

# TESI DOCTORAL

## **Canals de clorur a les cèl·lules trabeculars: implicacions en l'evacuació de l'humor aquós**

**Núria Comes i Beltran**

Laboratori de Neurofisiologia  
Departament de Ciències Fisiològiques I



UNIVERSITAT DE BARCELONA





Facultat de Medicina  
Laboratori de Neurofisiologia  
Unitat de Fisiologia  
**Dept. CC. Fisiològiques I**

Casanova 143  
E-08036 Barcelona – Spain  
Tel. (34) 93 402 4519  
Fax (34) 93 403 5295

XAVIER GASULL CASANOVA i ARCADÍ GUAL SALA, professors Ordinaris de Fisiologia del Departament de Ciències Fisiològiques I de la Universitat de Barcelona,

CERTIFIQUEN: Que el treball d'investigació corresponent a la Tesi Doctoral que porta per títol "Canals de clorur a les cèl·lules trabeculars: implicacions en l'evacuació de l'humor aquós" del que és autora Núria Comes i Beltran, ha estat realitzat sota la seva direcció en el Departament de Ciències Fisiològiques I de la Universitat de Barcelona.

I per a que així consti i als efectes oportuns, firmen el present certificat a Barcelona, 15 d'Octubre de 2005.

# Canals de clorur a les cèl·lules trabeculars: implicacions en l'evacuació de l'humor aquós

Tesi Doctoral presentada per Núria Comes i Beltran per optar al grau de Doctor  
per la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Octubre de 2005

Directors: Dr. Xavier Gasull Casanova i Dr. Arcadi Gual Sala

# Índex

---

---

1 INTRODUCCIÓ .....	3
1.1 Anatomia funcional del globus ocular .....	3
1.1.1 Parts del globus ocular .....	3
1.1.2 Anatomia de les cambres oculars .....	5
1.1.3 L'angle iridocorneal .....	6
1.2 La xarxa trabecular .....	6
1.2.1 Ultraestructura de la xarxa trabecular .....	7
1.2.2 Innervació de la xarxa trabecular .....	8
1.2.3 El canal d'Schlemm .....	8
1.3 L'humor aquós .....	8
1.3.1 Funcions de l'humor aquós .....	9
1.3.2 Composició de l'humor aquós .....	9
1.3.3 Dinàmica de l'humor aquós .....	10
1.3.3.1 Formació i secreció de l'humor aquós .....	11
1.3.3.2 Evacuació de l'humor aquós .....	14
1.4 La pressió intraocular .....	16
1.4.1 Variacions fisiològiques de la pressió intraocular .....	17
1.4.2 Alteracions de la pressió intraocular. El Glaucoma .....	17
1.4.2.1 Tipus de glaucoma .....	19
1.4.2.2 Gens lligats al glaucoma .....	21
1.4.2.3 El tractament del glaucoma .....	23
1.5 Fisiologia de la cèl·lula trabecular .....	25
1.5.1 Poblacions i heterogeneïtat .....	26
1.5.2 Propietats de les cèl·lules trabeculars .....	27
1.5.3 La matriu extracel·lular .....	28
1.5.4 Receptors descrits a la cèl·lula trabecular .....	29
1.5.5 Cotransportadors i canals iònics descrits a la cèl·lula trabecular .....	30
1.5.5.1 Bombes .....	30
1.5.5.2 Cotransportadors i intercanviadors .....	30
1.5.5.3 Canals de sodi .....	31
1.5.5.4 Canals de calci .....	31
1.5.5.5 Aquaporines .....	31
1.5.5.6 Canals de potassi .....	32
1.5.5.7 Canals clorur .....	32

---

1.6	Canals de clorur .....	33
1.6.1	Canals de clorur voltatge-dependents CLC .....	33
1.6.1.1	Estructura dels canals CLC .....	33
1.6.1.2	Malalties associades a mutacions en gens <i>CLCN</i> .....	34
1.6.2	Canals de clorur modulats per canvis de volum.....	35
1.6.2.1	CIC-2 .....	35
1.6.2.2	Corrents de Cl <sup>-</sup> activats per augments de volum (ICl <sub>swell</sub> ) .....	40
1.7	Modulació de l'evacuació de l'humor aquós per la via convencional....	47
1.7.1	El to del múscul ciliar .....	47
1.7.2	Propietats contràctils de la cèl·lula trabecular .....	49
1.7.3	Canvis en la composició de la matriu extracel·lular .....	51
1.7.4	Canvis en l'expressió de gens .....	52
1.7.4.1	Efectes de l'elevada pressió .....	53
1.7.4.2	Efectes del tractament amb dexametasona.....	54
1.7.5	Regulació del volum de les cèl·lules trabeculars.....	55
2	OBJECTIUS.....	61
3	RESULTATS.....	63
3.1	Article 1 .....	65
3.2	Article 2 .....	81
3.3	Article 3 .....	113
3.4	Resums dels resultats.....	131
4	DISCUSSIÓ .....	141
5	CONCLUSIONS .....	165
6	REFERÈNCIES .....	169

**Índex de les abreviacions utilitzades**

ABC = *ATP-binding cassette*  
AC = adenilat ciclase  
9-AC = àcid antracè-9-carboxílic  
AMPc = adenosinmonofosfat cíclic  
[AMPc]<sub>i</sub> = concentració intracel·lular d'AMPc  
ANP = *atrial natriuretic peptide*  
AQP = aquaporina  
ATP = adenosintrifosfat  
[ATP]<sub>e</sub> = concentració extracel·lular d'ATP  
[ATP]<sub>i</sub> = concentració intracel·lular d'ATP  
ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> = bomba electrogènica de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>  
AVD = *apoptotic volume decrease*  
Ba<sup>2+</sup> = bari  
BAPTA = àcid 1,2-bis(2-amino-fenoxi)età N,N,N',N'-tetraacètic  
BDNF = *brain-derived neurotrophic factor*  
BK<sub>Ca</sub> = canal de K<sup>+</sup> d'alta conductància dependent de Ca<sup>2+</sup>  
BNP = *brain natriuretic peptide*  
Br<sup>-</sup> = bromur  
8-Br-AMPc = 8-Bromo-adenosinmonofosfat cíclic  
Ca<sup>2+</sup> = calci  
[Ca<sup>2+</sup>]<sub>e</sub> = concentració de Ca<sup>2+</sup> extracel·lular  
[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = concentració de Ca<sup>2+</sup> intracel·lular  
CBS = *cystathionine-β-synthase*  
Cd<sup>2+</sup> = cadmi  
CFTR = *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*  
Cl<sup>-</sup> = clorur  
[Cl<sup>-</sup>]<sub>e</sub> = concentració de Cl<sup>-</sup> extracel·lular  
[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub> = concentració de Cl<sup>-</sup> intracel·lular  
ClC = *chloride channel*  
ClC-K = *chloride channel-kidney*  
CLH = *Cl channel homologues*  
CNP = pèptid natriurètic de tipus c  
Cs<sup>+</sup> = cesi  
Cys = cisteïna  
DCPIB = àcid 4-(2-butí-6,7-dicloro-2-ciclopentil-indan-1-on-5-yl)oxobutíric  
DDFSK = dideoxiforskolina  
DEX = dexametasona  
DIDS = àcid 4,4'-diisotiocianatostilbè-2,2'-disulfònic  
DIOA = àcid [(dihidroindenil)oxi]alcanoic  
DPC = àcid difenilaminocarboxilat  
EDTA = àcid etilendiaminotetraacètic

Erk = *extracellular signal-regulated kinase*  
 EP = prostanoids  
 $F^-$  = fluorur  
 GABA = àcid  $\gamma$ -aminobutíric  
 $Gd^{3+}$  = gadolini  
 GMPc = guanosinmonofosfat cíclic  
 $[GMPc]_i$  = concentració intracel·lular de GMPc  
 GTP = guanosin monofosfat  
 GTP $\beta$ S = anàleg no hidrolitzable de GTP  
 $HCO_3^-$  = bicarbonat  
 $[HCO_3^-]_e$  = concentració de  $HCO_3^-$  extracel·lular  
 $[HCO_3^-]_i$  = concentració de  $HCO_3^-$  intracel·lular  
 His = histidina  
 $I^-$  = iodur  
 $I_{CFTR}$  = corrent de CFTR  
 $I_{Cl_{swell}}$  = corrent de clorur activat per *swelling*  
 $I_{Cl_{vol}}$  = corrent de clorur activat per volum  
 IgG = immunoglobulina G  
 IL-1 = interleukina-1  
 IOP = *intraocular pressure*  
 JOAG = *juvenil open-angle glaucoma*  
 KGF = *Keratinocyte growth factor*  
 Kir2.1 = *inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel*  
 IBTX = iberiotoxina  
 $IP_3$  = inositol trifosfat  
 $K^+$  = potassi  
 $[K^+]_e$  = concentració extracel·lular de  $K^+$   
 $[K^+]_i$  = concentració intracel·lular de  $K^+$   
 $La^{3+}$  = lantà  
 MAP = *mitogen-activated protein*  
 Maxi- $K^+$  = canal de  $K^+$  d'alta conductància dependent de calci  
 MDR1 = *human multidrug-resistance gene*  
 $Mg^{2+}$  = magnesi  
 $[Mg^{2+}]_e$  = concentració extracel·lular de  $Mg^{2+}$   
 $[Mg^{2+}]_i$  = concentració intracel·lular de  $Mg^{2+}$   
 MMP = *matrix metalloproteinase*  
 MMP-1 = col·lagenasa  
 MMP-2 = gelatinasa A  
 MMP-3 = estromelisina  
 MMP-9 = gelatinasa B  
 mPKI = inhibidor permeable de PKA  
 mRNA = *messenger RNA*  
 MQAE = *N-(ethoxycarbonylmethyl)-6-methoxyquinolinium bromide*  
 MYOC = *myocilin*  
 $Na^+$  = sodi  
 $NO_3^-$  = nitrat



NPPB = àcid 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic  
OPTN = *optineurin*  
P2Y = receptor purinèrgic metabotròpic  
P-gp = p-glicoproteïna  
pICln = canal de clorur regulador  
PCR = *polymerase chain reaction*  
PGE = prostaglandines  
PIP<sub>2</sub> = fosfatidil inositol difosfat  
PKA = proteïna quinasa A  
PKC = proteïna quinasa C  
POAG = *primary open-angle glaucoma*  
ROCK = *rho kinase protein*  
rRNA = *ribosomal RNA*  
RT = *reverse transcription*  
RVD = *regulatory volume decrease*  
RVI = *regulatory volume increase*  
SCN<sup>-</sup> = tiocianat  
siRNA = *small interfering RNA*  
SITS = àcid 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbè-2,2'-disulfònic  
TEA = tetraetilamoni  
TGF = *transforming grow factor*  
TIGR = *trabecular meshwork inducible glucocorticoid response protein*  
TK = tirosina quinasa  
TNF = *tumor necrotic factor*  
TIMP = inhibidor de les metal·loproteïnases o MMPs  
VIP = *vasoactive intestinal polipeptide*  
VSOAC = *volume-stimulated osmolyte and anion channel*  
VSOR = *volume expansion-sensing outwardly rectifying anion channel*  
VRAC = *volume-regulated anion channel*  
Zn<sup>2+</sup> = zinc

# **Introducció**

---

## INTRODUCCIÓ

### 1.1 Anatomia funcional del globus ocular

El globus ocular és una estructura sensorial localitzada a l'interior de la cavitat ocular del crani que es troba connectada amb el sistema nerviós central a través del nervi òptic. És una estructura altament especialitzada i la seva funció és enfocar les imatges sobre la retina on l'energia lluminosa es transforma en senyals elèctriques que són transmeses fins l'escorça visual on es forma la imatge.

#### 1.1.1 Parts del globus ocular

El globus ocular està recobert per tres capes o túniques. La capa més externa, la *túnica fibrosa*, està formada per l'esclera, el limbe esclerocorneal i la còrnia (Tripathi and Tripathi, 1984) (Figura 1).

L'*esclera* és una capa opaca, fibrosa i resistent, formada per teixit connectiu. Recobreix el globus ocular per la part més externa i les seves funcions són a més a més de protegir les estructures oculars, mantenir juntament amb la pressió intraocular (IOP) l'estructura adequada del globus ocular per una correcta funció visual.

El *limbe esclerocorneal* és la zona d'unió entre l'esclera i la còrnia i la seva funció és aportar els nutrients essencials a la còrnia a través dels capil·lars limbals. A la part més interna del limbe es troben la xarxa trabecular i el canal d'Schlemm.

La *còrnia* és un teixit transparent i avascular que recobreix el globus ocular per la part més anterior. Aquesta estructura amb forma convexa per l'exterior i còncava per l'interior té una funció principalment òptica ja que és l'estructura que aporta més poder refractant al sistema diòptric total de l'ull.

