two-way ANOVA). La correcció de Bonferroni mostrava diferències significatives a +80 mV entre el grup control i l'hipòxia als 3 min (P<0.01).



**Figura 4.12. Cèl·lules hipòxiques.** A l'esquerra es mostra la corba corrent-voltatge dels experiments en configuració de cèl·lula sencera utilitzant cèl·lules trabeculars bovines crescudes en ambient hipòxic (5% O<sub>2</sub>) i a la dreta es presenta la densitat de corrent (pA/pF) vs el voltatge. Després del registre control amb solució fisiològica al bany, aquesta es bescanviava per solució hipòxica. Les gràfiques mostren una disminució significativa dels corrents totals de K<sup>+</sup> als 3 min d'afegir la solució hipòxica al bany.

#### 4.3.3.1.3 Cèl·lules normòxiques vs cèl·lules hipòxiques

Donat que la hipòxia aguda causa un efecte inhibitori dels corrents tant en les cèl·lules crescudes en normòxia com en les crescudes en ambient hipòxic, es va voler estudiar quin era l'efecte de la hipòxia crònica sobre els corrents basals del  $BK_{Ca}$ . Quan es comparen els corrents de sortida de  $K^+$  corregits per la capacítància de la membrana en les cèl·lules trabeculars normòxiques vs les cèl·lules sotmeses a hipòxia crònica (2-3 dies en incubador 5%  $O_2$ ) observem que la densitat de corrent no presenta diferències significatives entre els dos grups (Fig. 4.13), per tant els resultats indiquen que la hipòxia crònica no afecta significativament els corrents basals mitjançats pel  $BK_{Ca}$ .



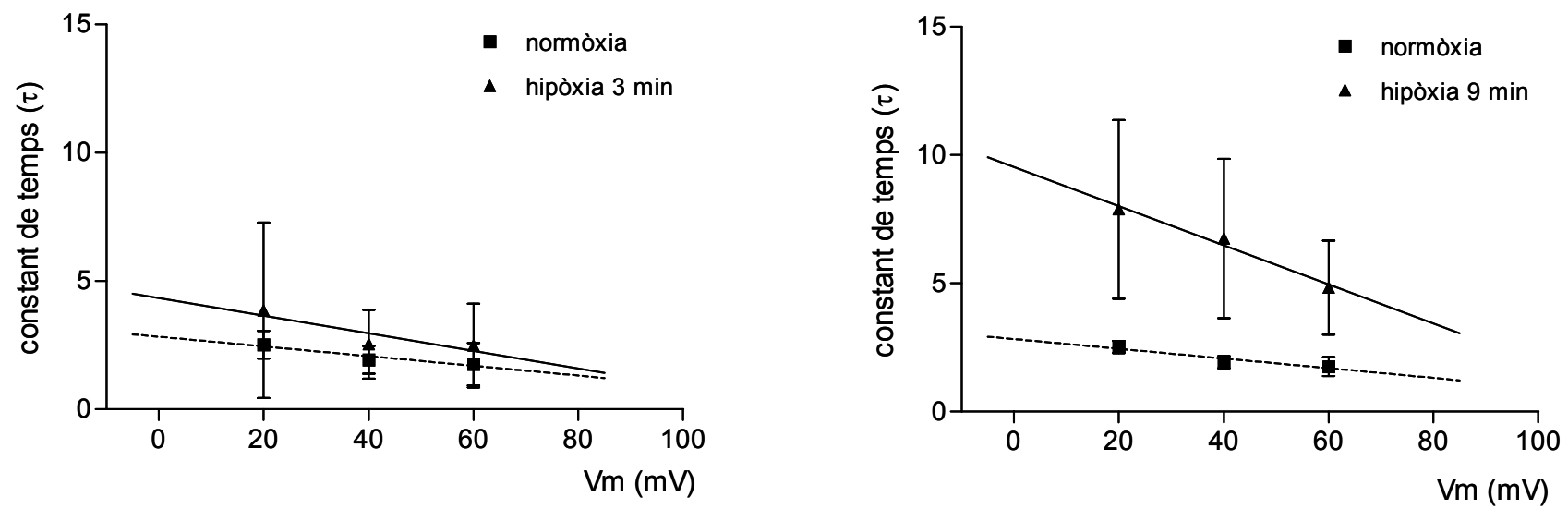
**Figura 4.13.** En abscises es mostra el voltatge de la membrana ( $V_m$ ) i en ordenades el corrent corregit per la capacítància de la membrana ( $I_m/C_m$ ). El potencial de membrana de la cèl·lula es va mantenir a  $-60$  mV ( $V_m$ ) i es van aplicar polsos despolaritzants fins a  $+80$  mV, en increments de  $+10$  mV. Els experiments es van dur a terme amb solució fisiològica al bany i solució d'alt potassi ( $140$  mM  $K^+$ ,  $5$   $\mu$ M  $Ca^{2+}$ ) a la pipeta. La hipòxia crònica s'assolia incubant les cèl·lules en atmòsfera amb 5%  $O_2$  durant 2-3 dies després del passe.



#### **4.3.3.2 Efecte de la hipòxia sobre la constant d'activació ( $\tau$ )**

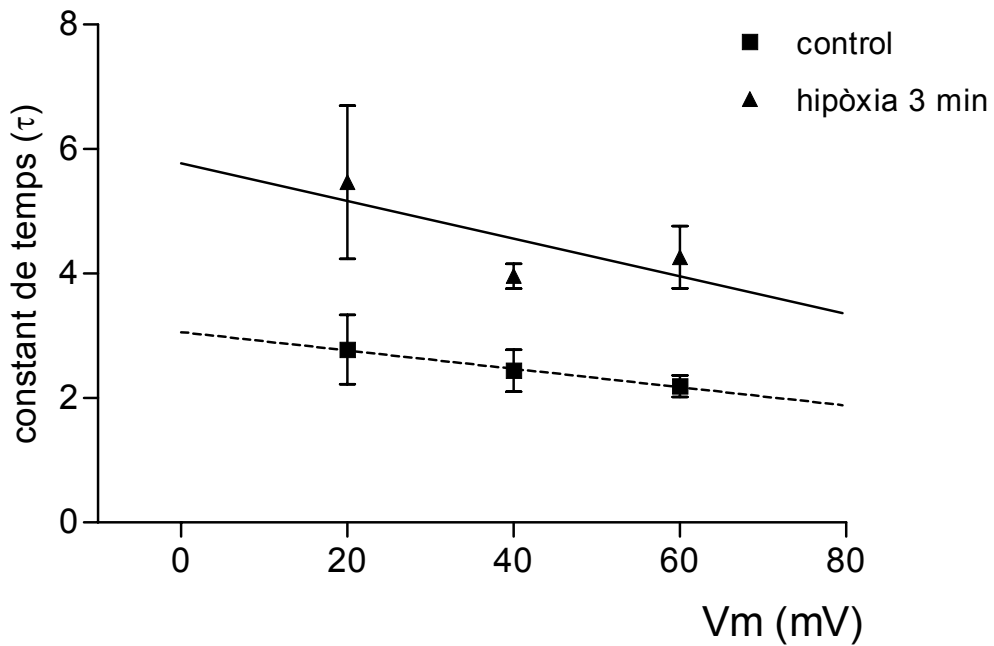
Tal i com s'ha descrit en el punt 4.3.2.1.1, les constants de temps a les quals els canals s'activen i es desactiven, és un dels paràmetres que es poden utilitzar per caracteritzar els corrents mitjançats pel BK<sub>Ca</sub> (McManus, 1991; Yazejian *et al.*, 2000). Es va mesurar l'efecte de la hipòxia sobre els corrents de K<sup>+</sup> mitjançant la constant d'activació ( $\tau_{act}$ ).

Pel que fa a les cèl·lules normòxiques, a la figura 4.14 es mostren els voltatges als quals s'activen els corrents, des de +20 a +60 mV, i les regressions lineals d'ambdós grups. Es mostra la constant d'activació als 3 min d'introduir la solució hipòxica, on no s'observa cap efecte significatiu sobre la  $\tau_{act}$ . Les regressions lineals eren: control  $r^2$ : 0.90, hipòxia: 0.77. Als 9 min la regressió lineal per la  $\tau_{act}$  ( $r^2$ : 0.98) a la solució hipòxica tendia a ser més lenta que en el medi normòxic, per tots els voltatges mesurats (+20 a +60 mV), malgrat que la diferència no era significativa (P=0.11). Es necessitaria un nombre d'experiments més gran del que aquí es presenta (n=5) per assolir la significació estadística amb aquesta anàlisi, tot i que les diferències trobades van en la direcció esperada segons els experiments previs.



**Figura 4.14. Cèl·lules normòxiques.** Constants d'activació dels corrents del  $BK_{Ca}$  en medi normòxic i en solució hipòxica als 3 i 9 min d'afegir-la al bany. Es mostren les regressions lineals per la  $\tau_{act}$  pel medi normòxic ( $r^2$ : 0.90) i pel medi hipòxic als 3 min ( $r^2$ : 0.77) i als 9 min ( $r^2$ : 0.98). Cada punt mostra les mitjanes  $\pm$  SEM per un total de 5 cèl·lules.

Pel que fa a l'efecte de la hipòxia aguda sobre la constant d'activació en les cèl·lules crescudes en medi hipòxic, les regressions lineals eren: control  $r^2$ : 0.99, hipòxia: 0.57, per un total de 4 cèl·lules. La  $\tau_{act}$  del  $BK_{Ca}$  en presència de la solució hipòxica era significativament més lenta que en el medi normòxic ( $P < 0.05$ , two-way ANOVA) per tots els voltatges mesurats (+20 a +60 mV). Això es correspon amb una menor activació dels corrents en solució hipòxica.



**Figura 4.15. Cèl·lules hipòxiques.** Constant d'activació del  $BK_{Ca}$  en medi normòxic i en medi hipòxic.

#### 4.4 Efecte de la hipòxia sobre el calci intracel·lular

Per caracteritzar l'efecte de les condicions hipòxiques sobre la fisiologia cel·lular, es va estudiar l'efecte de la hipòxia sobre el calci intracel·lular a les cèl·lules de la xarxa trabecular bovina (BTM) i humana (HTM) i si la hipòxia modifica la resposta a drogues que mobilitzen el calci intracel·lular com la bradikinina i l'endotel·lina (Tao *et al.*, 1998; Llobet *et al.*, 1999). Igual que en els experiments d'electrofisiologia, es van utilitzar cèl·lules normòxiques (21% O<sub>2</sub>) i cèl·lules crescudes en hipòxia (5% O<sub>2</sub>) entre 3 i 6 dies després del passe.