La *túnica vascular* és la capa intermèdia de l'ull i es caracteritza per estar fortament vascularitzada i pigmentada. Forma la coroide per la part posterior i l'úvea (que consta del cos ciliar i de l'iris) per la part anterior del globus ocular (Tripathi and Tripathi, 1984).

La *coroide* s'extén des de la inserció del nervi òptic fins el punt límit amb el cos ciliar, l'*ora serrata*. La seva funció principal és nodrir l'úvea i la part més externa de la retina.

El *cos ciliar* se situa a la part anterior de l'ull entre l'*ora serrata* (a continuació de la coroides i la retina) i l'iris. Per la part més anterior forma el límit de l'angle iridocorneal mentre que a la part posterior del cos ciliar es troben el múscul ciliar i els processos ciliars. Els lligaments suspensoris o zònules uneixen l'epiteli ciliar del cos ciliar amb el cristal·lí. Així la contracció i relaxació del múscul ciliar modifica la curvatura del cristal·lí en el mecanisme de l'acomodació visual. El cos ciliar juntament amb l'iris formen l'estructura anomenada úvea que separa les cambres anterior i posterior del globus ocular.

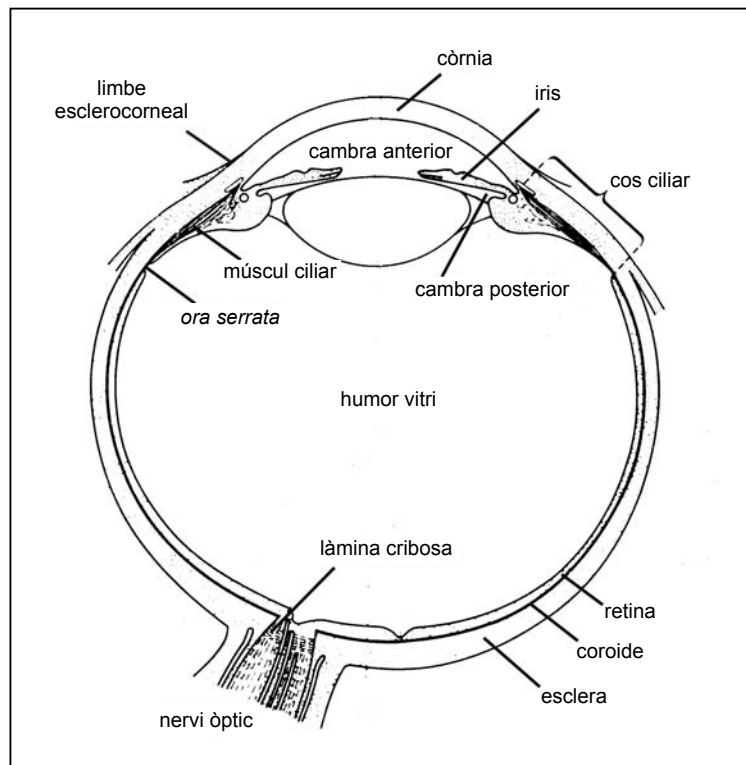


Figura 1. Parts que formen el globus ocular. Modificat de Tripathi, B. J. 1984.

L'*iris* és una estructura pigmentada i de naturalesa muscular que es troba insertada en la part mitja del cos ciliar fent de separació entre les dues cambres oculars. Presenta forma d'anella amb una obertura central, la pupil·la, a través de la qual l'humor aquós sintetitzat als processos ciliars passa de la cambra posterior a la cambra anterior. L'iris actua com un diafragma regulant la llum que travessa la pupil·la i arriba a la retina a través de la còrnia.

La *túnica sensorial* és la capa més interna del globus ocular i consta de l'epiteli pigmentari de la retina i de la retina (Tripathi and Tripathi, 1984).

L'*epiteli pigmentari* de la retina és la capa més externa de la túnica sensorial i es troba en contacte amb la coroida. S'extén des de la inserció del nevi òptic fins a l'*ora serrata* on entra en contacte amb l'epiteli ciliar pigmentat. La funció més important d'aquest epiteli és nodrir la retina i participar en el metabolisme del fòtopigment.

La *retina* és una capa transparent, situada a la part més interna del globus ocular i unida dèbilment a l'epiteli pigmentari. La retina s'organitza en diferents capes on es troben els fotoreceptors (cons i bastons), les interneurons i les cèl·lules ganglionars, els axons de les quals formen el nervi òptic.

### 1.1.2 Anatomia de les cambres oculars

Al globus ocular hi ha dues cambres ben diferenciades: la cambra anterior i la cambra posterior (Tripathi and Tripathi, 1984) (Figura 2).

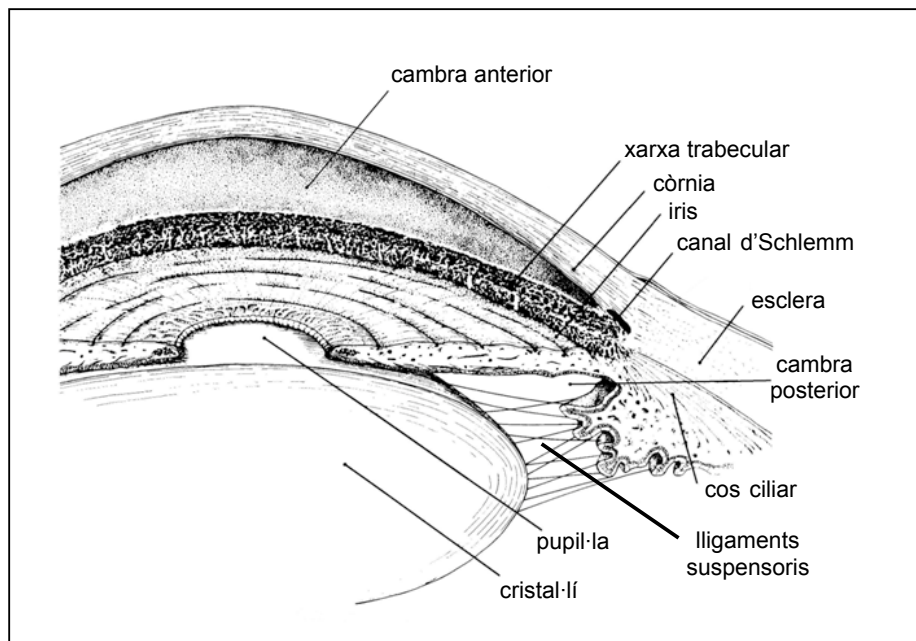


Figura 2. Esquema de les estructures que delimiten les cambres anterior i posterior del globus ocular. Modificat de Tripathi, B. J. 1984.

La *cambra posterior* és un espai delimitat per l'iris a la part anterior, l'humor vitri a la part posterior, el cos ciliar a la part lateral i el cristal·lí a la part medial (Tripathi and Tripathi, 1984). Aquesta cambra està plena de l'humor aquós, que se sintetitza als processos ciliars i flueix a través de la pupil·la omplint també la cambra anterior.

La *cambra anterior* limita per la part més anterior amb la còrnia i per la part posterior amb l'iris i el cristal·lí, que marquen la separació entre ambdues cambres. Lateralment, la cambra anterior limita amb la part anterior del cos ciliar que forma l'angle iridocorneal (Tripathi and Tripathi, 1984). Aquesta cambra conté l'humor aquós que proporciona nutrients a les estructures avasculares de l'ull a més a més de contribuir a mantenir una IOP fisiològica.

### 1.1.3 L'angle iridocorneal

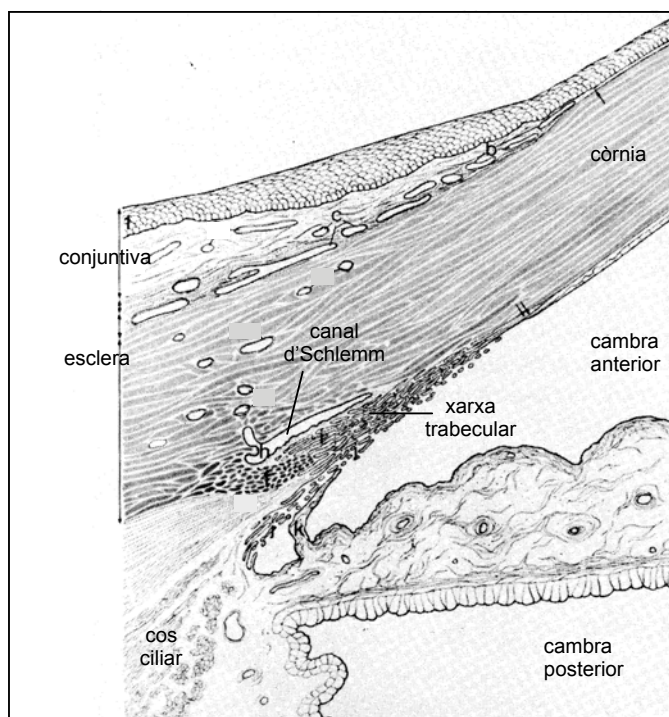


Figura 3. Angle iridocorneal i les estructures que el formen. Modificat de Cole, D.1984.

L'angle iridocorneal està format, tal com el seu nom indica, per la zona d'unió entre la inserció de l'iris, la còrnia i també l'esclera. L'angle entre l'iris i la còrnia és d'uns  $30^\circ$  i en aquesta zona es troben la xarxa trabecular i el canal d'Schlemm, que són estructures responsables de l'evacuació de l'humor aquós (Figura 3).

### 1.2 La xarxa trabecular

La xarxa trabecular és un teixit amb una estructura similar a la d'una esponja que se situa a l'angle iridocorneal i que s'extén des de l'endoteli de la còrnia a l'úvea. La malla trabecular està formada per una sèrie de bandes paral·leles planes i primes de teixit connectiu envoltades de cèl·lules de naturalesa similar a l'endotelial (Hart, 1994).

### 1.2.1 Ultraestructura de la xarxa trabecular

Des del punt de vista estructural i funcional la xarxa trabecular es divideix en tres parts diferenciades: 1) el trabècul uveal, representa la part més externa de la xarxa trabecular; 2) el trabècul corneoescleral, localitzat entre l'espoló escleral i l'endoteli de la còrnia; i 3) el trabècul cribiforme o juxtacanalicular, adjacent a l'endoteli intern del canal d'Schlemm (Gabelt and Kaufman, 2002) (Figura 4).

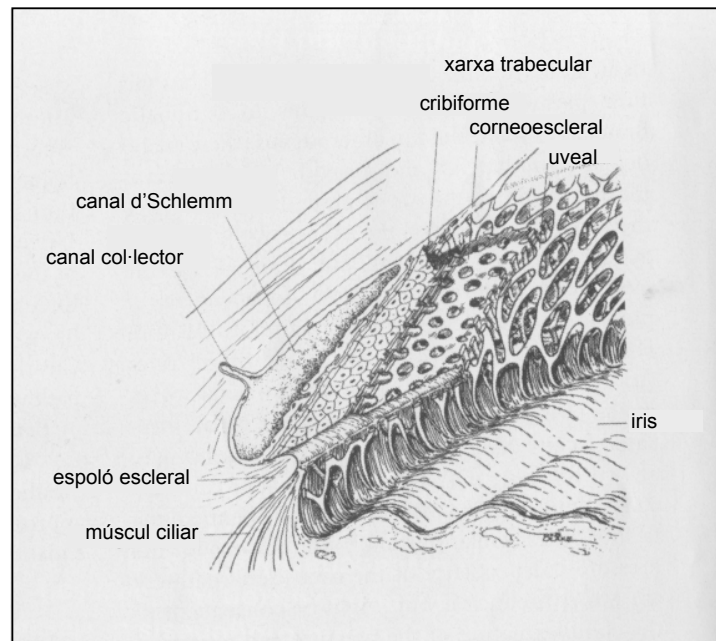


Figura 4. Tall longitudinal de la xarxa trabecular on s'aprecien les capes uveal, corneoescleral i cribiforme. Modificat de Gabelt, B. T. *et al.* 2003.

La *regió uveal* és la part del trabècul que es troba més en contacte amb la cambra anterior. Està format per fines làmines de teixit connectiu recobertes per cèl·lules endotelials formant una malla tridimensional. Aquesta estructura deixa grans espais entre les cèl·lules que ofereixen una baixa resistència al flux de l'humor aquós (Lütjen-Drecoll and Rhoen, 1994).

La *regió corneoescleral* és la zona intermèdia del trabècul i igual que la regió uveal està formada per làmines recobertes de cèl·lules endotelials que descansen sobre una làmina basal. En aquesta zona del trabècul les làmines de teixit connectiu són riques en glicoproteïnes, col·lagen, àcid hialurònic i fibres elàstiques. Aquesta capa del trabècul, amb una estructura més complexa que la regió anterior, presenta uns espais intercel·lulars inferiors que augmenten la resistència al pas del fluid (Lütjen-Drecoll and Rhoen, 1994).

La *regió cribiforme* és la zona més profunda del trabècul i està en contacte directe amb la cara interior del canal d'Schlemm a través d'un sistema de fibril·les. Aquesta regió del trabècul està format per cèl·lules contingudes en una densa matriu extracel·lular formada per una gran varietat de macromolècules com l'àcid hialurònic, glicosaminoaglicans, col·lagen, fibronectina, laminina i altres glicoproteïnes produïdes per les cèl·lules que envolten aquestes làmines. Aquesta és la capa que presenta els espais intercel·lulars més petits oferint la màxima resistència al pas de l'humor aquós (Gabelt and Kaufman, 2002).

### 1.2.2 Innervació de la xarxa trabecular

La xarxa trabecular rep innervació d'origen sensorial, simpàtic i parasimpàtic. La innervació sensorial prové del gangli trigemin, la simpàtica del gangli cervical superior i la parasimpàtica dels ganglis ciliar i pterigopalatí (Ruskell, 1975; Ruskell, 1976). La majoria de les fibres nervioses que arriben a la xarxa trabecular es caracteritzen per no tenir mielina, es troben en contacte directe amb les làmines trabeculars i acaben a la xarxa trabecular sense accedir a la còrnia (Feeney, 1962).

S'ha descrit que en tant en primats com en humans les fibres *sensorials* són les més abundants i innerven les regions uveal, corneoescleral i cribiforme de la xarxa trabecular així com ambdues parets del canal d'Schlemm (Stone i Kuwayama 1985). Tot i que la distribució de la innervació *simpàtica* varia molt entre espècies, en primats i humans es troba majoritàriament a la regió uveal de la xarxa trabecular. Les fibres *parasimpàtiques* també innerven majoritàriament el trabècul uveal (Stone, 1986).

### 1.2.3 El canal d'Schlemm

El canal d'Schlemm és una estructura insertada a l'esclera que recorre de manera circular tot l'angle iridocorneal. Està en contacte directe amb el trabècul cribiforme i juntament amb aquesta regió ofereix la màxima resistència al pas de l'humor aquós. La paret interna del canal està formada per cèl·lules endotelials unides a una capa subendotelial amb nombroses interdigitacions i fibres. L'endoteli del canal d'Schlemm és l'última estructura que atravesca l'humor aquós abans d'abandonar l'ull cap a la circulació venosa, alliberant-lo als canals col·lectors i d'aquí a les venes episclerals (Lütjen-Drecoll and Rhoen, 1994).

## 1.3 L'humor aquós

L'humor aquós és el fluid contingut a l'interior de les cambres posterior i anterior del globus ocular. Se sintetitza a partir de la sang arterial als processos ciliaris que el secreten activament a la cambra posterior. Seguidament, flueix a



través de la pupil·la cap a la cambra anterior on, a nivell de l'angle iridocorneal, es drena a través de les estructures d'evacuació retornant a la circulació venosa (Gabelt and Kaufman, 2002).

### 1.3.1 Funcions de l'humor aquós

L'humor aquós és responsable de: 1) mantenir la IOP dins d'uns marges fisiològics per garantir una correcta funció visual i 2) nodrir les estructures avasculares de l'ull com la còrnia i el cristal·lí i altres regions banyades per aquest fluid com la xarxa trabecular i l'humor vitri anterior.

### 1.3.2 Composició de l'humor aquós

A partir d'un filtrat plasmàtic en els capil·lars fenestrats de l'estroma dels processus ciliars del cos ciliar, l'humor aquós se secreta activament a la cambra posterior a través del doble epitel·li ciliar. La composició plasmàtica inicial, els components alliberats per l'epitel·li ciliar i altres teixits irrigats per l'humor aquós com l'endoteli corneal i el cristal·lí determinen la seva composició final (Caprioli, 2003). La composició de l'humor aquós és diferent de la del plasma perquè moltes substàncies presents en el plasma no estan a l'humor aquós. La diferència entre ambdues composicions s'explica per l'existència d'una barrera mecànica hemato-aquosa de naturalesa epitel·li i pel transport actiu de substàncies a través de l'epitel·li ciliar.

La composició de *proteïnes* del plasma es manté a l'humor aquós, encara que totes les proteïnes presents al plasma es troben en concentracions inferiors a l'humor aquós (Davson, 1990). En humans, la concentració proteica de l'humor aquós (B5-15 mg/100 mL) representa un 1% de la concentració plasmàtica de proteïnes (B6 g/100 mL). L'humor aquós però, conté una major quantitat de proteïnes de baix pes molecular com l'albumina i les B-globulines. L'albumina és la proteïna més abundant i amb una composició de 0.05-0.07 mg/mL representa la meitat de les proteïnes totals (Berman, 1991). La immunoglobulina més abundant a l'humor aquós, la IgG, presenta una concentració de 3 mg/100 mL en condicions normals tot i que augmenta significativament en patologies com la uveïtis (Berman, 1991). La concentració d'alguns *aminoàcids* és superior a l'humor aquós respecte el plasma, indicant que són transportats de manera activa a través de l'epitel·li ciliar. Fins ara s'ha demostrat la presència de quatre transportadors d'aminoàcids que juguen un important paper en la composició de l'humor aquós. La composició final d'aminoàcids així com d'altres substàncies de l'humor aquós depèn també de la seva difusió des de la cambra posterior cap a l'humor vitri on seran absorbits per la retina (Nilsson and Bill, 1994).

La *glucosa* arriba a la cambra posterior per difusió facilitada (Nilsson and Bill, 1994) i és de gran importància per la seva aportació energètica a la retina i als teixits avasculars com la còrnia i el cristal·lí. No obstant, la baixa concentració de glucosa a l'humor aquós respecte el plasma indicaria el consum de glucosa per part d'aquestes estructures (Davson, 1990). L'*àcid ascòrbic*, en canvi, presenta una concentració 20 vegades superior a la del plasma ja que se secreta de manera activa a través de l'epiteli ciliar pigmentat per un transportador de  $\text{Na}^+$  electrogènic, tot i que no es coneix el mecanisme a través del qual arriba a la cambra posterior. Les altes concentracions d'*àcid ascòrbic* podrien protegir l'ull dels radicals lliures formats per la radiació ultraviolada (Nilsson and Bill, 1994).

Pel que fa a la composició iònica, l'humor aquós presenta concentracions de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  i  $\text{Mg}^{2+}$  similars a les del plasma, mentre que existeix un dèficit de  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{HCO}_3^-$  i un excés de  $\text{Cl}^-$  respecte el plasma. L'homeòstasi de la concentració electrolítica manté una neutralitat elèctrica i aporta una capacitat tamponadora correcta a tots els teixits que irriga (Cole, 1984). Així, ha estat descrit que l'humor aquós és lleugerament hiperosmòtic respecte el plasma i aquesta osmolaritat es manté tant en la cambra anterior com en la posterior (Cole, 1972).

L'humor aquós també conté diferents hormones, factors de creixement, neuropèptids i enzims relacionats amb el metabolisme dels neurotransmissors com el VIP (Taylor et al., 1994), corticoides endògens (Obenberger et al., 1971) i TGF- $\beta$ 2 (Tripathi et al., 1994). S'ha detectat la presència de catecolamines, prostaglandines, epinefrina, norepinefrina, dopamina (Cooper et al., 1984) i dopamina B-hidroxilasa (Gual et al., 1983).

El manteniment de la composició de l'humor aquós és un procés altament regulat ja que la transparència de la còrnia i del cristal·lí és imprescindible per a la funció visual i depèn del correcte intercanvi d'aigua i soluts. Així, l'alteració de la seva composició podria provocar diferents patologies (Berman, 1991).

### 1.3.3 Dinàmica de l'humor aquós

L'humor aquós, format als processos ciliars i secretat activament a la cambra posterior, flueix a través de la pupil·la cap a la cambra anterior. Tot i que una petita part de l'humor aquós pot ser reabsorbit per l'humor vitri, l'iris i la còrnia es considera que la majoria de l'humor aquós es drena per les dues vies d'evacuació situades a l'angle iridocorneal de la cambra anterior (Figura 5). En primats, la *via trabecular o convencional* és la via d'evacuació majoritària (70-90%) mentre que la minoritària (10-30%) és la *via uveoscleral o no convencional* (Tripathi and Tripathi, 1984). El temps de recanvi de l'humor aquós és aproximadament de 100 minuts. Aquest flux constant aporta els nutrients a la còrnia, cristal·lí, xarxa trabecular i humor vitri anterior i a la vegada s'emporta els productes de desfeta d'aquests teixits avasculars (Caprioli, 2003).

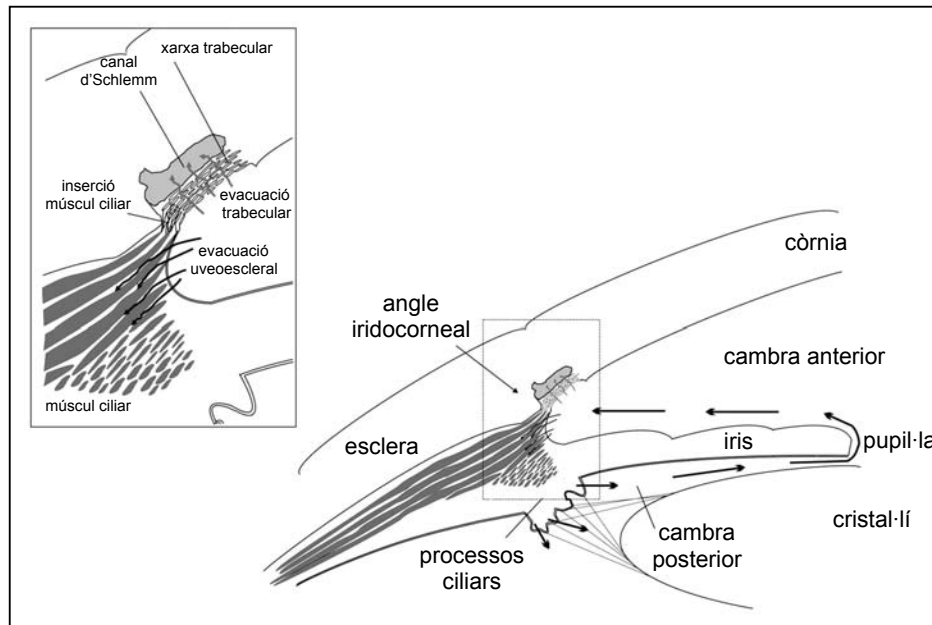


Figura 5. Esquema de la ruta de l'humor aquós des de la seva formació fins a l'evacuació a nivell de l'angle iridocorneal. L'humor aquós es forma als processos ciliars des d'on se secreta a la cambra posterior i arriba a la cambra anterior atravesant la pupila. L'esquema interior mostra amb detall l'angle iridocorneal on hi ha les vies d'evacuació uveal i trabecular que comprèn la xarxa trabecular i el canal d'Schlemm. L'equilibri entre ambdues rutes l'estableix el to del múscul ciliar, que facilita l'evacuació per la via uveal quan es relaxa. Modificat de Llobet, A. *et al.* 2003.

### 1.3.3.1 Formació i secreció de l'humor aquós

Al cos ciliar de l'ull humà existeixen entre 70 i 80 processos ciliars formats per un estroma de teixit connectiu altament vascularitzat per capil·lars amb grans fenestracions. Els processos ciliars estan recoberts per una doble capa epitelial formada per un epiteli no pigmentat en contacte amb l'humor aquós de la cambra posterior i un epiteli pigmentat que es troba entre l'epiteli no pigmentat i l'estroma ciliar (Figura 6). Els processos ciliars reben una abundant irrigació provinent del cercle major de l'iris i una innervació que es ramifica a partir dels nervis ciliars posteriors. L'humor aquós es forma a l'estroma ciliar a partir del plasma filtrat dels capil·lars fenestrats, travessa els dos epitelis i s'allibera a la cambra posterior mitjançant la difusió, la ultrafiltració i el transport actiu (Caprioli, 2003).

La *difusió* de soluts a través de les membranes es dona de manera passiva gràcies a la diferència de concentració afavorint el pas de substàncies, sobretot les de naturalesa liposoluble (Gabelt and Kaufman, 2002).

A l'interior dels processos ciliars es dona la *ultrafiltració* que és responsable del pas de soluts des dels capil·lars fenestrats cap a l'estroma ciliar. El pas de substàncies entre el plasma sanguini i el líquid intersticial que omple l'estroma ciliar és facilitat per la diferència de pressions hidrostàtiques entre els vasos

sanguinis i el globus ocular. S'ha descrit, però, que la producció de l'humor aquós disminueix un 80-90% en inhibir l'ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  responsable del transport actiu amb ouabaïna, indicant que la major part de l'humor aquós no s'origina per ultrafiltració (Nilsson and Bill, 1994). A més a més s'ha demostrat que la ultrafiltració no és el mecanisme majoritari en el procés de formació de l'humor aquós ja que les pressions hidrostàtiques a través de l'epiteli ciliar no afavoreixen aquest mecanisme. De fet, es considera que la quantitat d'humor aquós format depèn del transport actiu de soluts pel doble epitelí ciliar (Cole, 1972). Però en condicions patològiques com en el cas de la inflamació, la permeabilitat de la barrera hemato-aquosa es pot modificar i augmentar el pas de determinades proteïnes com l'albumina (Lütjen-Drecoll and Rhoen, 1994).