En aquests experiments es van utilitzar cèl·lules trabeculars humanes, a més de les bovines, donada la seva disponibilitat i que aquesta tècnica no és tan exigent com els registres electrofisiològics, on va ser molt difícil obtenir registres complets.

##### 4.4.1 Efecte de la hipòxia sobre el calci basal

La primera hipòtesi que es va avaluar va ser si la hipòxia modificava els valors de calci basal a les cèl·lules trabeculars. Per això, es van determinar els nivells de calci basal amb solució fisiològica normòxica al bany o bé amb solució fisiològica hipòxica. Primer es va voler estudiar si el fet de fer créixer les cèl·lules trabeculars en un incubador amb baixa PO<sub>2</sub> (5% O<sub>2</sub>) tenia algun efecte sobre el nivells de calci basal. Aquesta manipulació simulava les condicions d'hipòxia cel·lular crònica.

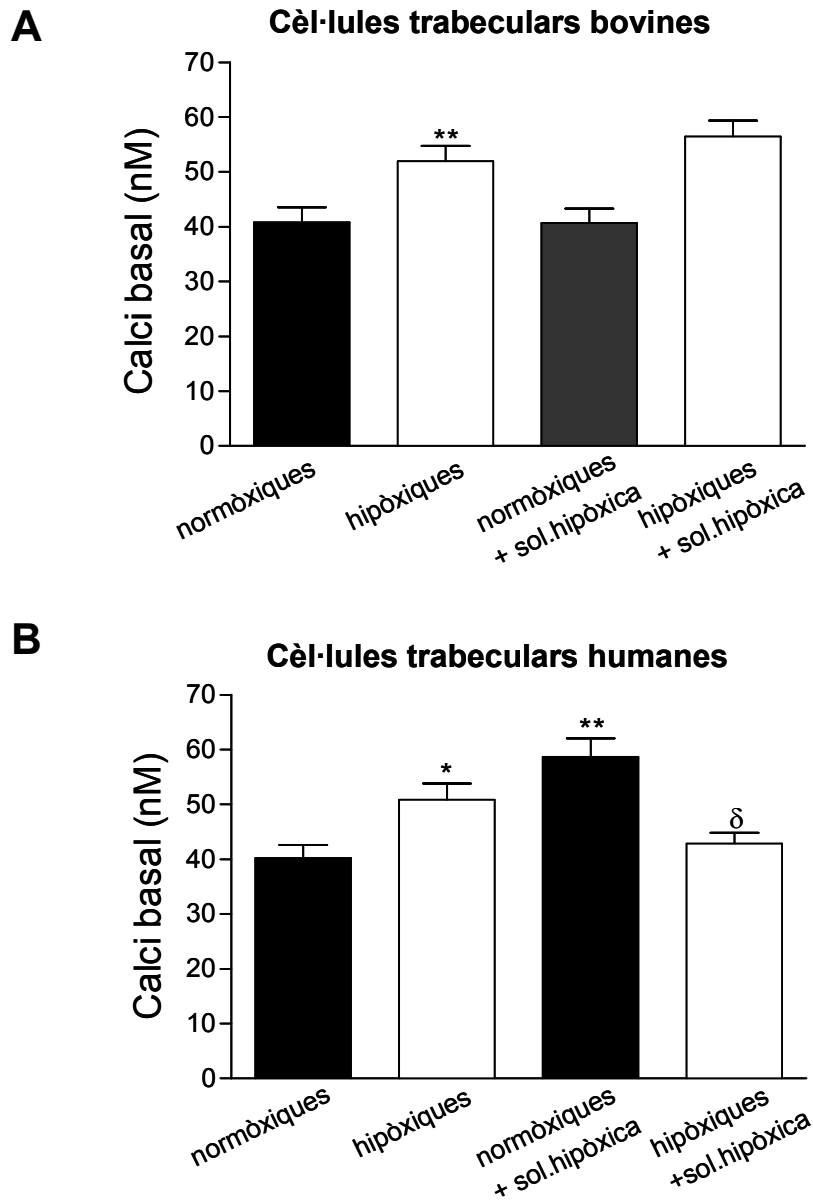
Quan les cèl·lules trabeculars *bovines* (Fig.4.16A) es van fer créixer en condicions hipòxiques els valors de calci basal van ser superiors als presentats per les cèl·lules en condicions normòxiques (cèl·lules normòxiques: 40.82±2.70 nM, n=86 vs cèl·lules hipòxiques: 51.93±2.83 nM, n=93; P<0.01). Si avaluem l'efecte de la hipòxia aguda, aquesta no modifica els valors de calci basal ni en les cèl·lules normòxiques ni en les crescudes en condicions hipòxiques. El calci basal de les cèl·lules incubades en normòxia no es veia modificat per aquest tractament (solució normòxica: 40.82±2.70 nM, n=86 vs solució hipòxica: 40.67 ± 2.65 nM, n=69). Les cèl·lules incubades en hipòxia tampoc mostraven canvis significatius (solució normòxica: 51.93 ± 2.8, n=93 vs solució hipòxica: 56.47 ± 2.88, n=69).

Pel que fa a les cèl·lules trabeculars *humanes* (Fig. 4.16B), la hipòxia crònica produeix un augment significatiu del calci basal (cèl·lules normòxiques:

## RESULTATS

---

40.21±2.42, n=57 vs cèl·lules hipòxiques: 50.86±2.97, n=82; P<0.05) en presència de solució fisiològica normòxica, similar a l'observat a les cèl·lules bovines. La hipòxia aguda en aquest cas, provoca un augment significatiu dels nivells de calci basal (40.21±2.42, n=57 vs 58.65±3.37, n=77; P<0.001) a les cèl·lules normòxiques, mentre que els disminueix a les cèl·lules crescudes en condicions hipòxiques (50.86 ± 2.97, n=82 vs 42.84 ± 1.98, n=112, P<0.05).



**Figura 4.16. A:** La hipòxia crònica augmenta el calci intracel·lular a les cèl·lules de la xarxa trabecular bovina. Es mostren els valors de calci basal per les cèl·lules normòxiques i hipòxiques, tractades amb solució fisiològica normòxica o solució hipòxica. Cada grup representa la mitja dels valors de calci basal (mitja  $\pm$  SEM). La solució hipòxica no té cap efecte sobre el calci basal, mentre que la hipòxia crònica l'augmenta de manera significativa (\*\*  $P < 0.01$ , respecte les cèl·lules normòxiques). **B:** Efecte de la hipòxia sobre les cèl·lules de la xarxa trabecular humana. La gràfica mostra un augment en els nivells de calci basal després de la incubació en atmosfera hipòxica (\*  $P < 0.05$ , respecte les cèl·lules normòxiques). La hipòxia aguda produeix per una banda un augment del calci basal en les cèl·lules normòxiques (\*\*  $P < 0.01$ ), mentre que el disminueix en el cas de les cèl·lules incubades en hipòxia ( $\delta$   $P < 0.05$ , respecte les cèl·lules hipòxiques).

#### 4.4.2 Efecte de la hipòxia sobre la resposta a bradikinina

Com s'ha dit anteriorment, és conegut que les cèl·lules de la xarxa trabecular bovina responen a diferents substàncies modificant els nivells de calci intracel·lular, entre elles pèptids vasoactius com la bradikinina (BK) (Llobet *et al.*, 1999) o l'endotel·lina-1 (Tao *et al.*, 1998). Els efectes de la hipòxia sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular es van estudiar principalment en la resposta a bradikinina, donat que aquesta ha estat ben caracteritzada a les cèl·lules trabeculars (Llobet *et al.*, 1999). A més s'ha estudiat també la resposta a endotel·lina-1 per la seva importància en la fisiopatologia del glaucoma (Yorio *et al.*, 2002).

En els següents experiments es va provar l'efecte de la hipòxia sobre la resposta a BK  $10^{-6}\text{M}$  a les cèl·lules trabeculars bovines i humanes. Es va avaluar el percentatge de resposta a la droga, l'amplitud de l'increment de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  i el  $t_{70}$ . Els resultats obtinguts es presenten a la taula 4.1.

El primer pic de calci de la figura 4.17 representa la típica resposta de les cèl·lules trabeculars *bovines* a la BK  $10^{-6}\text{M}$  en les condicions control, sense estar sotmeses ni a la hipòxia aguda ni a la crònica. En aquestes condicions van respondre un 93% de les cèl·lules ( $n=56$ ), amb un increment de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de  $827.94 \pm 69.38$  nM (mitja  $\pm$  SEM). Com s'explica en el capítol de Material i mètodes, es va calcular el  $t_{70}$  que representa el temps necessari per recuperar el 70% de l'increment del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  assolit mitjançant l'addició de la BK, que va ser de  $61.31 \pm 4.67$  segons. Les cèl·lules trabeculars responen a la BK en primer lloc augmentant ràpidament la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , seguit d'una fase de recuperació ràpida que arriba a un *plateau* sostingut fins retornar completament als valors basals. D'acord amb estudis previs del nostre grup (Llobet *et al.*, 1999) la major part de l'increment en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  prové de dipòsits intracel·lulars, encara que una petita part podria tenir origen extracel·lular. D'altra banda, l'entrada capacitativa de calci des de l'exterior per reomplir els dipòsits intracel·lulars s'ha proposat com l'origen del *plateau* sostingut. Els valors de resposta, increment de  $\text{Ca}^{2+}$  (pic) i  $t_{70}$  són representatius de la resposta a BK.

Quan es tractaven les cèl·lules bovines amb solució fisiològica hipòxica (*hipòxia aguda*), es va observar una disminució en el percentatge de resposta, 63% ( $n=71$ ), respecte les no tractades ( $P < 0.001$ ). L'increment de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $319.31 \pm 16.78$ ) i el

$t_{70}$  ( $34.67 \pm 2.19$  segons) també van ser significativament inferiors respecte el grup control ( $P < 0.001$ , Figura 4.17 i Taula 4.1).

L'efecte de la *hipòxia crònica* sobre la resposta a la BK es va mesurar incubant les cèl·lules en condicions hipòxiques (5%  $O_2$ ) entre 3 i 6 dies després del passe. En aquestes condicions només van respondre un 55% de les cèl·lules ( $n=69$ ) amb un increment de  $[Ca^{2+}]_i$  ( $534.60 \pm 47.43$ ) significativament inferior a les cèl·lules crescudes en normòxia ( $P < 0.001$ ). El  $t_{70}$  va ser de  $50.04 \pm 5.26$  segons.