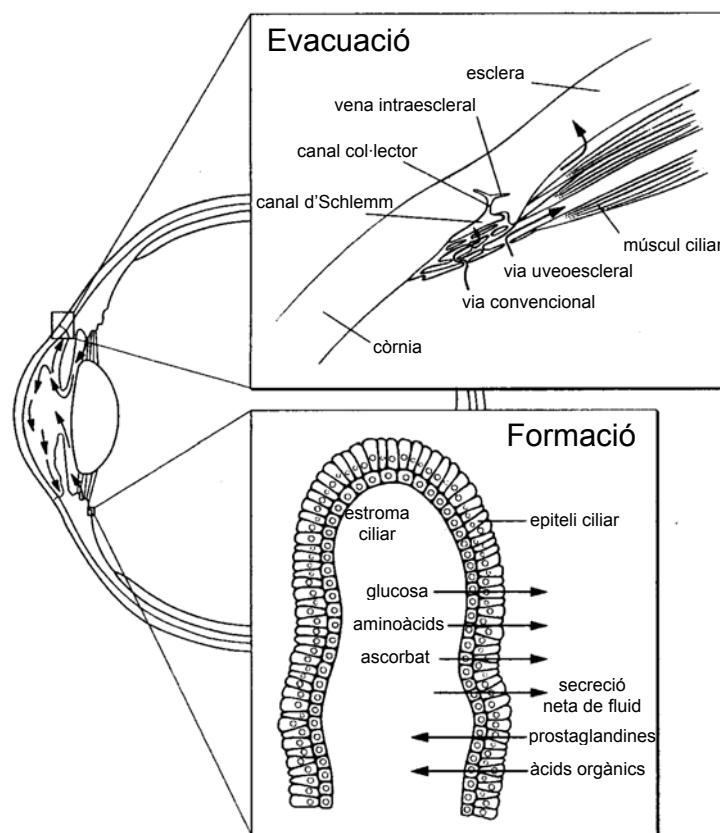


Figura 6. Estructures responsables de la formació i evacuació de l'humor aquós. Modificat de Nilsson, S. F. E. & Bill, A. 1994.

La difusió i la ultrafiltració són els mecanismes responsables de la formació d'un reservori d'humor aquós a l'estroma ciliar que és secretat activament cap a la cambra posterior. L'ultrafiltrat només pot accedir a la cambra posterior mitjançant la secreció activa (Burstein et al., 1984) ja que les cèl·lules que constitueixen aquest epitelí es troben fortament unides amb unions estretes tipus *tight junctions* o desmosomes, constituint la barrera hemato-aquosa (Uusitalo et al., 1973). A més a més de resultar altament impermeable al pas del filtrat, la

barrera hemato-aquosa selecciona els components del plasma que formaran l'humor aquós i determina així la seva composició final (Bill, 1968).

El mecanisme de *secreció activa* es dona a les dues capes de l'epiteli ciliar, tot i que la majoria del procés es desenvolupa a l'epiteli no pigmentat. Les cèl·lules de l'epiteli pigmentat presenten pocs orgànuls intracel·lulars en comparació amb les cèl·lules de l'epiteli no pigmentat, que contenen gran quantitat de mitocondris i reticle endoplasmàtic llis, característic de cèl·lules amb una gran activitat metabòlica. L'activitat de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  d'aquest epiteli provoca un excés de  $\text{Na}^+$  al medi extern que augmenta l'osmolaritat extracel·lular i provoca la sortida d'anions  $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$  acompanyats d'aigua per mantenir l'electroneutralitat de l'humor aquós. Aquesta secreció és un procés clau per determinar la composició final de l'humor aquós (Caprioli, 2003).

A l'ull arriben nombrosos terminals nerviosos simpàtics, parasimpàtics i sensorials que innerven els processos ciliars i les estructures d'evacuació (Belmonte et al., 1997). Així doncs, el *sistema nerviós simpàtic* pot modular tant la formació com l'evacuació de l'humor aquós. Agonistes B-adrenèrgics com l'apraclonidina redueixen la formació d'humor aquós mentre que agonistes B-adrenèrgics com l'isoproterenol l'estimulen (Nilsson and Bill, 1994). Per això antagonistes B-adrenèrgics com el timolol han estat àmpliament utilitzats en el tractament del glaucoma pel seu efecte hipotensor. El fet de que agonistes adrenèrgics no selectius com l'adrenalina estimulin tant els receptors B com els B-adrenèrgics depenent de la concentració explica que també puguin modular la formació de l'humor aquós. L'estimulació del *sistema nerviós parasimpàtic* allibera acetilcolina i VIP que augmenta la formació de l'humor aquós (Nilsson et al., 1986) que podria explicar en part l'increment de la IOP per l'estimulació dels nervis facials. Les fibres del *sistema nerviós sensorial* s'activen per estímuls mecànics, químics i/o tèrmics i són responsables del dolor en estats inflamatoris oculars com pot ser l'uveïtis (Belmonte et al., 1997; Mintenig et al., 1995).

L'adenilat ciclasa (AC), responsable de la formació d'AMPc desenvolupa un paper important en el procés de producció de l'humor aquós. Compostos com els agonistes B-adrenèrgics modulen la síntesi d'humor aquós estimulant la formació d'AMPc al cos ciliar mitjançant l'activació de l'AC. Els agonistes B-adrenèrgics tenen poc efecte sobre la formació d'AMPc però inhibeixen la formació induïda pels receptors B-adrenèrgics (Nilsson and Bill, 1994).

Tenint en compte els mecanismes implicats en la síntesi, secreció i regulació, els nivells d'humor aquós és mantenen força constants tot i que pateixen lleugeres fluctuacions. En humans, la producció d'humor aquós segueix el ritme circadià sent durant el son ( $1.5 \geq l/\text{min}$ ) un 45% inferior com a mitjana que durant la vigília ( $2.5 \geq l/\text{min}$ ). Aquestes variacions es poden explicar per la major activitat simpàtica durant el dia així com per altres factors hormonals (Nilsson and Bill, 1994).

## 1.3.3.2 Evacuació de l'humor aquós

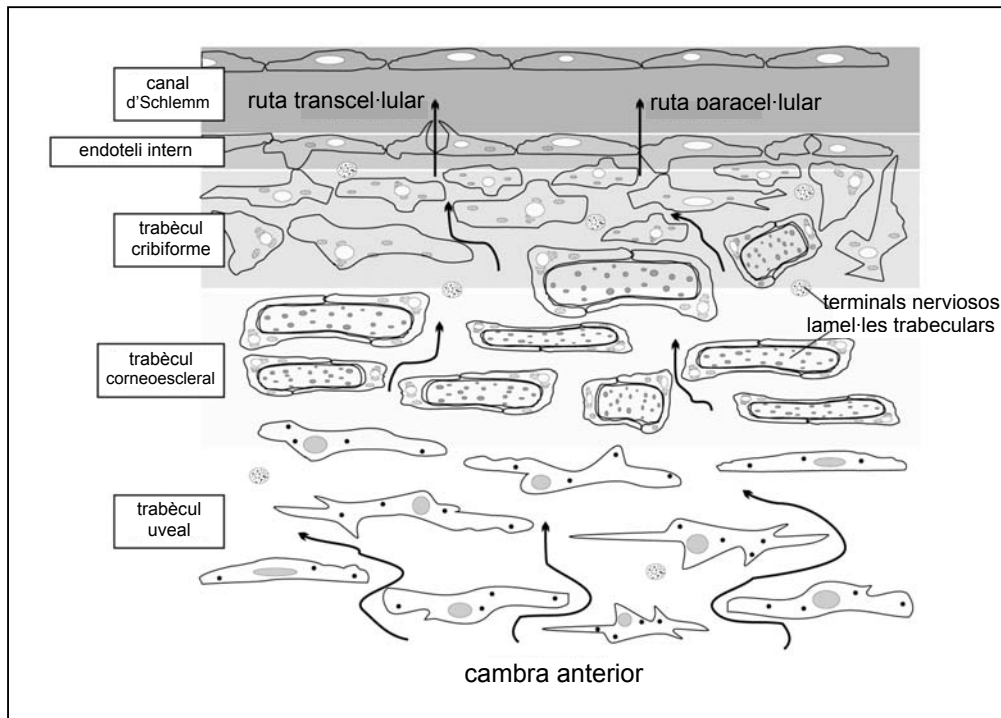


Fig. 7. Esquema del drenatge de l'humor aquós per la via convencional. Les fletxes indiquen la direcció de l'humor aquós des de la cambra anterior fins el canal d'Schlemm. L'humor aquós flueix entre les cèl·lules trabeculars i travessa l'endoteli del canal d'Schlemm a través de la via paracel·lular i les vacuoles gegants de la via transcel·lular. La resistència al flux de l'humor aquós incrementa progressivament des de la cambra anterior al canal d'Schlemm a mesura que els espais intercel·lulars disminueixen de mida. Modificat de Lobet, A. *et al.* 2003.

L'evacuació de l'humor aquós es dona a través de dues vies, la via convencional o trabecular que és dependent de pressió i en humans majoritària, i la via uveoscleral, minoritària i independent de pressió. L'evacuació per la *via convencional* consisteix en el pas de l'humor aquós a través de la xarxa trabecular i el canal d'Schlemm. El drenatge a través d'aquesta via depèn de la pressió i augmenta en augmentar la IOP tot i que existeix un nivell de saturació a partir del qual l'evacuació no augmenta més pel col·lapse del canal d'Schlemm (Brubaker, 1975).

La xarxa trabecular modula de manera activa la resistència que ofereix al pas de l'humor aquós. Els espais que hi ha entre les cèl·lules determinen la porositat d'aquest teixit i controlen el pas de l'humor aquós cap el canal d'Schlemm (Figura 7). La resistència màxima al pas de l'humor aquós es troba al trabècul cribriforme o juxtacanicular juntament amb l'endoteli del canal d'Schlemm. Ha estat descrit que aquestes zones ofereixen un 90% de la resistència total d'aquesta via en primats (Lütjen-Drecoll and Rhoen, 1994).

L'obstrucció dels espais intercel·lulars dificulta el drenatge de l'humor aquós que en acumular-se a les cambres oculars pot derivar en un augment de la IOP.

L'endoteli intern del canal d'Schlemm és l'última barrera que atravesava l'humor aquós abans de ser evacuat cap a la circulació venosa. Està format per cèl·lules endotelials que es troben en contacte directe i fortament unides a una capa subendotelial (Lütjen-Drecoll and Rhoen, 1994). L'humor aquós atravesava l'epiteli pels espais entre les cèl·lules en l'anomenada *via intercel·lular o paracel·lular* (Epstein and Rohen, 1991). Però pel fet d'estar subjectes a constants variacions de flux i pressió en condicions fisiològiques, les cèl·lules de l'endoteli han desenvolupat diferents mecanismes per tal de facilitar el pas de l'humor aquós (Tripathi, 1968). El mecanisme més característic és la formació de canals transcel·lulars o vacuoles gegants que posen en contacte directe l'espai subendotelial amb el lumen del canal. Aquestes vacuoles permeten el pas de l'humor aquós per l'interior de les cèl·lules constituint la via *transcel·lular* (Lütjen-Drecoll and Rhoen, 1994) (Figura 8).

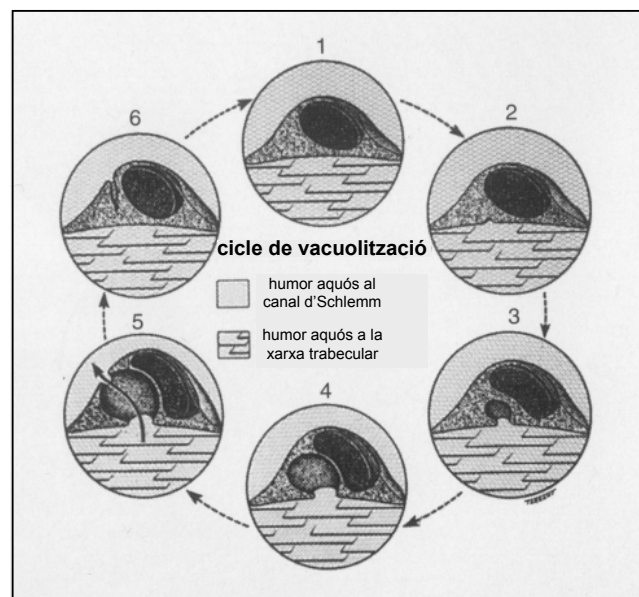


Figura 8. Formació de les vacuoles gegants que constitueixen la via transcel·lular. Les vacuoles es formen a les cèl·lules endotelials del canal d'Schlemm a partir de l'humor aquós i aboquen el seu contingut a la llum d'aquest canal. Modificat de Tripathi, R. C. 1968.