Les cèl·lules crescudes en hipòxia també es van tractar amb solució fisiològica hipòxica. El % de resposta va ser del 74% ( $n=74$ ), superior si el comparavem amb les cèl·lules hipòxiques no tractades, però encara inferior a les cèl·lules control.

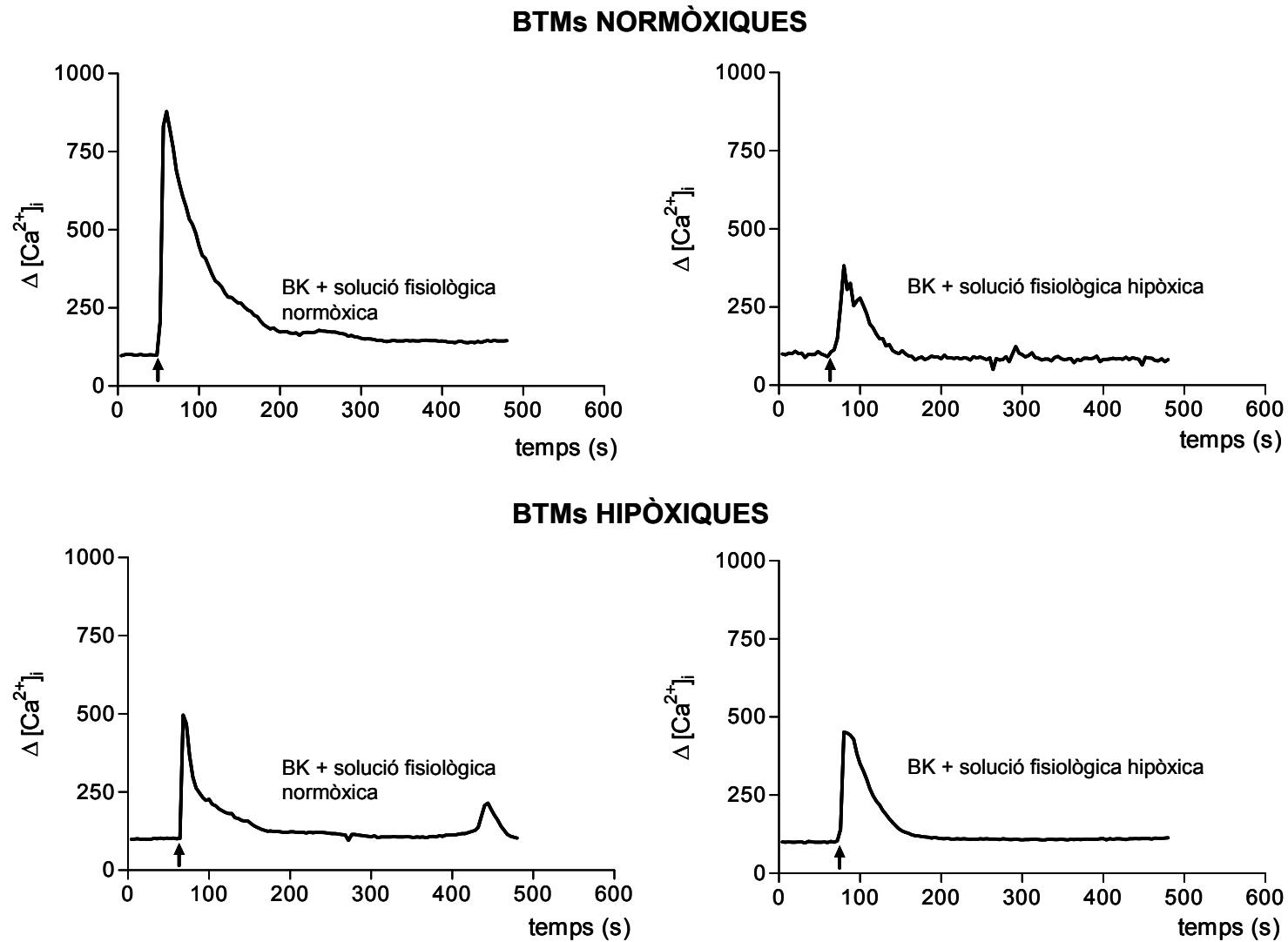


**Taula 4.1. Efecte de la hipòxia sobre la mobilització del  $[Ca^{2+}]_i$  en resposta a bradikinina (BK) a les cèl.lules de la xarxa trabecular bovina**

	% de resposta	Cèl.lules amb resposta		
		$[Ca^{2+}]_i$ basal (nmol/L)	Increment $[Ca^{2+}]_i$	$t_{70}$ (s)
<b>Cèl.lules normòxiques</b>				
Solució fisiològica normòxica (BK $10^{-6}$ M)	93	40.82±2.70	827.94±69.38	61.31±4.67
Solució fisiològica hipòxica (BK $10^{-6}$ M)	63 *	40.67±2.65	319.31±16.78 *	34.67±2.19 *
<b>Cèl.lules hipòxiques</b>				
Solució fisiològica normòxica (BK $10^{-6}$ M)	55 *	51.93±2.83 †	534.60±47.43 *	50.04±5.26
Solució fisiològica hipòxica (BK $10^{-6}$ M)	74 <sup>δ</sup>	56.47±2.88	470.36±26.54	50.33±3.88

\*  $P < 0.001$  (vs solució fisiològica normòxica, cèl. normòxiques), †  $P < 0.01$  (vs solució fisiològica normòxica, cèl. normòxiques) <sup>δ</sup>  $P < 0.05$  (vs solució fisiològica normòxica, cèl. hipòxiques). Les comparacions es van fer utilitzant la t d'Student. La  $[Ca^{2+}]_i$  basal, l'increment de  $[Ca^{2+}]_i$  i el  $t_{70}$  es mostren com la mitja±SEM. Els % de resposta entre els diferents grups es van comparar amb la prova de Fisher.

BK: bradikinina



**Figura 4.17.** Efecte de la hipòxia sobre la resposta a BK  $10^{-6}M$  a les cèl·lules de la xarxa trabecular bovina (BTMs). Cada gràfica representa la resposta d'una cèl·lula representativa per a cada condició experimental. A la part superior es mostren les cèl·lules trabeculars bovines crescudes en normòxia, a les quals s'ha afegit bé solució fisiològica o bé solució fisiològica hipòxica, i posteriorment se les ha estimulat amb BK (fletxa). El mateix es mostra per les cèl·lules hipòxiques.

#### 4.4.3 Efecte de la hipòxia sobre la resposta a endotel·lina-1

L'endotel·lina-1 (ET-1) és un potent pèptid vasoconstrictor que, a l'igual que la BK, ha demostrat tenir un efecte sobre la mobilització del  $[Ca^{2+}]_i$  a les cèl·lules de la xarxa trabecular (Kohmoto *et al.*, 1994; Kageyama *et al.*, 1996; Tao *et al.*, 1998) i ha estat implicat en la fisiopatologia del glaucoma (Yorio *et al.*, 2002).

La primera gràfica de la figura 4.18 mostra la resposta típica de les cèl·lules trabeculars bovines a la ET-1 ( $10^{-8}M$ ), en les condicions control. A l'igual que en el cas de la BK, la ET-1 també produeix un increment ràpid de la  $[Ca^{2+}]_i$  que un cop arribat al seu màxim, decreix ràpidament fins arribar a uns valors sostinguts. En absència de qualsevol estimul hipòxic, van respondre un 96% de les cèl·lules (n=27) amb un increment de  $[Ca^{2+}]_i$  de  $564.69 \pm 41.99$ . El  $t_{70}$  va ser  $53.85 \pm 7.14$  segons.

Com es mostra a la taula 4.2, quan es tractaven les cèl·lules bovines amb solució fisiològica hipòxica (*hipòxia aguda*), la resposta va ser del 78% (n=27) respecte les no tractades. L'increment de  $[Ca^{2+}]_i$  ( $480.71 \pm 55.82$ ) no va mostrar diferències significatives respecte el control, tot i la mitja ser més petita. El  $t_{70}$  ( $171.60 \pm 42.48$  segons) mostrava que la recuperació del 70% de l'increment de  $[Ca^{2+}]_i$  era significativament més lenta que en el cas de les cèl·lules control ( $P < 0.001$ ).

La resposta en el cas de la *hipòxia crònica* (cèl·lules crescudes en 5%  $O_2$ ) va ser del 100% (n=30) i l'increment de  $[Ca^{2+}]_i$  ( $537.86 \pm 54.36$ ) molt similar al de les cèl·lules normòxiques no tractades. El  $t_{70}$  ( $86.77 \pm 10.58$  segons) era significativament superior comparat amb les cèl·lules normòxiques no tractades ( $P < 0.05$ ).

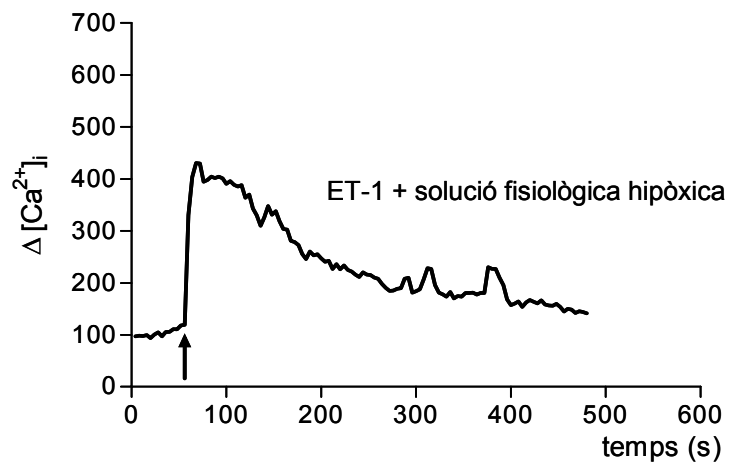
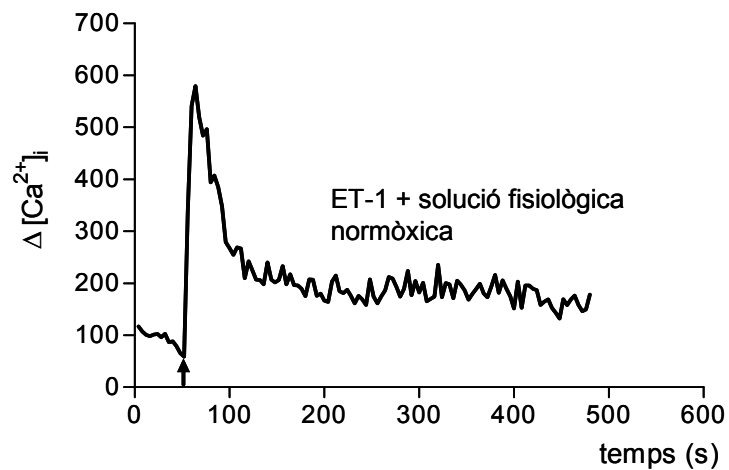
Les cèl·lules crescudes en hipòxia també es van tractar amb solució fisiològica hipòxica. La resposta en aquest cas (83%, n=18) va ser inferior a la de les cèl·lules hipòxiques sense tractar ( $P < 0.05$ ). L'increment de  $[Ca^{2+}]_i$  va ser  $507.13 \pm 118.51$ . El  $t_{70}$  era significativament més ràpid al que es produïa amb les cèl·lules hipòxiques sense tractar ( $P < 0.01$ ).

**Taula 4.2. Efecte de la hipòxia sobre la mobilització del  $[Ca^{2+}]_i$  en resposta a endotelina-1 (ET-1) a les cèl.lules de la xarxa trabecular bovina**

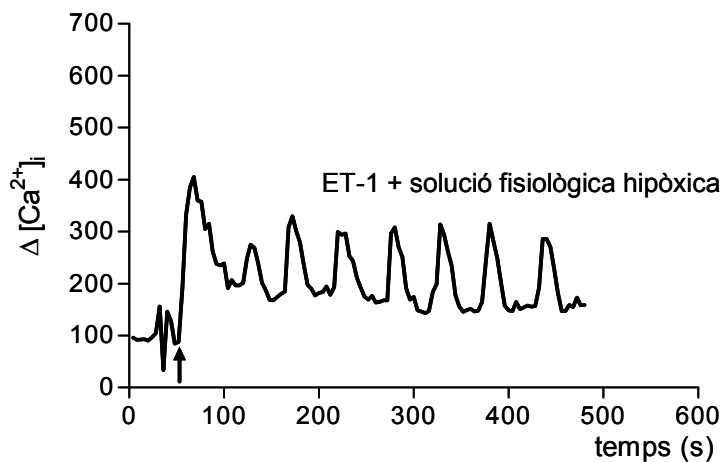
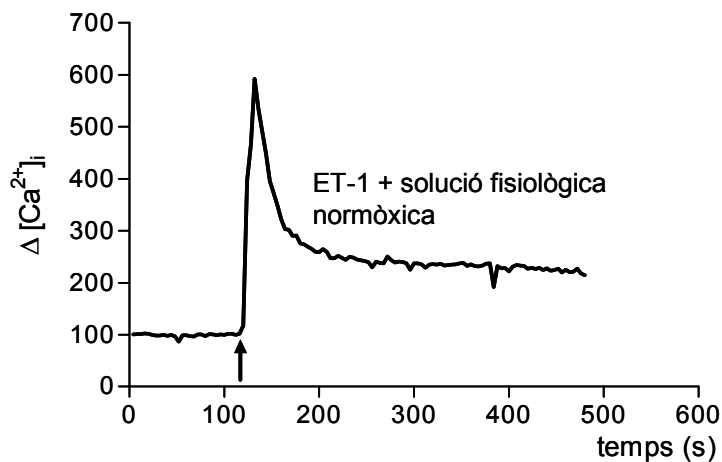
	Cèl.lules amb resposta			
	% de resposta	$[Ca^{2+}]_i$ basal (nmol/L)	Increment $[Ca^{2+}]_i$	$t_{70}$
<b>Cèl.lules normòxiques</b>				
Solució fisiològica normòxica (ET-1 $10^{-8}$ M)	96	40.82±2.70	564.69±41.99	53.85±7.14
Solució fisiològica hipòxica (ET-1 $10^{-8}$ M)	78	40.67±2.65	480.71±55.82	171.60±42.48 *
<b>Cèl.lules hipòxiques</b>				
Solució fisiològica normòxica (ET-1 $10^{-8}$ M)	100	51.93±2.83 †	537.86±54.36	86.77±10.58 §
Solució fisiològica hipòxica (ET-1 $10^{-8}$ M)	83	56.47±2.88	507.13±118.51	31.93±5.39 δ

\* P<0.001 (vs solució fisiològica normòxica, cèl. normòxiques), † P<0.01 (vs solució fisiològica normòxica, cèl. normòxiques), § P<0.05 (vs solució fisiològica normòxica, cèl. normòxiques), δ P<0.01 (vs solució fisiològica normòxica, cèl. hipòxiques). Per l'anàlisi del % de resposta es va utilitzar la prova de Fisher. La resta de comparacions es van fer utilitzant la t d'Student. La  $[Ca^{2+}]_i$  basal, l'increment de  $[Ca^{2+}]_i$  i el  $t_{70}$  es mostren com la mitja±SEM.

**BTMs NORMÒXIQUES**



**BTMs HIPÒXIQUES**



**Figura 4.18.** Efecte de la hipòxia sobre la resposta a ET-1  $10^{-8}$ M a les cèl·lules de la xarxa trabecular bovina (BTMs). Cada gràfica representa la resposta d'una cèl·lula representativa per cada condició experimental. A la part superior es mostren les cèl·lules trabeculars bovines crescudes en normòxia, a les quals s'ha mesurat el calci en solució fisiològica o bé solució fisiològica hipòxica, i posteriorment se les ha estimulat amb ET-1 (fletxa). El mateix es mostra per les cèl·lules hipòxiques.

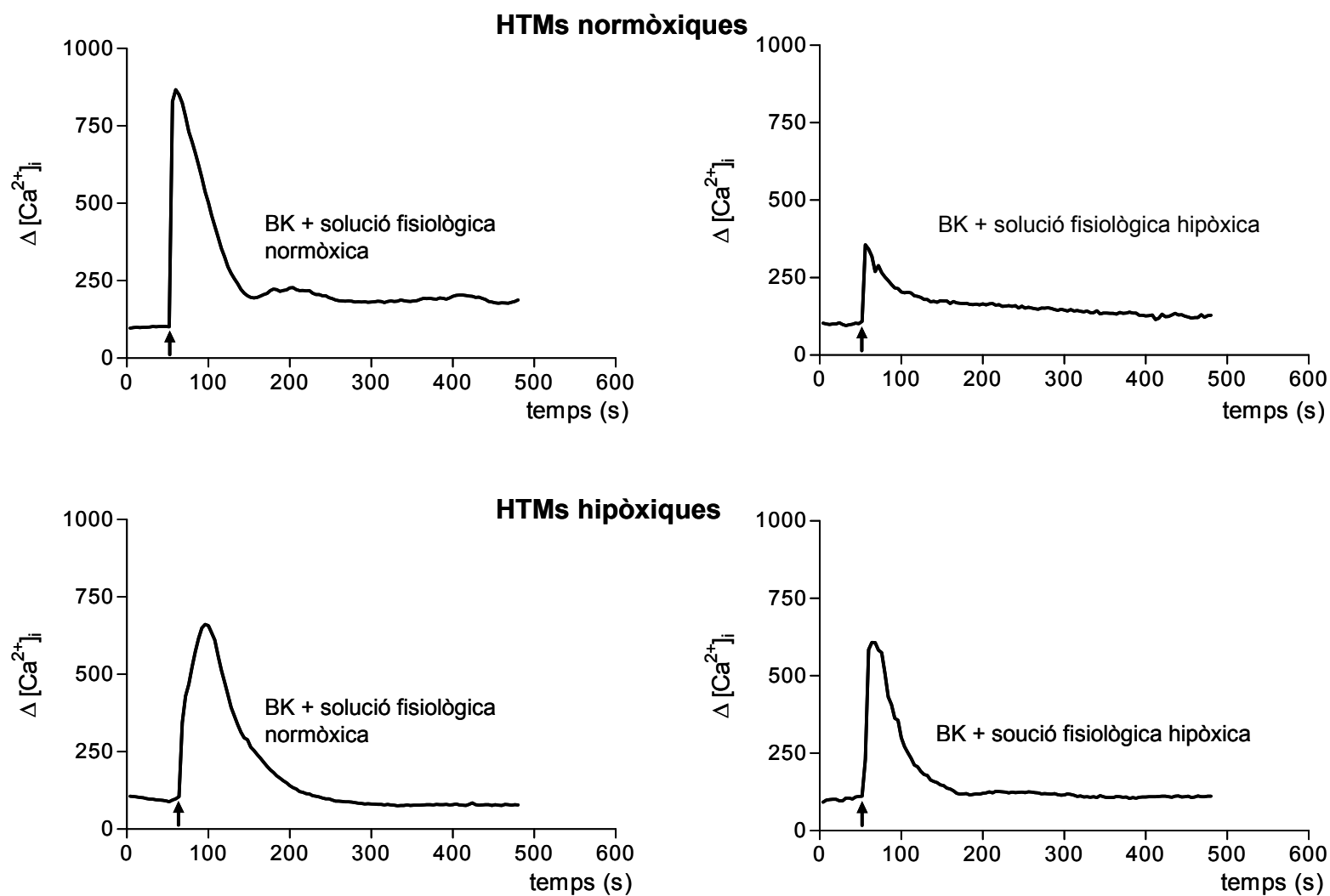
#### 4.4.4 Efecte de la hipòxia sobre la resposta a BK i ET-1 a les cèl·lules trabeculars humanes.

Les cèl·lules trabeculars humanes es van estudiar sotmetent-les a les mateixes condicions experimentals descrites per les cèl·lules trabeculars bovines. A les Figures 4.19 i 4.20 es mostren exemples de la resposta tant a BK com a ET-1 per a cada grup d'experiments. El % de resposta no mostra diferències significatives entre els diferents tractaments. De la mateixa manera que el que s'ha observat en les cèl·lules bovines, tant la hipòxia aguda com la crònica disminueixen significativament els increments de  $[Ca^{2+}]_i$  produïts per la BK o l'ET-1 respecte de les cèl·lules control, com es mostra a les taules 4.3 i 4.4. Tot i que la hipòxia aguda té tendència a disminuir el  $t_{70}$ , en les cèl·lules tractades amb BK no s'observen disminucions significatives entre els grups experimentals. L'ET-1 segueix el mateix patró de resposta, encara que en les cèl·lules hipòxiques tractades amb solució hipòxica, el  $t_{70}$  augmenta respecte les no tractades ( $69.21 \pm 4.88$  vs  $98 \pm 9.93$ ;  $P < 0.05$ ).