Com que la via convencional depèn de la IOP, el nombre de vacuoles pot augmentar quan aquesta incrementa. Aquest mecanisme, però, presenta un punt de saturació en determinats valors de pressió per sobre dels quals la IOP i el nombre de vacuoles ja no presenten una relació lineal i pot acabar col·lapsant-se totalment. No obstant, la importància relativa d'aquestes dues rutes d'evacuació resta encara per determinar (Gabelt and Kaufman, 2002).

La *via uveoscleral* permet el pas de l'humor aquós des de l'angle iridocorneal cap al cos ciliar ja que no existeix cap barrera epitelial que eviti aquesta ruta. Així, l'humor aquós es filtra lliurement a través de les fibres del múscul ciliar cap als espais supraciliar i supracoroidal (Nilsson and Bill, 1994). Des d'aquí es drena cap a l'esclera o a través de petits canalicles cap a l'exterior del globus ocular on és reabsorbit pels vasos de l'òrbita i la conjuntiva. Tot i que aquesta via és independent de la IOP, pot resultar impedida per la pressió a causa de la compressió del múscul ciliar i de l'espai supraciliar.

#### 1.4 La pressió intraocular

La pressió intraocular (IOP) és la pressió que suporten els teixits intraoculars i, tal com s'ha comentat anteriorment, depèn del fluid que omple les cambres oculars. La IOP no és la mateixa a totes les parts de l'ull; a la cambra posterior els valors són superiors que els de la cambra anterior per tal de facilitar el flux de l'humor aquós en aquesta direcció. A la cambra anterior els valors de IOP són de 18 mm Hg en ulls bovins (Erickson-Lamy et al., 1988) i 15-16 mm Hg en ulls humans (Erickson-Lamy et al., 1991b).

En condicions fisiològiques hi ha un equilibri entre la formació i l'evacuació de l'humor aquós i per tant es pot expressar:

$$F_{in} = F_{out} = F_{trab} + F_u$$

on  $F_{in}$  és l'entrada d'humor aquós a la cambra anterior i indica la seva formació;  $F_{out}$  és la sortida o evacuació de l'humor aquós;  $F_{trab}$  és l'evacuació per la via trabecular i  $F_u$  l'evacuació a través de la via uveoescleral.

D'acord amb la llei d'Ohm, el flux a través d'un sistema determinat ( $Q$ ) és directament proporcional a la diferència de pressió entre l'entrada i la sortida del sistema ( $BP$ ) i inversament proporcional a la resistència del sistema ( $R$ ). Per tant:

$$Q = BP / R$$

Aquesta equació es pot aplicar a la dinàmica de fluids del globus ocular tenint en compte que l'evacuació a través de la via trabecular és dependent de la IOP mentre que l'evacuació uveoescleral n'és independent (Maepea and Bill, 1989). La força que permet la sortida de l'humor aquós a través de la xarxa trabecular és la diferència de pressió hidrostàtica entre la cambra anterior i les venes episclerals on es drena l'humor aquós cap a l'exterior de l'ull. De tal manera que la llei d'Ohm es pot aplicar a la dinàmica de fluids del globus ocular de la següent manera:

$$F_{trab} = (F_{in} - F_u) = (IOP - P_v) / R$$



essent  $P_v$  la pressió de les venes episclerals i la  $R$  la resistència a través de la via convencional. Si s'expressa la resistència com a facilitat d'evacuació ( $C$ ), que es la inversa de la resistència, i s'aïlla la IOP, es pot expressar:

$$IOP = P_v + (F_{in} - F_u) / C$$

La determinació d'aquests paràmetres ha permès obtenir els següents valors en ulls humans:  $IOP=15-16$  mm Hg,  $P_v=8-9$  mm Hg,  $F_{in}=2.5-2.8$   $\geq$ l/min i  $C=0.3-0.4$   $\geq$ l/min/mm Hg. Tot i que l'evacuació a través de la via uveoscleral no ha estat determinada en ulls humans, el valor calculat de manera teòrica és de  $0.8$   $\geq$ l/min (Nilsson and Bill, 1994).

Els valors d'IOP es poden modificar per diferents factors com ara la pressió arterial o variacions en l'osmolaritat del plasma. Però els factors que realment determinen la IOP són els que influeixen en la formació i en l'evacuació de l'humor aquós, comentats anteriorment. A més a més, s'ha descrit que els valors d'IOP responen a mecanismes que regulen l'equilibri entre la formació i l'evacuació de l'humor aquós (Nilsson and Bill, 1994).

En humans, la IOP es mesura habitualment amb el tonometria d'aplanació que és una mesura indirecta que es basa en la força necessària per aplanar una àrea determinada de la còrnia. Així, i tenint en compte que la pressió és igual a la força per la superfície, amb mesures de força es pot conèixer la pressió interna del globus ocular. El tonòmetre de Goldman és un dels aparells que s'utilitzen en clínica habitualment per mesurar la IOP (Kaufman and Mittag, 1994).

#### 1.4.1 Variacions fisiològiques de la pressió intraocular

En condicions fisiològiques els valors d'IOP es mantenen força constants per assegurar un correcta funció ocular tot i que pateixen lleugeres fluctuacions. Existeixen variacions de la IOP de manera sincrònica amb la pressió arterial, augmentant amb la sístole i disminuint amb la diàstole. Aquestes variacions són només d'1 mm Hg però poden augmentar quan els valors de IOP són elevats. També s'han descrit variacions de la IOP sincròniques amb el ritme circadià, sent la IOP lleugerament més alta durant el dia que durant la nit. Aquestes variacions es poden explicar amb l'augment diürn de la taxa de formació d'humor aquós comentada anteriorment (Nilsson and Bill, 1994).

#### 1.4.2 Alteracions de la pressió intraocular. El Glaucoma

L'increment de la IOP per sobre de certs valors acostuma a estar causada per l'augment de la resistència d'evacuació i rarament es dona per un augment de la pressió de les venes episclerals o de la formació de l'humor aquós. L'elevada IOP pot derivar en l'estat patològic conegut amb el nom de glaucoma.

El glaucoma és un conjunt de neuropaties òptiques que es caracteritzen per una degeneració progressiva de les cèl·lules ganglionars de la retina i una pèrdua gradual del camp visual. En molts casos de glaucoma la IOP està el suficientment incrementada per afectar la funció visual de tal manera que l'elevada IOP resulta el principal factor de risc. Aquest augment de la IOP provoca una compressió dels axons de les cèl·lules ganglionars de la retina a la regió de la làmina cribosa on aquestes fibres convergeixen per formar el començament del nervi òptic encara que no es descarten altres hipòtesis. En els ulls glaucomatosos l'excavació que formen els axons de les cèl·lules ganglionars en convergir al nervi òptic és més gran i profunda. També hi ha una pèrdua progressiva del nombre de fibres del nervi òptic i la capa nerviosa de la retina té un gruix menor que en situacions fisiològiques. L'examen de la papil·la òptica és un dels mètodes més valuosos per diagnosticar precoçment el glaucoma ja que la seva aparença sovint es veu alterada abans que es detecti la pèrdua del camp visual (Weinreb and Khaw, 2004).

Més de 66 milions de persones en el món pateixen glaucoma sent aquesta malaltia la primera causa de ceguesa no traumàtica. Sense un tractament adequat, el glaucoma pot derivar en un ceguesa irreversible que actualment pateixen com a mínim uns 6.8 milions de persones de manera bilateral. Aquesta pèrdua de visió es pot evitar o frenar si és detecta als primers estadis, tot i que en molts casos el glaucoma es diagnostica amb una severa pèrdua en el camp visual com a primer signe. Per això en el tractament del glaucoma és de gran importància la detecció dels grups amb elevat risc de patir la malaltia i els correctes seguiments de la mesura de la IOP i l'aspecte del nervi òptic en aquests individus. A més a més de l'elevada IOP recentment s'han descrit altres mecanismes que poden contribuir al dany neuronal com la isquèmia i/o la hipòxia per una disfunció en l'aport sanguini, l'excés d'estimulació glutamatèrgica per una alteració en el funcionament de les bombes i transportadors de glutamat, l'estrès oxidatiu i la formació de radicals lliures i citoquines inflamatòries (Weinreb and Khaw, 2004).

Clínicament, la forma més freqüent de classificació del glaucoma és en funció de l'obertura de l'angle iridocorneal. En el *glaucoma d'angle tancat* l'augment de la IOP es deu a l'obstrucció mecànica del drenatge de l'humor aquós per l'acció de l'iris que disminueix l'angle que forma amb la còrnia. En canvi, en el *glaucoma d'angle obert*, l'angle iridocorneal és normal i l'elevada IOP es produeix segurament per una alteració en les vies de drenatge ja que s'han detectat alteracions a la xarxa trabecular. Aquestes alteracions poden ser de caràcter primari (*glaucoma primari d'angle obert*) o secundari (*glaucoma secundari d'angle obert*) dependent de l'absència o presència de factors associats que causen l'augment de la IOP. Classificant aquesta patologia segons l'edat dels individus que la pateixen, existeixen *glaucomes congènits, infantils, juvenils* o *adults* (Kanski, 1996).

### 1.4.2.1 Tipus de glaucoma

#### 1.4.2.1.1 Glaucoma primari d'angle obert

El glaucoma primari d'angle obert (POAG de *primary open-angle glaucoma*) és la forma més comú de glaucoma i es dona en l'edat adulta i normalment de manera bilateral. En el POAG el grau de l'angle iridocorneal és normal i l'augment de la resistència a l'evacuació de l'humor aquós es dona per causes encara per determinar. Generalment aquest increment en la resistència provoca un augment progressiu de la IOP que per sobre de 21 mm Hg es considera patològica augmentant el risc de lesionar el nervi òptic. La causa de l'elevada IOP per la disminució de l'evacuació de l'humor aquós és algun tipus d'alteració del trabècul cribiforme o el canal d'Schlemm. No obstant, hi ha casos en els quals el POAG es dona en individus amb pressions normals (B15 mmHg).

Estudis morfològics en teixit trabecular provinent d'individus amb POAG mostren una disminució de la cel·lularitat al teixit trabecular i de les vacuoles gegants del canal d'Schlemm. També s'ha detectat l'acumulació de material provinent de la matriu extracel·lular i del cristal·lí, material de pseudoexfoliació i molècules de pigment i de col·lagen entre les làmines de la regió trabecular cribiforme. L'obstrucció dels espais intercel·lulars per aquesta deposició i un augment del gruix de les làmines en el trabècul uveal i corneoescleral podria ser la causa de la pèrdua de les cèl·lules endotelials. Aquestes alteracions podrien dificultar la facilitat d'evacuació i incrementar la IOP (Lutjen-Drecoll, 1994).

Tot i que les bases biològiques del POAG no es coneixen per complet, el risc de patir la malaltia incrementa amb el nombre i la força dels factors de risc. L'elevada IOP, el factor de risc més important, ve donada majoritàriament pel volum d'humor aquós que està contingut a l'interior de les cambres oculars. Per això, alteracions en la síntesi o evacuació de l'humor aquós en poden provocar una acumulació que deriva en un augment de la pressió interna de l'ull. A més a més de l'elevada IOP, els factors de risc reconeguts són l'edat elevada, raça afro-americana, algunes anormalitats en el camp visual, nivells alts de miopia i història familiar de glaucoma. Altres factors associats al dany en el nervi òptic però amb menor risc de desenvolupar glaucoma inclouen hipertensió sistèmica, malalties cardiovasculars, migranya i gruix corneal més petit del normal (Weinreb and Khaw, 2004).

Ja que l'elevada IOP és el més destacat dels factors de risc anteriorment esmentats en el desenvolupament de POAG i que valors elevats de IOP s'associen a una major lesió del nervi òptic, la reducció de la IOP és l'objectiu principal del tractament pel glaucoma. La manca de símptomes en els primers estadis de la malaltia, en dificulta el diagnòstic i fa que en molts casos no es detecti fins que existeix una pèrdua de visió evident (Weinreb and Khaw, 2004).

#### 1.4.2.1.2 Glaucomes secundaris

Els glaucomes secundaris es poden induir per diverses causes conegudes on s'han descrit alteracions a la xarxa trabecular que provoquen una disminució de la seva permeabilitat i augmenten la IOP.