**Taula 4.3. Efecte de la hipòxia sobre la mobilització del  $[Ca^{2+}]_i$  en resposta a bradikinina (BK) a les cèl.lules de la xarxa trabecular humana**

	Cèl.lules amb resposta			
	% de resposta	$[Ca^{2+}]_i$ basal (nmol/L)	Increment $[Ca^{2+}]_i$	$t_{70}$
<b>Cèl.lules normòxiques</b>				
Solució fisiològica normòxica (BK $10^{-6}M$ )	86	40.21±2.42	779.08±69.38	57.12±4.67
Solució fisiològica hipòxica (BK $10^{-6}M$ )	87	58.65±3.37 *	441.65±26.32 *	51.20±4.28
<b>Cèl.lules hipòxiques</b>				
Solució fisiològica normòxica (BK $10^{-6}M$ )	80	50.86±2.97 ‡	605.54±45.49 ‡	60.92±4.03
Solució fisiològica hipòxica (BK $10^{-6}M$ )	78	42.84±1.98 <sup>p</sup>	622.97±47.01 †	49.97±2.20

\*  $P < 0.001$  (vs solució fisiològica normòxica, cèl. normòxiques), ‡  $P < 0.05$  (vs solució fisiològica normòxica, cèl. normòxiques), †  $P < 0.01$  (vs solució fisiològica hipòxica, cèl. normòxiques), <sup>p</sup>  $P < 0.05$  (vs solució fisiològica normòxica, cèl. hipòxiques). Per l'anàlisi del % de resposta es va utilitzar la prova de Fisher. La resta de comparacions es van fer utilitzant la t d'Student. La  $[Ca^{2+}]_i$  basal, l'increment de  $[Ca^{2+}]_i$  i el  $t_{70}$  es mostren com la mitja±SEM.



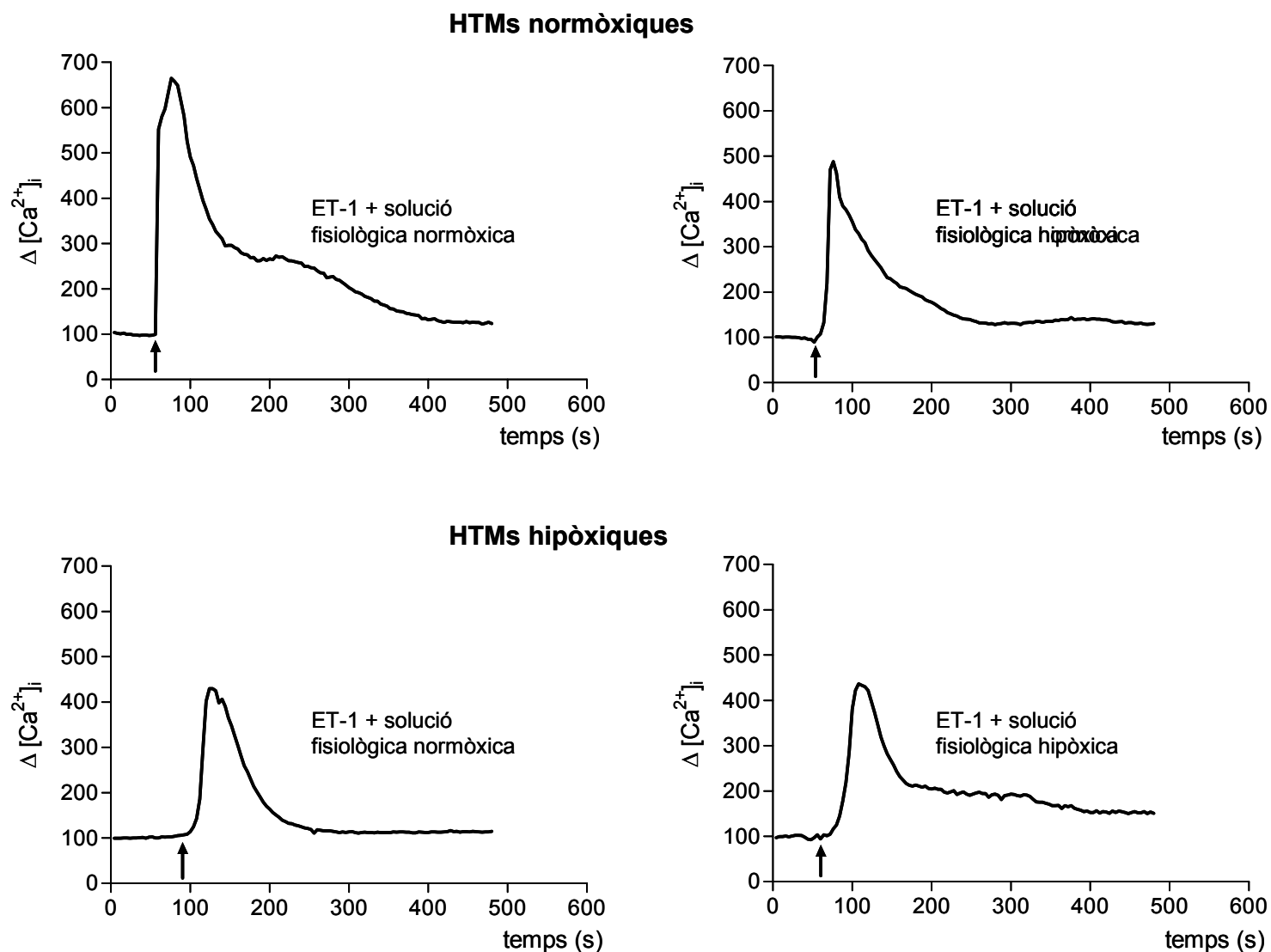
**Figura 4.19.** Efecte de la hipòxia sobre la resposta a BK  $10^{-6}M$  a les cèl·lules de la xarxa trabecular humana (HTMs). Cada gràfica mostra la resposta d'una cèl·lula representativa per cada condició experimental. A la part superior es mostren les cèl·lules trabeculars humanes crescudes en normòxia, a les quals s'ha mesurat el calci en solució fisiològica o bé solució fisiològica hipòxica, i posteriorment se les ha estimulat amb BK (fletxa). El mateix es mostra per les cèl·lules hipòxiques.



**Taula 4.4. Efecte de la hipòxia sobre la mobilització de  $[Ca^{2+}]_i$  en resposta a endotelina-1 (ET-1) a les cèl·lules de la xarxa trabecular humana**

	Cèl·lules amb resposta			
	% de resposta	$[Ca^{2+}]_i$ basal (nmol/L)	Increment $[Ca^{2+}]_i$	$t_{70}$
<b>Cèl·lules normòxiques</b>				
Solució fisiològica normòxica (ET-1 $10^{-8}$ M)	52	40.21±2.42	569.06±49.65	126.45±16.06
Solució fisiològica hipòxica (ET-1 $10^{-8}$ M)	83 <sup>*</sup>	58.65±3.37 <sup>*</sup>	427.03±30.91 <sup>†</sup>	89.30±11.12
<b>Cèl·lules hipòxiques</b>				
Solució fisiològica normòxica (ET-1 $10^{-8}$ M)	69	50.86±2.97 <sup>†</sup>	420.03±32.11 <sup>†</sup>	69.21±4.88 <sup>†</sup>
Solució fisiològica hipòxica (ET-1 $10^{-8}$ M)	86	42.84±1.98 <sup>‡</sup>	408.00±26.67	98.00±9.93 <sup>‡</sup>

\*  $P < 0.001$  (vs solució fisiològica normòxica, cèl. normòxiques), <sup>†</sup>  $P < 0.05$  (vs solució fisiològica normòxica, cèl. normòxiques), <sup>‡</sup>  $P < 0.05$  (vs solució fisiològica normòxica, cèl. hipòxiques). Per l'anàlisi del % de resposta es va utilitzar la prova de Fisher. La resta de comparacions es van fer utilitzant la t d'Student. La  $[Ca^{2+}]_i$  basal, l'increment de  $[Ca^{2+}]_i$  i el  $t_{70}$  es mostren com la mitja±SEM.

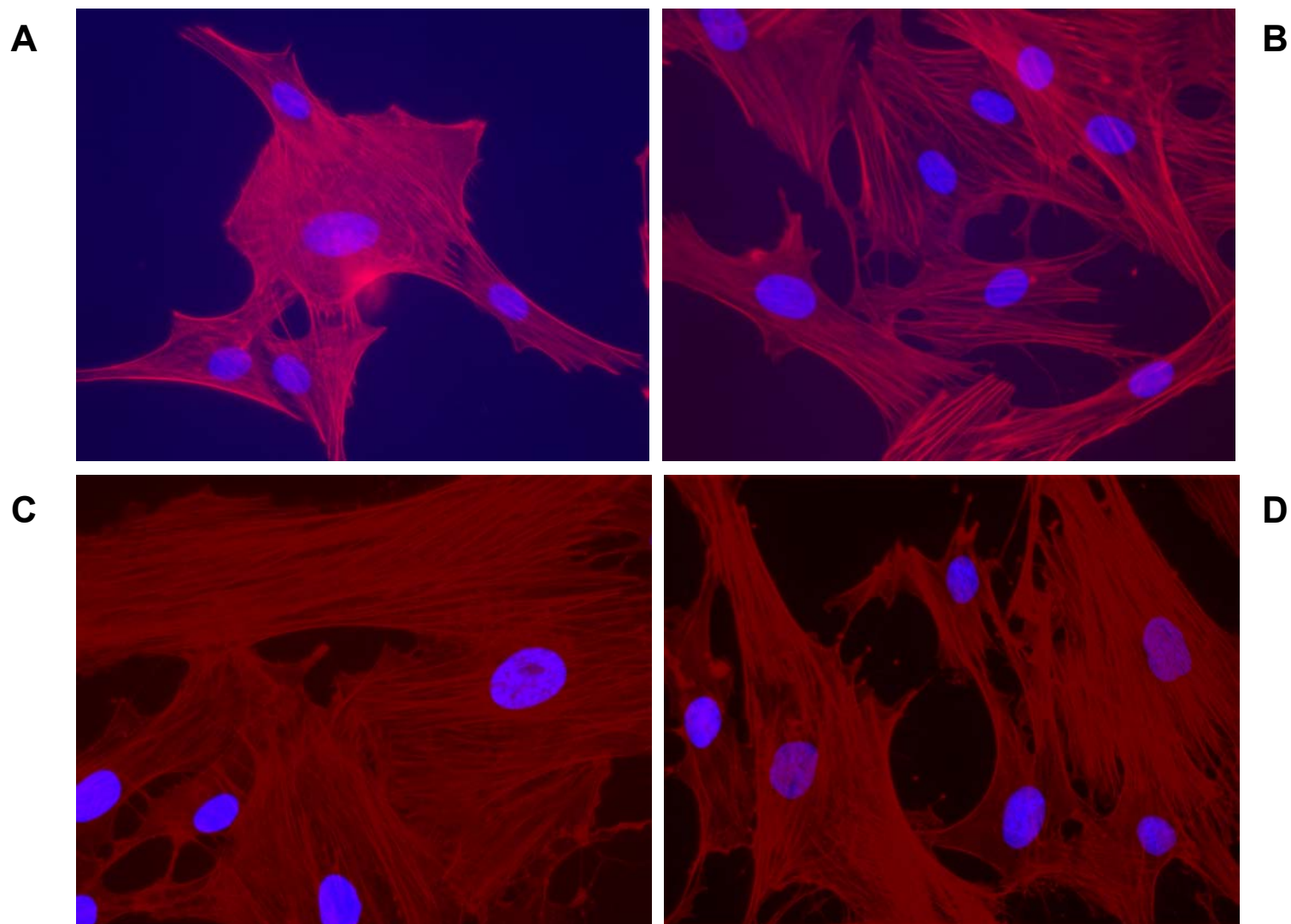


**Figura 4.20.** Efecte de la hipòxia sobre la resposta a ET-1  $10^{-8}M$  a les cèl·lules de la xarxa trabecular humana (HTMs). Cada gràfica mostra la resposta d'una cèl·lula representativa per cada condició experimental. A la part superior es mostren les cèl·lules trabeculars humanes crescudes en normòxia, a les quals s'ha mesurat el calci en solució fisiològica o bé solució fisiològica hipòxica, i posteriorment se les ha estimulat amb ET-1 (fletxa). El mateix es mostra per les cèl·lules hipòxiques

#### **4.5 Efecte de la hipòxia sobre el citoesquelet d'actina**

Diversos estudis han demostrat que la hipòxia pot induir canvis en el citoesquelet d'actina de cèl·lules endotel·lials (Kayyali *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2003), encara que també s'ha descrit que és necessari un procés de reoxigenació posterior a la hipòxia per induir aquests canvis (Crawford *et al.*, 1996). Per aquesta raó i perquè el citoesquelet d'actina s'ha vist involucrat en la modulació de canals iònics com el BK<sub>Ca</sub> (Huang *et al.*, 2002), es va estudiar l'efecte de la hipòxia sobre el citoesquelet d'actina a les cèl·lules de la xarxa trabecular bovina i humana.

Les immunocitoquímiques es van realitzar seguint el protocol descrit en el capítol Material i mètodes sobre cèl·lules trabeculars incubades de 3 a 6 dies en hipòxia (5% O<sub>2</sub>) i sobre cèl·lules crescudes en normòxia. En condicions control les cèl·lules bovines i humanes mostren un patró d'actina en fibres d'estrés, com es veu a la Figura 4.21. A les cèl·lules crescudes en hipòxia l'organització del citoesquelet d'actina no va mostrar diferències respecte el control.



**Figura 4.21.** Efecte de la hipòxia sobre el citoesquelet d'actina. A: Cèl·lules trabeculars bovines normòxiques. B: Cèl·lules trabeculars bovines incubades en hipòxia (5% O<sub>2</sub>). C i D representen cèl·lules trabeculars humanes, normòxiques i hipòxiques respectivament.

## 5 Discussió

La major part de l'humor aquós produït al cos ciliar i que omple les cambres oculars, abandona l'ull a través de la xarxa trabecular i el canal Schlemm fins a la circulació venosa. El correcte funcionament d'aquesta via, que es la majoritària en humans i primats, i el de la via uveoescleral, són necessaris per mantenir la IOP dintre dels límits fisiològics (Gabelt & Kaufman, 2002). En el glaucoma d'angle obert, un dels tipus més freqüent de glaucoma, l'evacuació de l'humor aquós a través de la via trabecular es veu dificultada per defectes funcionals en aquesta estructura d'evacuació. En aquest cas la resistència del fluxe de l'humor aquós augmenta de manera progressiva produïnt un augment de la IOP, que contribuirà a la lesió del nervi òptic característica del glaucoma (Coleman, 1999).

La xarxa trabecular és una estructura formada per tres capes de teixit amb diferències estructurals i funcionals (Lütjen-Drecoll & Rohen, 1994; Gabelt & Kaufman, 2002; Llobet *et al.*, 2003). El trabècul uveal, situat a la part més interior de la xarxa i en contacte directe amb la cambra anterior, està format per làmines de teixit connectiu provinents de l'iris i del cos ciliar i que formen una malla tridimensional amb espais intercel·lulars grans que ofereixen baixa resistència al pas de fluid. La capa intermitja és el trabècul cornioscleral que presenta un grau d'organització més alt que l'anterior i un espais intercel·lulars més petits que fan que augmenti la resistència al fluxe. La capa més exterior és la cribiforme o juxtacanalicular que està en contacte directe amb l'endotel·li intern del canal d'Schlemm i és la que proporciona la majoria de la resistència al pas de l'humor aquós degut al petit tamany dels espais intercel·lulars. Està formada per cèl·lules contingudes en una matriu extracel·lular que conté gran varietat de macromolècules que participen en la modulació de la resistència al fluxe.

La xarxa trabecular ha estat considerada durant molt de temps com un filtre passiu, però cada cop hi ha més evidències del paper actiu de les cèl·lules trabeculars en l'evacuació de l'humor aquós i en darrer terme en la regulació de la IOP (O'Donnell *et al.*, 1995; Wiederholt, 1998b; Al-Aswad *et al.*, 1999; Wiederholt *et al.*, 2000; Llobet *et al.*, 2003). Així, els estudis realitzats en els darrers anys han proposat diferents mecanismes que regularien el pas de l'humor aquós, entre els quals es troba la regulació de l'evacuació mitjançant la contracció/relaxació de la xarxa trabecular (Wiederholt *et al.*, 1994; Wiederholt, 1998b), model en el qual el múscul ciliar també hi estaria implicat.

La regulació del volum de les cèl·lules trabeculars és un altre dels mecanismes pels quals les cèl·lules trabeculars regularien la resistència al fluxe de l'humor aquós (O'Donnell *et al.*, 1995; Gual *et al.*, 1997; Al-Aswad *et al.*, 1999). Alguns dels canals iònics que participen en aquesta regulació han estat recentment identificats a les cèl·lules trabeculars (Mitchell *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2004; Srinivas *et al.*, 2004). Aquestes cèl·lules també responen a la deformació mecànica alterant l'estructura del citoesquelet d'actina (Tumminia *et al.*, 1998; Tian *et al.*, 2000; Wax *et al.*, 2000) o augmentant l'activitat de metaloproteïnases que degraden la matriu extracel·lular (Bradley *et al.*, 2001) afectant així l'evacuació de l'humor aquós. També s'ha descrit un augment en l'expressió de determinats gens a la xarxa trabecular en resposta a IOP elevada (Gonzalez *et al.*, 2000; Borrás, 2003). A més, l'endotel·li del canal d'Schlemm també participa en la resistència de la via trabecular i les seves cèl·lules són capaces de formar canals transcel·lulars que augmentaran en nombre en resposta a augments en la IOP permetent l'evacuació ràpida de l'humor aquós. Aquest mecanisme deixa de funcionar quan els valors d'IOP són molt elevats (Gabelt & Kaufman, 2002).

En humans i primats, l'evacuació a través de la via trabecular és la majoritària representant al voltant d'un 80% de l'evacuació total (Nilsson & Bill, 1994). En altres espècies, com les vaques o els conills, és també la majoritària encara que no en un percentatge tan elevat. En els conills l'especialització del teixit trabecular és menor que en humans i en les vaques el canal d'Schlemm no està totalment desenvolupat, formant diferents plexes aquosos que farien la mateixa funció que el canal en humans (Cole, 1984).

En aquest treball s'ha realitzat una breu caracterització dels cultius trabeculars bovins. S'han utilitzat tècniques immunocitoquímiques per confirmar l'entitat dels cultius i de la mateixa manera que en el descrit anteriorment per aquestes cèl·lules (Flügel *et al.*, 1991; Tamm *et al.*, 1996), el marcatge per l'actina alfa de múscul llis va ser positiu en un petit percentatge de les cèl·lules (8%) i negatiu per la desmina. L'observació dels cultius va permetre identificar morfològicament les dues poblacions cel·lulars descrites en aquest teixit, cèl·lules del tipus epitel·lial i cèl·lules fusiformes (Crean *et al.*, 1986; Coroneo *et al.*, 1991). Aquests resultats permeten considerar els cultius satisfactoris i adequats pels experiments posteriors.

Un dels pocs canals iònics identificats a la cèl·lula trabecular és el BK<sub>Ca</sub> (Stumpff *et al.*, 1997). A diferència del treball realitzat per Stumpff i col·laboradors, en aquest estudi s'ha realitzat una caracterització electrofisiològica completa del canal

BK<sub>Ca</sub> per poder estudiar posteriorment la seva modulació per diferents factors. La caracterització electrofisiològica realitzada amb la tècnica del *patch-clamp* a nivell de canal únic en les configuracions *cell-attached* i *inside-out*, posa de manifest un canal altament selectiu pel K<sup>+</sup> en el que la seva activitat depèn del voltatge aplicat, activant-se fisiològicament a potencials despolaritzats. El potencial de reversió en condicions simètriques de K<sup>+</sup> (140 mM) és proper a zero i en condicions asimètriques el canal mostra una rectificació que segueix l'equació de Goldman, tal i com s'ha descrit per aquest canal (Singer & Walsh, 1987). La conductància del canal en condicions simètriques de K<sup>+</sup> és de 193±3 pS. Stumpff i col·laboradors van trobar un valor de conductància de 293 pS, quan la [K<sup>+</sup>] simètrica era 135 mM. Aquesta diferència pot ser deguda a que els seus experiments es van realitzar a 37°C, doncs la temperatura pot influir en la conformació de la proteïna del canal, fent variar lleugerament la conductància (Hille, 2001). La probabilitat d'obertura del canal es modula per les concentracions de Ca<sup>2+</sup> a la cara citosòlica de la membrana, veient-se incrementada amb concentracions creixents de Ca<sup>2+</sup>. Aquesta caracterització corroborava l'observat anteriorment pel canal BK<sub>Ca</sub> a les cèl·lules trabeculars i en altres tipus cel·lulars (Stumpff *et al.*, 1997; Vergara *et al.*, 1998).