L'administració tòpica o sistèmica de *glucocorticoides* com la dexametasona (DEX), provoca un increment de la IOP en un 30-40% dels individus tractats i esdevé un factor de risc que pot provocar glaucoma (Clark, 1995). Estudis realitzats en segments anteriors oculars o en teixits trabeculars sotmesos al tractament d'esteroides *in vitro*, revelen alteracions en l'expressió de gens i el contingut de DNA del nucli, la organització del citoesquelet, l'acumulació de material de la matriu extracel·lular, la secreció de glicoproteïnes i col·lagen, la fagocitosi, la migració, la proliferació, la mida de la cèl·lula i del nucli. A més a més, la massiva deposició de material en els espais intertrabeculars, l'augment del gruix de les lamel·les trabeculars, la disminució dels espais trabeculars, de les vacuoles gegants del canal d'Schlemm i la cel·lularitat són característiques comuns en el glaucoma induït per esteroides i en el POAG. En ambdós tipus de glaucoma, les cèl·lules que queden són més grans i mostren signes d'activació amb nuclis engrandits, abundant aparell de Golgi i reticle endoplasmàtic així com nombrosos ribosomes. Tots aquests canvis podrien explicar l'augment de la resistència al pas de l'humor aquós i per tant de la IOP (Clark et al., 1995). També s'ha descrit que els individus que responen als esteroides mostren una major propensió a desenvolupar POAG i en pacients d'aquesta patologia s'ha descrit una alteració en el metabolisme del cortisol ocular i nivells superiors de cortisol en el serum i l'humor aquós (Clark et al., 1995).

En el *síndrome de dispersió pigmentària* es dipositen restes de pigment provinents de l'iris bloquejant el drenatge de l'humor aquós a la xarxa trabecular (Ritch and Liebmann, 1994b). Una altra de les causes més comuns de glaucoma secundari és el *síndrome de pseudoexfoliació*. Està provocat per l'acumulació de material d'exfoliació provinent de l'iris, el cristal·lí i l'epiteli ciliar no pigmentat a les vies d'evacuació (Ritch and Liebmann, 1994a).

Hi ha altres glaucomes secundaris associats a patologies oculars com la *retinopatia diabètica* o la *uveïtis* on l'increment de la IOP cursa amb l'inflamació ocular. Finalment el glaucoma derivat de l'obstrucció del drenatge de l'humor aquós també pot ser causat per un *traumatisme*.

#### 1.4.2.1.3 Glaucoma d'angle tancat

En el glaucoma d'angle tancat l'accés de l'humor aquós a la xarxa trabecular es bloqueja per l'iris de manera temporal o permanent reduint l'angle que forma

amb la còrnia. Aquesta obstrucció física del drenatge deriva en una disminució de l'evacuació de l'humor aquós i un augment de la IOP (Skuta, 1994). El glaucoma d'angle tancat és quatre vegades menys freqüent que el POAG i sembla que hi ha una major prevalença en individus caucàsics i de sexe femení.

L'exposició de l'ull a la llum tènue i l'estimulació simpàtica poden dilatar la pupila i provocar l'acumulació d'humor aquós a la cambra posterior. En algunes ocasions aquest fet provoca una diferència de pressions entre ambdues cambres, que arqueja l'iris cap endavant i obstrueix l'accés a l'angle iridocorneal (Coleman, 1999). El desenvolupament d'aquest tipus de glaucoma s'ha associat a factors de risc com l'edat avançada, que provoca un augment de la mida del cristal·lí, i la hipermetropia, on les cambres oculars són menys profundes; en ambdós casos la cambra anterior és més susceptible a patir un tancament. S'ha descrit que existeix certa influència hereditària en la profunditat de la cambra anterior ocular i per tant en el risc de desenvolupar aquest tipus de glaucoma (Skuta, 1994).

Igual que en els altres tipus de glaucoma, l'elevada IOP és el més destacat dels factors de risc que contribueixen al seu desenvolupament. A diferència del POAG, en el glaucoma d'angle tancat l'acumulació de l'humor aquós provoca un increment ràpid de la IOP, que acostuma a ser dolorós i que en molts casos requereix un tractament d'urgència.

#### 1.4.2.1.4 El glaucoma congènit

El glaucoma d'angle obert congènit infantil o juvenil (JOAG de *juvenil open-angle glaucoma*) es diagnostica en nens acabats de néixer o en els primers anys de vida, i, habitualment, presenta un tipus d'herència autosòmica recessiva. En la majoria dels casos l'alteració en les vies de drenatge és de tipus bilateral, i presenta llagimeig i fotofòbia a conseqüència de la distensió nerviosa de la còrnia per l'elevada IOP. Tot i que es desconeix la patogènesi, s'han proposat alteracions en el desenvolupament de l'angle iridocorneal a la cambra anterior com a possible causa (Dickens and Hoskins, 1996).

#### 1.4.2.2 Gens lligats al glaucoma

Les bases genètiques del glaucoma es desconeixen, tot i que s'ha proposat que aquesta patologia és el resultat entre la interacció de la influència ambiental i de múltiples gens. El gen que codifica per *TIGR* (*trabecular meshwork inducible glucocorticoid response protein*) és el primer que ha estat associat a aquesta patologia (Stone et al., 1997). Aquest gen, que es va aïllar originàriament de cèl·lules trabeculars humanes en cultiu tractades amb DEX, s'expressa a més a més de la xarxa trabecular, en teixits oculars com la còrnia, l'esclera, el cos ciliar o l'iris. També és present en els cilis de les cèl·lules fotoreceptores pel que rep el

nom de *miocilina* (MYOC) així com en nombrosos teixits extraoculars (Tamm et al., 1999). La inducció de l'expressió de TIGR amb l'elevada IOP i l'aplicació de DEX o TGF-B1 permet suggerir la relació d'aquest gen amb el glaucoma (Tamm et al., 1999). Fins ara, s'han identificat mutacions de TIGR en un 3.9% de casos de glaucoma primari d'angle obert (POAG) (Stone et al., 1997) i en un 36% de casos de glaucoma primari d'angle obert juvenil (JOAG) (Shimizu et al., 2000). La funció d'aquest gen així com el mecanisme mitjançant el qual causa glaucoma és desconegut. No obstant, s'ha descrit que el producte del gen sense el domini olfactomedina de l'extrem carboxi-terminal no es transporta fora de la cèl·lula correctament i es reté al seu l'interior suggerint que aquesta regió és important pel tràfic intracel·lular de la proteïna. La deleció d'aquest extrem, on s'han localitzat la majoria de les mutacions descrites, també redueix la secreció de la proteïna endògena i podria causar la pèrdua de la seva funció habitual a nivell extracel·lular i l'adquisició d'una funció nociva per l'acumulació d'agregats insolubles (Caballero and Borrás, 2001). Nombrosos teixits presenten l'alteració en el processament i secreció típics de la proteïna mutant, mentre que la seva sobreexpressió per DEX és específica del teixit trabecular (Lo et al., 2003).

El gen *CYP1B1* codifica pel citocrom P4501B1 i s'expressa en nombrosos teixits inclosa la xarxa trabecular. Aquest gen s'ha localitzat al locus GLC3 que ha estat lligat al glaucoma i han estat identificades tres mutacions diferents que codifiquen per proteïnes truncades en individus afectats de glaucoma congènit infantil. Els membres de la superfamília del citocrom P450 estan implicats amb el metabolisme de nombrosos substrats implicats en la transducció de senyal i s'han relacionat amb processos com el creixement i la diferenciació. Per això mutacions en aquest gen podrien alterar la formació de la cambra anterior que és una de les causes proposades pel glaucoma congènit infantil. A més a més, aquest gen activa un metabòlit que inhibeix la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasa implicada en la formació de l'humor aquós. Alteracions en aquesta funció podrien explicar la opacitat de la còrnia que juntament amb la IOP elevada és el principal símptoma del glaucoma congènit infantil (Stoilov et al., 1997).

El gen de l'*optineurina* (*optic neuropathy inducing protein*; OPTN) s'expressa a la xarxa trabecular, a l'epiteli ciliar no pigmentat i a diferents teixits no oculars. Aquest és el gen que ha estat associat a un major nombre de casos de POAG i el primer relacionat amb casos de glaucoma que cursen amb IOP normal. Així, s'han detectat mutacions al gen de l'OPTN en un 16.7% de 54 famílies amb POAG, inclosos alguns casos de IOP normal i en un 13.6% de 124 casos de glaucoma predominantment amb IOP normal (Rezaie et al., 2002). S'ha descrit la sobreexpressió de TNF-B i el seu receptor TNF-R1 en nervis òptics d'individus amb glaucoma (Yuan and Neufeld, 2000) i que aquest factor induïx l'expressió d'OPTN (Vittitow and Borrás, 2002). Aquest gen també se sobreexpressa en condicions relacionades amb el glaucoma com el tractament de les cèl·lules trabeculars humanes amb DEX i l'aplicació d'elevada IOP en segments anteriors oculars humans (Vittitow and Borrás, 2002).

### 1.4.2.3 El tractament del glaucoma

Actualment existeixen tractaments farmacològics i quirúrgics pel tractament del glaucoma directament orientats a disminuir la IOP que segueix sent el principal factor de risc que es pot provar. No obstant, no tots els individus amb elevada IOP desenvoluparan glaucoma i en altres casos el dany del nervi òptic es dona en individus amb pressions fisiològiques. Aquest fet explicaria que actualment el tractament del glaucoma no tingui el percentatge d'èxit desitjat.

#### 1.4.2.3.1 Tractament farmacològic

Els fàrmacs utilitzats pel tractament del glaucoma van dirigits a reduir la IOP a través de dues estratègies, la reducció de la formació de l'humor aquós o bé l'augment de la seva evacuació.

Els fàrmacs que disminueixen la síntesi de l'humor aquós més àmpliament utilitzats són els *antagonistes dels receptors B-adrenèrgics* presents a les cèl·lules trabeculars o *B-bloquejants* com el timolol (Wax et al., 1989). Tot i això han estat associats a efectes secundaris de tipus respiratori i cardiovascular, especialment en edats avançades. Els *agonistes dels receptors B-adrenèrgics* com l'apraclonidina i la brimonidina també actuen disminuint la producció de l'humor aquós (Stamer et al., 1996). No obstant, són poc efectius disminuint la IOP i s'han associat a nombrosos efectes secundaris com la conjuntivitis al·lèrgica o la sedació.

Els *inhibidors de l'anhidrasa carbònica* com la dorzolamida redueixen la secreció de l'humor aquós bloquejant l'enzim responsable del transport actiu de  $\text{HCO}_3^-$  i aigua a través de l'epiteli ciliar (Thieme et al., 1999b). Pels seus efectes secundaris s'ha utilitzat més l'aplicació tòpica en forma de col·liris tot i que resulta menys efectiva que la via sistèmica.

La bomba  $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$  de l'epiteli ciliar no pigmentat aporta l'energia necessària pel transport actiu de  $\text{Na}^+$  cap a la cambra posterior que, acompanyat de la sortida d'altres ions i d'aigua de manera passiva, forma l'humor aquós. Els *inhibidors de l'ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$*  disminueixen la IOP a través de la disminució de la secreció de l'humor aquós. No obstant, l'aplicació per via tòpica d'aquests fàrmacs s'ha associat a l'edema corneal mentre que per via sistèmica causen alteracions de tipus cardiovascular (Kaufman and Mittag, 1994).

Els *agonistes colinèrgics* com la pilocarpina o el carbacol contrauen el múscul ciliar actuant sobre els receptors muscarínics d'aquest i incrementant el drenatge d'humor aquós a través de la xarxa trabecular. L'ús d'aquests fàrmacs, però, està restringit per efectes secundaris com la miosi, l'espasme del múscul ciliar i el risc de desenvolupar miopia i cataractes (Hart, 1994).

Els *anàlegs de les prostaglandines* com el latanoprost o l'unoprostone actuen a les fibres del múscul ciliar incrementant l'evacuació de l'humor aquós a través de la via uveoscleral i per tant reduint la IOP. Algunes prostaglandines activen metal·loproteïnases que remodelen la matriu extracel·lular facilitant l'evacuació, encara que no es coneix amb exactitud el mecanisme a través del qual actuen. Aquests fàrmacs, concretament el latanoprost, són comunament receptats pels avantatges que presenten ja que resulten altament efectius disminuint la IOP, només requereixen una aplicació diària i tenen com a únic efecte secundari l'enfosquiment de l'iris (Weinreb and Khaw, 2004).

Els agents *hiposmòtics* com el glicerol i el manitol eleven de manera ràpida i significativa l'osmolaritat sanguínia que provoca el pas d'aigua des del globus ocular cap a la circulació venosa. Ja que l'aplicació per via oral o intravenosa d'aquestes substàncies disminueix de forma ràpida i considerable la IOP, han estat àmpliament utilitzades pel tractament agut del glaucoma d'angle tancat (Kaufman and Mittag, 1994).

Els compostos com la citocalasina B (Kaufman and Bárány, 1977), la latrunculina-A (Peterson et al., 1999) i la latrunculina-B (Okka et al., 2004) alteren el *citoesquelet d'actina*, les unions i la forma de les cèl·lules trabeculars. Així, aquests compostos modifiquen l'arquitectura del trabècul cribiforme i de l'endoteli del canal d'Schlemm augmentant l'evacuació de l'humor aquós i disminuint la IOP de manera efectiva i reversible. D'altra banda, en inhibir la cadena lleugera de la miosina (Rao 1995) disminueix la *contractilitat de l'actomiosina* de les cèl·lules del trabècul cribiforme i el canal d'Schlemm. Inhibint RhoA disminueixen les fibres d'estrès, s'alteren les unions cel·lulars i incrementa la facilitat d'evacuació (Vittitow et al., 2002). Tot i que aquests compostos encara no s'utilitzen, podrien formar part d'un tractament antiglaucoma efectiu en el futur.