Donat que la concentració de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular modula l'activitat del canal BK<sub>Ca</sub>, les substàncies que augmentin el Ca<sup>2+</sup> intracel·lular podrien ser activadors potencials del canal. A les cèl·lules trabeculars s'ha descrit l'increment de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular per substàncies com l'endotel·lina-1 (Tao *et al.*, 1998; Wiederholt, 1998a), la bradikinina (Llobet *et al.*, 1999), el carbacol (Tanihara *et al.*, 1991), l'ATP (Crosson *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2004) o l'adenosina (Fleischhauer *et al.*, 2003). A part, la bradikinina ha demostrat activar el BK<sub>Ca</sub> per un mecanisme probablement relacionat amb l'augment de la concentració de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular (Gual *et al.*, 1999).

A part del voltatge i el Ca<sup>2+</sup>, aquest treball demostra que la tensió de la membrana és un dels moduladors de l'activitat del canal BK<sub>Ca</sub> a les cèl·lules de la xarxa trabecular. El BK<sub>Ca</sub> ha demostrat propietats mecanosensibles en altres tipus cel·lulars com múscul esquelètic (Mallouk & Allard, 2000), osteoblasts (Davidson, 1993; Allard *et al.*, 2000), múscul llis (Kirber *et al.*, 1992; Dopico *et al.*, 1994) i cèl·lules neuroepitel·lials (Mienville *et al.*, 1996). Cal destacar que l'activació del BK<sub>Ca</sub> per l'*stretch* mecànic no afecta a la conductància unitària (Macdonald, 1997), ni a la sensibilitat del canal pel voltatge o el calci intracel·lular (Mallouk & Allard, 2000). Donat que la xarxa trabecular és un teixit sotmès a la pressió intraocular l'efecte de l'*stretch* mecànic sobre l'activitat del canal BK<sub>Ca</sub> a les cèl·lules trabeculars pot tenir més

importància que a altres teixits on el canal no està sotmès a aquest tipus de condicions. L'aplicació de pressió negativa (succió) en la configuració *cell-attached* provoca un augment en la probabilitat d'obertura del canal que incrementa exponencialment amb els valors de pressió aplicats (14-45 mm Hg). L'efecte del *stretch* ja és significatiu a valors de pressió fisiològiques (15-16 mm Hg), així com a pressions patològiques que poden donar-se en el glaucoma. L'activació del canal per l'*stretch* és reversible i es recuperen els valors basals quan es deixa d'aplicar la succió. D'acord amb el descrit a la literatura, la conductància unitària del canal no es va veu modificada significativament per l'augment de tensió de la membrana (Macdonald, 1997). L'estudi de la sensibilitat al voltatge mostra que aquesta no es veu modificada per l'*stretch* per a valors baixos de pressió (25 mmHg), però si la pressió aplicada és gran, l'activació del canal es desplaça cap a potencials més negatius.

Pel que fa a la sensibilitat al calci, els experiments duts a terme en la configuració *inside-out* mostren com, per una concentració de calci constant, l'aplicació de pressió augmenta la probabilitat d'obertura del canal, fins i tot quan les solucions utilitzades a la cara citosòlica del canal no contenen calci. Aquests resultats mostren que l'activació per l'*stretch* no és secundària a un augment en la concentració intracel·lular de calci i per tant descarten que la sensibilitat del canal a l'*stretch* sigui deguda a l'acció d'aquest ió.

L'activació del BK<sub>Ca</sub> per l'*stretch* s'observa també a nivell cel·lular amb l'ús d'una solució hipotònica, mètode pel qual també es modifica la tensió de la membrana. En aquest cas els corrents de sortida augmenten amb l'aplicació del xoc hipotònic, tal i com s'ha descrit per altres canals de K<sup>+</sup> incloent el BK<sub>Ca</sub> (Christensen & Hoffmann, 1992; Davidson, 1993; Vanoye & Reuss, 1999; Allard *et al.*, 2000).

Encara que hi ha evidències de que l'activació del canal per l'*stretch* és un fenomen lligat a la membrana, bé sigui per interacció directa amb la proteïna del canal o amb un altre component de la membrana relacionat amb ell, el mecanisme de la mecanosensibilitat és encara desconegut. El fet de que l'*stretch* activi el canal en *patches* de membrana aïllats, tal i com s'ha demostrat en aquest treball i en d'altres (Davidson, 1993; Dopico *et al.*, 1994; Mienville *et al.*, 1996; Mallouk & Allard, 2000) fa pensar que és un procés independent de segons missatgers o d'altres factors citosòlics donat que en aquestes condicions la maquinària enzimàtica present és gairebé inexistent. S'ha proposat que la deformació de la membrana activaria fosfolipases associades a ella, produïnt l'alliberament d'àcids grassos que activarien



directament el canal (Sackin, 1995). És una possibilitat que no es pot descartar, però sembla difícil que tingui lloc en la configuració *inside-out* degut a que la majoria dels components citosòlics s'han eliminat escindint el *patch* en la solució de registre. També s'ha proposat que l'activació del BK<sub>Ca</sub> es pot deure a una entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canals no selectius activats per *stretch* (Naruse & Sokabe, 1993; Hoyer *et al.*, 1994). En els nostres experiments aquest cas no sembla probable, donat que l'activació del BK<sub>Ca</sub> es produeix fins i tot en solucions lliures de Ca<sup>2+</sup> (Fig 4.6). Alguns autors han proposat que l'activació dels canals mecanosensibles és un artefacte produït per la formació de la unió d'alta resistència o *gigaseal*, degut a la manca de correlació entre l'activació dels canals en registres de canal únic i els corrents totals activats pels mateixos estímuls (Morris & Horn, 1991). Pel contrari, en aquest treball s'ha demostrat l'activació del BK<sub>Ca</sub> mitjançant dos mètodes diferents: aplicació de succió a la membrana (tant en la configuració en *cell-attached* i com en *inside-out*) i per xoc hipotònic. Aquest fet, junt amb que les propietats electrofisiològiques no s'han vist modificades per l'*stretch*, demostra que la mecanosensibilitat del BK<sub>Ca</sub> no és deguda a manipulacions experimentals.

Una de les hipòtesis seria que el canal actués com un mecanosensor a les cèl·lules de la xarxa trabecular. En general, la transducció sensorial es basa en la generació d'un senyal elèctric, produït per un canvi en una conductància iònica que farà que la membrana de la cèl·lula sensorial (excitable) normalment es despolaritzi (Hille, 2001). En els casos on el BK<sub>Ca</sub> funciona com un sensor, per exemple en les cèl·lules quimiorreceptores del cos carotídi, l'arribada de l'estímul (disminució en la PO<sub>2</sub>) produeix una inactivació del BK<sub>Ca</sub>, que condueix a una despolarització de les cèl·lules provocant una entrada de Ca<sup>2+</sup> i alliberament de neurotransmissors (Lopez-Barneo *et al.*, 2001). En el cas de la cèl·lula trabecular no es pot descartar que el BK<sub>Ca</sub> funcioni per ell mateix com a sensor de la pressió intraocular, però tal i com s'ha descrit en els resultats, l'*stretch* de la membrana activa el canal i això conduiria a una hiperpolarització cel·lular si la cèl·lula trabecular fos excitable. En la majoria de processos de transducció sensorial es produeix una entrada de càrregues positives, a través de canals catiónics, que produeix la despolarització de la membrana i no s'han descrit cèl·lules sensorials que utilitzin canals de Cl<sup>-</sup>, per exemple (Hille, 2001). Per tant sembla improbable que un sensor actui hiperpolaritzant la membrana, com en el cas de l'activació del BK<sub>Ca</sub> per l'*stretch*. L'únic cas conegut en que la transducció sensorial es produeix mitjançant una hiperpolarització de la membrana és en els fotoreceptors de la retina.

Malgrat tot i segons els resultats obtinguts, no hi ha dubte de que el BK<sub>Ca</sub> pot jugar un paper important en la regulació de la IOP i de l'evacuació de l'humor aquós. S'ha postulat que el tò contràctil de la xarxa trabecular està implicat en la regulació de la facilitat d'evacuació (Wiederholt, 1998a). Diferents estudis han demostrat que la relaxació de la xarxa està associada amb un augment de la facilitat d'evacuació i, pel contrari, una contracció del teixit causaria una disminució de la facilitat (Wiederholt *et al.*, 1995; Stumpff *et al.*, 1997). Per tant, si assumim que una població cel·lular del teixit trabecular té propietats contràctils, qualsevol estímul que produeixi una despolarització i augmenti la concentració de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular, per exemple l'endotel·lina-1, contraurà les cèl·lules i disminuirà la facilitat d'evacuació. En condicions on la IOP està augmentada, ja sigui per causes patològiques o per fluctuacions circadianes, l'*stretch* sobre la membrana faria que el llindar d'activació del BK<sub>Ca</sub> fos més baix, essent més sensible als estímuls que l'activin. Per exemple, l'efecte contràctil de l'endotel·lina-1 seria menor degut a una major activació del BK<sub>Ca</sub>. De fet al múscul llis vascular s'han descrit mecanismes similars per activació de canals de K<sup>+</sup> per hipòxia (Lopez-Barneo *et al.*, 2001). En artèries de petit tamany que mostren un tò miogènic endogen, l'activitat del BK<sub>Ca</sub> contribueix al potencial de repòs de la membrana, doncs si es bloqueja el canal amb iberiotoxina o tetraetilamoni (TEA), la membrana es despolaritza i es produeix una vasoconstricció (Jackson, 2000). Estímuls vasoconstrictors activaran el BK<sub>Ca</sub> que actuarà així limitant la vasoconstricció i prevenint un vasoespasme. El canal també és activat per diferents vasodilatadors com l'NO, que a través de la formació de GMPc activarà el BK<sub>Ca</sub> (Stumpff *et al.*, 1997; Gasull *et al.*, 2001; Weiger *et al.*, 2002) i l'estradiol que ho farà directament unint-se a la subunitat β (Valverde *et al.*, 1999).

A l'ull, els teixits del segment anterior ocular estan sotmesos a la tensió que genera la IOP. En condicions fisiològiques la IOP manté uns valors de 15-16 mm Hg, amb petites variacions entre el dia i la nit. En alguns tipus de glaucoma aquests valors poden arribar fins a 55-60 mm Hg. En aquest sentit les cèl·lules trabeculars han de ser capaces de respondre a aquests canvis de pressió modificant les seves propietats per així adaptar-se a les noves condicions. En aquest treball s'ha descrit una activació del canal fins i tot a pressions fisiològiques, per tant es pot hipotetitzar que el BK<sub>Ca</sub> forma part, junt amb altres canvis cel·lulars, dels mecanismes d'adaptació de les cèl·lules trabeculars a les variacions de pressió. Un mecanisme similar s'ha descrit en les cèl·lules de l'epitel·li corneal de conill, on la detecció de l'*stretch* de la membrana és important per la homeostasi de la cèl·lula (Watanabe *et al.*, 1997). D'altra banda, el citoesquelet cel·lular s'ha vist involucrat en la regulació de la facilitat d'evacuació,

esdevenint una diana farmacològica pel tractament del glaucoma (Tian *et al.*, 2000). Les cèl·lules trabeculars han demostrat respondre a l'*stretch* mecànic alterant l'estructura del citoesquelet d'actina i també modificant la senyalització intracel·lular (Tumminia *et al.*, 1998). Altres estudis han demostrat que davant augments de pressió hidrostàtica les cèl·lules trabeculars responen augmentant la concentració de  $Ca^{2+}$  intracel·lular (Matsuo & Matsuo, 1996), augmentant l'activitat metaloproteinasa (Bradley *et al.*, 2001) o mitjançant un augment en la producció basal de NO (Matsuo, 2000). A més, l'endotel·li del canal d'Schlemm respon de manera similar a l'elevada pressió hidrostàtica augmentant la síntesi d'AMPc (Stamer *et al.*, 1999). Una observació important és que les cèl·lules trabeculars responen a la IOP elevada a través de canvis en l'expressió de gens determinats, els productes dels quals podrien intervenir en la regulació de l'evacuació de l'humor aquós (Gonzalez *et al.*, 2000; Borrás, 2003). L'augment en l'expressió de certs gens, junt amb la resposta induïda per la deformació directa de les cèl·lules trabeculars configurarien un mecanisme homeostàtic de regulació de la IOP.

En aquest treball s'ha demostrat que l'augment de tensió de la membrana causat per un xoc hipotònic incrementa els corrents totals mitjançats pel  $BK_{Ca}$ , que són selectivament inhibits pel bloquejant específic, iberiotoxina. En altres sistemes l'augment del volum cel·lular també ha provocat un augment dels corrents mediat per aquest canal (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2002). No es pot descartar que les solucions hipotòniques o l'*stretch* de la membrana activin altres canals, per exemple de  $Cl^-$ , com s'ha descrit anteriorment (Mitchell *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2004). Malgrat tot, la manca d'ATP a la solució intracel·lular (pipeta) fa improbable una activació dels corrents de  $Cl^-$ , doncs és conegut que l'ATP és necessari per l'activació de corrents aniónics de sortida (Sardini *et al.*, 2003). La participació del  $BK_{Ca}$  en processos de regulació del volum de la cèl·lula trabecular ha estat descrit amb anterioritat, així com la seva implicació en la recuperació de la facilitat d'evacuació basal després d'un xoc hipotònic (Soto *et al.*, 2004). A part de l'activació per l'*stretch* mecànic, l'activitat del canal  $BK_{Ca}$  es pot veure modulada per altres factors, com la hipòxia cel·lular.

L'humor aquós contingut a la cambra anterior ocular presenta uns valors de  $PO_2$  al voltant dels 55 mmHg, que són inferiors comparats amb altres teixits més oxigenats (sang arterial > 80 mmHg). La hipòxia a la cambra anterior es pot produir per diferents causes com són l'ús de lents de contacte (Stefansson *et al.*, 1983; McLaren *et al.*, 1998), la utilització de substàncies vasoconstrictores (Helbig *et al.*, 1993), i diferents patologies com el síndrome isquèmic ocular (Malhotra & Gregory-Evans,

2000) o el síndrome pseudoexfoliatiu (Conway *et al.*, 2004). Nombrosos estudis han demostrat la modulació del BK<sub>Ca</sub> per la hipòxia en altres teixits. Els resultats presentats en aquest treball demostren que la hipòxia aguda produeix una disminució dels corrents mitjançats pel BK<sub>Ca</sub>. Aquestes observacions estan d'acord amb el publicat anteriorment per aquest canal (Liu *et al.*, 1999; Riesco-Fagundo *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2002; Olschewski *et al.*, 2002b), tot i que també s'ha descrit un augment de l'activitat del BK<sub>Ca</sub> per la hipòxia (Gebremedhin *et al.*, 1994). A diferència del descrit per l'*stretch*, la constant d'activació del canal es veu incrementada per la hipòxia, d'acord amb el descrit per Lewis i col·laboradors (Lewis *et al.*, 2002). Malgrat que la hipòxia crònica no modifica els corrents basals, la hipòxia aguda disminueix els corrents del BK<sub>Ca</sub> tant en les cèl·lules crescudes en hipòxia com en les normòxiques.

Com ja s'ha explicat anteriorment, la contracció de la xarxa trabecular estaria implicada en la regulació de l'evacuació de l'humor aquós (Wiederholt *et al.*, 1995), per tant la inhibició del BK<sub>Ca</sub> per la hipòxia suposaria un augment del tò contràctil i, en conseqüència una disminució en la facilitat d'evacuació. Si l'activació del BK<sub>Ca</sub> està disminuïda, l'acció de substàncies que contrauen el teixit serà més important doncs la relaxació mitjançada per aquest canal estarà dificultada. En patologies on es produeix una disminució en la PO<sub>2</sub>, com en el síndrome pseudoexfoliatiu, la inhibició del BK<sub>Ca</sub> contribuiria a la disminució en l'evacuació de l'humor aquós, i juntament amb l'acumulació anormal de productes de la matriu extracel·lular configuraria un factor de risc addicional pel desenvolupament d'un glaucoma secundari.

Pel que fa a la mobilització del Ca<sup>2+</sup> intracel·lular, s'han de tenir en compte dos resultats importants. La hipòxia crònica produeix un augment de la concentració de Ca<sup>2+</sup> basal. Aquest augment, tot i ser significatiu respecte els valors control, no semblaria suficient per activar el canal BK<sub>Ca</sub>, encara que això no es pot descartar amb seguretat. D'altra banda, l'increment de Ca<sup>2+</sup> produït per la bradikinina és menor en condicions hipòxiques i el temps necessari per recuperar el 70% de l'increment de Ca<sup>2+</sup> (t<sub>70</sub>) també és significativament inferior respecte el control. Com s'ha descrit previament (Llobet *et al.*, 1999), el pic de Ca<sup>2+</sup> que provoca la bradikinina a les cèl·lules trabeculars es pot dividir en dues fases: 1) un ràpid increment inicial de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular, relacionat amb una sortida de Ca<sup>2+</sup> dels dipòsits intracel·lulars, 2) seguit d'un retorn sostingut provocat per l'entrada de Ca<sup>2+</sup> des de l'exterior per reomplir aquests dipòsits (entrada capacitativa) probablement a través de canals TRP (transient receptor potential) (Nilius *et al.*, 2003) encara que no s'ha descrit en les cèl·lules trabeculars.

D'altra banda, el nostre grup també ha descrit que la bradikinina activa el BK<sub>Ca</sub> a les cèl·lules trabeculars bovines (Gual *et al.*, 1999) probablement degut a l'increment transitori de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular que provoca aquesta droga (Llobet *et al.*, 1999). L'efecte de la bradikinina sobre el Ca<sup>2+</sup> intracel·lular també s'ha mesurat en presència d'iberiotoxina, bloquejant específic del BK<sub>Ca</sub>, observant-se una disminució del t<sub>70</sub> fet que implicaria una menor entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup> des de l'exterior. En aquest sentit, sembla plausible que l'activació del BK<sub>Ca</sub> per la bradikinina produeixi una hiperpolarització del potencial de membrana, que faci augmentar el gradient elèctric per l'entrada de Ca<sup>2+</sup>, tal i com s'ha descrit en altres sistemes (Kamouchi *et al.*, 1997).

En condicions hipòxiques s'ha observat que l'activació del BK<sub>Ca</sub> està disminuïda i que en resposta a bradikinina, l'increment de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular és menor i el t<sub>70</sub> és més curt. Degut a que l'increment de Ca<sup>2+</sup> és més petit en condicions hipòxiques, els efectes de la bradikinina (contràctils o d'altres tipus) podrien ser menors. Donat que la hipòxia inhibeix l'activitat del canal, aquest efecte junt amb un menor activació pel Ca<sup>2+</sup> intracel·lular, faria que el BK<sub>Ca</sub> no pogués contrarestar els efectes de la bradikinina, hiperpolaritzant la membrana i relaxant la cèl·lula.

D'altra banda i tenint en compte la inhibició del BK<sub>Ca</sub> per la hipòxia, el fet de que el t<sub>70</sub> sigui més curt en condicions hipòxiques explicaria una participació del BK<sub>Ca</sub> en l'entrada capacitativa de Ca<sup>2+</sup>, corroborant que aquest canal proporciona el gradient electroquímic necessari per l'entrada de Ca<sup>2+</sup>.

Finalment, a nivell de la xarxa trabecular, els efectes de la hipòxia sobre el BK<sub>Ca</sub> podrien augmentar el tò contràctil del teixit, produïnt una disminució de l'evacuació de l'humor aquós. A més és possible que l'efecte de drogues que contrauen el teixit, com la bradikinina, sigui més important i contribueixin també a la disminució del fluxe.

D'altra banda, com s'ha descrit a la introducció, el canal BK<sub>Ca</sub> també participa en processos de regulació de volum cel·lular (Soto *et al.*, 2004) que es veurien afectats per la hipòxia. Després d'un augment de volum cel·lular, la inhibició del BK<sub>Ca</sub> per la hipòxia dificultaria la recuperació del mateix. Degut a que el volum cel·lular s'ha implicat en la regulació de l'evacuació de l'humor aquós (Gual *et al.*, 1997; Soto *et al.*, 2004), aquesta també es podria veure afectada per la hipòxia.

En aquest treball s'ha demostrat que diferents factors com l'*stretch* i la hipòxia modulen l'activitat del canal BK<sub>Ca</sub> a la membrana de les cèl·lules trabeculars.