Finalment, els *inhibidors de la PKC* com H7 i *chelerythrine* augmenten la facilitat d'evacuació relaxant el teixit trabecular pre-contrès amb carbacol sense tenir efecte sobre el múscul ciliar (Thieme et al., 1999a). Igualment, els *inhibidors de la tirosina quinasa* com la genisteïna relaxen la xarxa trabecular augmentant l'activitat del canal  $BK_{Ca}$  amb un efecte més potent que al múscul ciliar (Stumpff et al., 1999b). Per tot això, els inhibidors de la PKC i de la tirosina quinasa poden ser candidats ideals com a fàrmacs hipotensors.

#### 1.4.2.3.2 Tractament quirúrgic

La *trabeculotomia* és el procediment quirúrgic d'incisió més utilitzat pel tractament del POAG i consisteix en l'extracció d'un fragment de teixit trabecular per tal d'incrementar el flux d'humor aquós. Amb aquesta pràctica, es crea una nova via de drenatge des de la cambra anterior fins l'espai subconjuntival (Weinreb and Khaw, 2004).



En el POAG, també s'acostuma a utilitzar el tractament amb làser i tot i que existeixen diferents procediments, el més comú és la *trabeculoplastia*. Amb aquesta pràctica, l'evacuació incrementa per la inducció de canvis biològics a la xarxa trabecular. S'ha descrit que l'aplicació del làser a la xarxa trabecular augmenta l'expressió de proteïnes de la família de les metal·loproteïnases com l'estromelisina i la gelatinasa B, enzims que renoven les proteïnes de la matriu extracel·lular. La remodelació de la composició de la matriu és la principal causa de l'augment del drenatge de l'humor aquós (Weinreb and Khaw, 2004).

#### 1.4.2.3.3 Teràpia gènica

En els últims anys han incrementat els estudis sobre teràpia gènica aplicada en patologies oculars, ja que l'ull és un òrgan fàcilment accessible i posseeix un ambient immunosuprimit únic. Tot i que actualment la teràpia gènica no s'utilitza en el tractament del glaucoma ofereix grans possibilitats, ja que és una patologia lligada a mutacions de gens coneguts.

S'han proposat diferents estratègies que afecten la producció o l'evacuació de l'humor aquós utilitzant l'epiteli ciliar o la xarxa trabecular com a estructures diana. A més a més dels tipus cel·lulars que modulen la IOP, la teràpia gènica pot anar dirigida a les cèl·lules ganglionars de la retina per tal d'evitar la seva degeneració. Fins ara, s'han enviat vectors adenovírics al teixit trabecular sense alterar la seva arquitectura i la facilitat d'evacuació (Borrás et al., 1999). Gens que codifiquen per l'estromelisina (Kee et al., 2001), la MYOC i rhoA han estat transferits i expressats amb èxit a la xarxa trabecular i, en el cas de rhoA, augmentant l'evacuació de l'humor aquós (Vittitow et al., 2002). La transferència genètica del receptor de BDNF TrkB, juntament amb l'aplicació exògena d'aquest factor neurotròfic incrementen de manera significativa la supervivència neuronal en ser enviats a les cèl·lules ganglionars de la retina (Borrás et al., 2002a). La possibilitat d'aplicar la teràpia gènica pel tractament del glaucoma en el futur depèn del coneixement funcional dels gens implicats en el manteniment de la IOP. També és necessari un profund coneixement de les respostes immunes dels teixits oculars i de mecanismes que permetin una expressió transgènica perdurable i eficaç (Borrás, 2003b).

#### 1.5 Fisiologia de la cèl·lula trabecular

Les cèl·lules trabeculars es troben contingudes en una complexa matriu extracel·lular formant el teixit trabecular. Aquestes cèl·lules presenten propietats morfològiques i funcionals particulars que els permeten modular de manera activa l'evacuació de l'humor aquós i regular la IOP.

### 1.5.1 Poblacions i heterogeneïtat

L'establiment de cultius primaris ha permès estudiar amb més profunditat les cèl·lules trabeculars que es poden caracteritzar segons les seves propietats morfològiques, electrofisiològiques i farmacològiques.

L'ús de la microscòpia de contrast de fase revela dues poblacions cel·lulars morfològicament diferents en els cultius primaris de cèl·lules trabeculars tant d'origen boví com humà (Coroneo et al., 1991). Una població majoritària formada per cèl·lules planes i amb perllongacions que ha estat anomenada epitelial, endotelial o trabecular i una població minoritària de cèl·lules primes i llargues amb aparença similar als fibroblasts denominada fusiforme. Amb imatges de microscòpia electrònica s'ha vist que les cèl·lules de tipus *epitelial* mostren un abundant reticle endoplasmàtic, nombrosos ribosomes i lisosomes a més a més d'un gran aparell de Golgi amb moltes vesícules associades, característiques que permeten deduir que es tracta de cèl·lules metabòlicament molt actives. Aquest tipus cel·lular no presenta un citoesquelet massa ric en microfilaments, filaments intermedis ni llargs processos citoplasmàtics. Pel contrari, a les cèl·lules de tipus *fusiforme* l'aparell de Golgi i el reticle endoplasmàtic és poc abundant. Tanmateix, són cèl·lules amb nombrosos feixos de microfilaments, filaments intermedis i llargs processos citoplasmàtics (Coroneo et al., 1991).

Pel que fa a les propietats electrofisiològiques, les cèl·lules trabeculars de tipus *epitelial* presenten un potencial de membrana al voltant de -50 mV, mentre que les cèl·lules de tipus *fusiforme* tenen un potencial de membrana pròxim a -70 mV en bovins (Coroneo et al., 1991) i humans (Lepple-Wiwnhues 94). Aquesta diferència en el potencial de membrana és important per determinar l'excitabilitat i les propietats contràctils de les cèl·lules trabeculars. A més a més, també podria determinar l'activitat de canals iònics, sobretot aquells que són responsables del manteniment del potencial de membrana. Treballs d'electrofisiologia demostren que alguns canals iònics són presents només en un percentatge determinat de cèl·lules trabeculars (Llobet et al., 2001). Tot i que es podria explicar per canvis en les cèl·lules en cultiu, aquest resultat indica que poden existir diferents tipus cel·lulars en el teixit trabecular també a nivell funcional. En cèl·lules trabeculars d'aparença fusiforme han estat descrites fluctuacions de voltatge espontànies i induïdes per l'aplicació de  $Ba^{2+}$  que determinen una excitabilitat semblant a la descrita per les cèl·lules de múscul llis (Coroneo et al., 1991).

Tot i que no s'han descrit marcadors citològics específics de les cèl·lules trabeculars, amb tècniques d'immunocitoquímica s'han establert marcadors que permeten identificar-les als cultius primaris i diferenciar-les de les cèl·lules que provenen dels teixits adjacents. Les cèl·lules trabeculars bovines presenten un patró de marcatge positiu per la *vimentina* i negatiu per la *desmina*, proteïnes abundants en els filaments intermedis del citoesquelet (Flügel et al., 1991). El marcatge amb *B-actina* resulta positiu a les cèl·lules trabeculars més properes al

múscul llis i negatiu a les cèl·lules que es troben més en contacte amb la cambra anterior (Coroneo et al., 1991; Llobet et al., 2003).

### 1.5.2 Propietats de les cèl·lules trabeculars

El manteniment de la *cel·lularitat* és de gran importància per a l'íntegrat i la fisiologia del teixit trabecular. Les cèl·lules d'aquest teixit presenten una baixa taxa de replicació (Alvarado et al., 1981) però són metabòlicament molt actives. Tant el nombre absolut de cèl·lules com la cel·lularitat a la xarxa trabecular disminueix amb l'edat avançada (Alvarado et al., 1981). La cel·lularitat de teixits trabeculars provinents de pacients amb POAG també està disminuïda respecte els sans però ambdós mostren una disminució de la cel·lularitat amb l'edat avançada molt similar (Alvarado et al., 1984). La cel·lularitat d'aquest teixit pot modificar-se com a conseqüència de diferents estímuls. La trabeculoplàstia indueix una proliferació de cèl·lules que es desplacen cap a la zona trabecular tractada (Bradley et al., 2000). En canvi, nivells elevats de glucosa redueixen la proliferació de les cèl·lules trabeculars bovines en cultiu, fet que podria explicar la major incidència de glaucoma en pacients diabètics (Sato and Roy, 2002).

Les cèl·lules trabeculars presenten una important *activitat secretora* que resulta indispensable per a la formació i el manteniment de la composició de la matriu extracel·lular. Ha estat àmpliament descrita la relació entre el POAG i l'acumulació anormal de material de la matriu extracel·lular possiblement per una activitat secretora alterada de les cèl·lules trabeculars (Bradley et al., 1998).

Per la seva localització, les cèl·lules de les vies de drenatge es troben en contacte amb gran quantitat de productes del metabolisme cel·lular o restes cel·lulars provinents dels teixits adjacents. Les cèl·lules trabeculars presenten una gran *capacitat fagocítica* que resulta imprescindible per a una correcta evacuació, tot mantenint les vies de drenatge lliures de detritus, pigment i altres materials. Diverses tècniques han demostrat que les cèl·lules trabeculars humanes poden fagocitar tot tipus de partícules des d'eritròctis (Grierson and Lee, 1973) a grànuls de pigment (Shirato et al., 1989). L'alteració de la fagocitosi podria explicar una disminució de l'evacuació per acumulació de detritus tot i que no s'han detectat diferències en la fagocitosi cel·lular entre ulls amb POAG i ulls sans (Matsumoto and Johnson, 1997b). No obstant, la disminució de la fagocitosi de les cèl·lules trabeculars humanes provinents de segments anteriors oculars perfundits amb DEX podria explicar la disminució de l'evacuació en el glaucoma induït per esteroides (Matsumoto and Johnson, 1997a). També s'ha descrit que la fagocitosi pot provocar un efecte tòxic a les cèl·lules i causar una disrupció del citoesquelet i dels contactes focals, disminuint l'adhesivitat i augmentant la migració cel·lular (Zhou et al., 1999).

Les *propietats contràctils* de les cèl·lules trabeculars es van proposar per primera vegada en suggerir el possible efecte directe de la pilocarpina sobre el teixit trabecular (Bàràny, 1962). Posteriorment s'ha demostrat la presència de

proteïnes com l'B-actina i la miosina a les cèl·lules trabeculars (de Kater et al., 1990). Tal com s'ha comentat anteriorment, les cèl·lules trabeculars d'aparença fusiforme presenten filaments contràctils i alteracions del voltatge de membrana típiques de múscul llis (Coroneo et al., 1991). A partir d'aquí, la contractilitat d'aquestes cèl·lules s'ha estudiat àmpliament aplicant substàncies contràctils en tires de teixit trabecular (Lepple-Wienhues et al., 1991a). Aquesta característica és de gran importància en la modulació de l'evacuació de l'humor aquós (Wiederholt et al., 2000) i s'explica amb més detall a l'apartat 1.7.2.

Les cèl·lules trabeculars, que en condicions fisiològiques es troben sotmeses a la tensió causada pel pas del fluid, tenen la capacitat de respondre a l'augment d'*estrès mecànic* en casos d'elevada IOP. L'alteració en els nivells d'expressió d'alguns gens descrita en condicions de IOP incrementada (Vittitow and Borrás, 2004) i pressió mecànica (Tamm et al., 1999) podria formar part d'una resposta homeostàtica. A més a més, s'ha demostrat que l'elevada IOP provoca un augment en el nombre d'òrgànuls i en l'evacuació de l'humor aquós (Borrás et al., 2002b). Les cèl·lules trabeculars també estan sotmeses a l'*estrès oxidatiu* provocat per alts nivells de peròxid d'hidrogen i altres oxidants que es troben a l'humor aquós. Aquesta gran capacitat oxidant està incrementada en cèl·lules trabeculars glaucomatoses i alguns gens incrementen la seva expressió en presència del peròxid d'hidrogen (Polansky et al., 1997).

### 1.5.3 La matriu extracel·lular

L'espai entre les cèl·lules trabeculars l'omplen una sèrie de materials que aporten una conformació altament especialitzada al teixit trabecular. En condicions fisiològiques, les cèl·lules trabeculars secreten i degraden les proteïnes de la matriu extracel·lular i per tant són responsables de la seva composició que determina la resistència al pas de l'humor aquós.

La matriu extracel·lular de la xarxa trabecular està formada per làmines de teixit connectiu amb un nucli de fibres elàstiques i de col·lagen insertades en una matriu de glicosaminoglicans de tipus condroitin i dermatan sulfat. La matriu extracel·lular la formen una sèrie de proteïnes com diferents tipus de col·lagen, la laminina, la fibronectina, l'elastina, la fibrilina, la trombospondina i proteoglicans del tipus heparan sulfat (Lütjen-Drecoll, 1999). A més a més dels components estructurals de la matriu extracel·lular, les cèl·lules trabeculars secreten gran varietat d'enzims, majoritàriament metal·loproteïnases, que digereixen la matriu permetent un recanvi continu dels seus components. Aquests enzims són la col·lagenasa (MMP-1), la gelatinasa A (MMP-2), l'estromelisina (MMP-3), la gelatinasa B (MMP-9) i els seus inhibidors TIMP-1 i TIMP-2 que col·laboren en la remodelació de la composició de la matriu extracel·lular (Borrás, 2003a).

L'estructura i composició de la matriu extracel·lular de la xarxa trabecular varia segons la regió del trabècul. La complexitat de la matriu extracel·lular

augmenta des de la regió que es troba més en contacte amb la cambra anterior fins a la zona propera al canal d'Schlemm. A mesura que la complexitat de la matriu augmenta, els espais entre les cèl·lules trabeculars disminueixen. Així, hi ha una relació inversa entre la complexitat de la matriu extracel·lular i la porositat del teixit trabecular que determinen la seva permeabilitat. L'alteració entre la síntesi i la degradació dels components de la matriu extracel·lular influeixen la seva composició i l'evacuació de l'humor aquós (Llobet et al., 2003).

#### 1.5.4 Receptors descrits a la cèl·lula trabecular

Estudis farmacològics han identificat receptors de pèptids, neurotransmisors i hormones a les cèl·lules trabeculars que determinen alguns dels seus trets funcionals. Les cèl·lules trabeculars humanes expressen receptors *B-adrenèrgics* del subtipus  $B_2$  que relaxen el teixit trabecular (Wax et al., 1989) i receptors *B-adrenèrgics* del subtipus  $B_1$  i  $B_2$ , els agonistes dels quals el contrauen (Stamer et al., 1996). El fet de que la contracció del teixit trabecular per agents colinèrgics s'inhibeixi amb atropina indica l'expressió de receptors *muscarínics* a les cèl·lules trabeculars bovines i humanes (Wiederholt et al., 1996). Els experiments amb antagonistes específics demostren que els principals receptors muscarínics funcionals a la xarxa trabecular són del subtipus M3 (Wiederholt et al., 1996) tot i que els receptors M2 també estan involucrats en la contractilitat d'aquest teixit (Thieme et al., 2001). L'estimulació de receptors de pèptids i mediadors de la inflamació presents a les cèl·lules trabeculars com el de la *bradiquinina* (Llobet et al., 1999) o el d'*endotelina* (Erickson-Lamy et al., 1991a) incrementen la  $[Ca^{2+}]_i$  i alteren la facilitat d'evacuació. L'activació del receptor d'endotelina ET-1 indueix una contracció superior de les cèl·lules trabeculars que de les del múscul ciliar que disminueix la facilitat d'evacuació (Wiederholt et al., 2000). L'estimulació del receptor H1 amb *histamina* augmenta els nivells d'IP3 i del  $[Ca^{2+}]_i$  a les cèl·lules trabeculars (WoldeMussie and Ruiz, 1992).

També s'ha descrit la presència de receptors d'*hormones tiroidees* (Duncan et al., 1999), de *glucocorticoides* (Weinreb et al., 1981) i de *dopamina* (Karnezis et al., 1989), l'estimulació dels quals incrementa l'AMPc a les cèl·lules trabeculars humanes. Aquestes cèl·lules també tenen receptors dels factors de creixement *TNF*, *TGF- $\beta$ 1* i  *$\beta$ 2* i de *transferrina* (Wordinger et al., 1998). La xarxa trabecular humana expressa receptors funcionals de *tromboxans*, de manera que els agonistes d'aquests receptors contrauen el teixit (Krauss et al., 1997), i de *prostanoids* EP<sub>2</sub> i EP<sub>4</sub> (Cridler, 2001) i de *prostaglandines* PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub>, els agonistes dels quals relaxen el teixit (Krauss et al., 1997). Aquest resultat explica l'augment del flux per la via trabecular en estimular els receptors PGE<sub>1</sub> i PGE<sub>2</sub>. En canvi, agonistes dels receptors del subtipus PGF<sub>2B</sub> com el latanoprost tenen efecte hipotensor actuant a la via uveoscleral (Anthony et al., 1998).

El *neuropèptid Y* incrementa la  $[Ca^{2+}]_i$  a les cèl·lules trabeculars, i compostos com la *substància P*, la *bombesina*, la *calcitonina* i el *VIP* (Nilsson et al., 1986)

estimulen les cèl·lules en diferents proporcions, indicant que els seus receptors es podrien expressar en alguns subtipus cel·lulars. Les cèl·lules trabeculars expressen receptors per *cannabinoids* CB1 (Straiker et al., 1999) i els receptors dels *pèptids natriurètics* BNP (Pang et al., 1996) i CNP (Takashima et al., 1998) que actuen d'agents hipotensors augmentant la  $[GMPc]_i$  i la facilitat d'evacuació. L'activació dels receptors d'adenosina  $A_1$ ,  $A_{2A}$  i  $A_3$  incrementa la  $[Ca^{2+}]_i$  i modula el volum de les cèl·lules trabeculars a través de l'activació de canals de  $K^+$  i  $Cl^-$  (Fleischhauer et al., 2003). Finalment, han estat identificats receptors *purinèrgics* P1 que responen a l'adenosina i P2 del subtipus  $P2Y_1$ ,  $P2Y_2$ ,  $P2Y_4$  i  $P2Y_{11}$  que incrementen la  $[Ca^{2+}]_i$  (Crosson et al., 2004). L'estimulació dels receptors purinèrgics amb agonistes i antagonistes específics mostra que l'augment de la facilitat d'evacuació és dona a través de l'acció del  $P2Y_1$  (Soto et al., 2005).

### 1.5.5 Cotransportadors i canals iònics descrits a la cèl·lula trabecular

La funció trabecular inclou un gran nombre de processos regulats per l'acció de canals iònics. Mecanismes com la contractilitat o els canvis de volum de les cèl·lules trabeculars requereixen l'activació de canals de  $K^+$  i  $Cl^-$ . A les cèl·lules trabeculars s'han identificat canals de  $K^+$ ,  $Cl^-$  i aigua, així com diferents cotransportadors. Existeixen evidències indirectes de la presència de canals de  $Ca^{2+}$  i de  $Na^+$  tot i que només s'han detectat els seus corrents totals i no s'han caracteritzat apropiadament.

#### 1.5.5.1 Bombes

La despolarització produïda per l'ouabaïna, bloquejant de la *bomba* *ATPasa*  $Na^+/K^+$ , demostra la seva presència a les cèl·lules trabeculars bovines en cultiu d'aparença epitelial (Coroneo et al., 1991).

#### 1.5.5.2 Cotransportadors i intercanviadors

El cotransportador  $K^+/Cl^-$  participa en el mecanisme *regulatory volume decrease* (RVD) que permet a les cèl·lules trabeculars humanes recuperar el volum quan aquest ha augmentat en condicions hipotòniques, ja que la regulació del seu volum resulta parcialment bloquejada per l'inhibidor DIOA (Mitchell et al., 2002). D'altra banda, la capacitat de les cèl·lules trabeculars bovines de regular el pH en cultiu ha permès identificar la presència de l'antiport  $Na^+/H^+$  (Chu et al., 1992). Per tal de regular el volum cel·lular, l'intercanviador  $Na^+/H^+$  funciona probablement en paral·lel amb el  $Cl^-/HCO_3^-$ , tal com s'ha descrit a les cèl·lules de l'epiteli ciliar pigmentat (Counillon et al., 2000). La reducció del volum de les cèl·lules trabeculars humanes per l'inhibidor selectiu de  $Na^+/H^+$ , dimetilamilorida, demostra que és determinant pel volum de les cèl·lules trabeculars en condicions isotòniques i en  $[HCO_3^-]_e$  fisiològiques (Mitchell et al., 2002).

El cotransportador  $Na^+-K^+-Cl^-$  és responsable de l'incorporació de la majoria de soluts en presència de baixes  $[HCO_3^-]_e$  (O'Donnell et al., 1995). Alguns autors han demostrat que la seva inhibició amb bumetanida disminueix el volum de les cèl·lules trabeculars i incrementa l'evacuació de l'humor aquós en segments anteriors oculars bovins i humans en condicions isotòniques i hipertòniques. Aquest fet indica que aquest cotransportador col·labora tant en el manteniment del volum en condicions fisiològiques com en el mecanisme de *regulatory volume increase* que s'activa quan el volum disminueix (Al-Aswad et al., 1999). S'ha descrit que l'activitat del  $Na^+-K^+-Cl^-$  depèn de la  $[Cl^-]_i$  a les cèl·lules trabeculars bovines i humanes (Putney et al., 1999). El  $Na^+-K^+-Cl^-$  regula el volum i la permeabilitat de les cèl·lules trabeculars de tal manera que defectes en aquest cotransportador podrien estar relacionats amb la patologia del glaucoma (O'Donnell et al., 1995). De fet, l'expressió proteica i l'activitat del cotransportador es troben disminuïdes a les cèl·lules trabeculars humanes provinents d'individus amb glaucoma. Però les cèl·lules trabeculars glaucomatoses tenen un volum superior que les cèl·lules normals, indicant que l'alteració d'alguna via d'eflux podria ser responsable de la reducció de l'evacuació (Putney et al., 1999).

#### 1.5.5.3 Canals de sodi

A les cèl·lules trabeculars s'ha detectat la presència de corrents d'entrada selectius pel  $Na^+$  que són estimulades per melatonina (Rich et al., 1999), encara que no s'han caracteritzat els corrents ni s'ha detectat la presència del canal a nivell molecular.

#### 1.5.5.4 Canals de calci

La presència de corrents de  $Ca^{2+}$  amb característiques típiques dels *canals de tipus L* ha estat identificada tant a cèl·lules trabeculars bovines com humanes. Els corrents s'activen amb agonistes muscarínics com l'acetilcolina i el carbacol i es bloquegen per inhibidors de la tirosina quinasa com la genisteïna. Igual que a les cèl·lules de múscul llis, els canals podrien estar implicats en el manteniment dels nivells de  $Ca^{2+}$  citosòlics de les cèl·lules trabeculars i en la seva contractilitat (Steinhausen et al., 2000). Però els canals responsables dels corrents de  $Ca^{2+}$  no s'han caracteritzat amb profunditat a les cèl·lules trabeculars.

#### 1.5.5.5 Aquaporines

Les aquaporines són canals altament permeables a l'aigua que s'expressen en endotelis i epitelis que estan involucrats en el transport de fluids. A l'epiteli ciliar no pigmentat de rata i humans l'AQP1 i l'AQP4 participen en la producció de l'humor aquós i la regulació de la IOP (Hamann et al., 1998). D'altra banda,

s'ha descrit que les cèl·lules de la xarxa trabecular i del canal d'Schlemm expressen l'*AQP1* (Verkman, 2003). Els nivells d'expressió de l'*AQP1* a les cèl·lules trabeculars humanes determinen el volum intracel·lular en repòs i la permeabilitat paracel·lular en aquest teixit (Stamer et al., 2001).

#### 1.5.5.6 Canals de potassi

A les cèl·lules trabeculars bovines s'han identificat corrents rectificadors de sortida que corresponen al canal de  $K^+$  d'alta conductància dependent de calci *BK<sub>Ca</sub>* o *Maxi-K<sup>+</sup>* que en cèl·lules del múscul llis regula la contractilitat cel·lular (Gasull et al., 2003; Stumpff et al., 1997). L'activitat d'aquest canal depèn del  $Ca^{2+}$  citosòlic i del voltatge i augmenta amb l'increment intracel·lular dels nivells de GMPc. Alguns vasodilatadors actuen augmentant la  $[GMPc]_i$  de tal manera que relaxen el teixit trabecular i augmenten la facilitat d'evacuació (Stumpff et al., 1997). El mateix passa amb l'aplicació de d'àcid flufenàmic i amb els inhibidors de la tirosina quinasa que augmenten el corrent dels canals *BK<sub>Ca</sub>* i indueixen la relaxació del teixit trabecular (Stumpff et al., 1999b; Wiederholt et al., 1998). Aquests resultats suggereixen que aquest canal modula la facilitat d'evacuació col·laborant en mecanismes de contracció i relaxació de les cèl·lules trabeculars (Stumpff et al., 1997). A les mateixes cèl·lules s'ha demostrat que la tensió aplicada mecànicament (*stretch*) o amb l'augment de volum induït per un estímul hipotònic modifica la probabilitat d'obertura del canal *BK<sub>Ca</sub>* (Gasull et al., 2003).

També s'han descrit la presència de corrents mitjançats pel canal de  $K^+$  rectificador d'entrada *Kir2.1* en un 60% de les cèl·lules trabeculars bovines i humanes. L'activitat d'aquest canal s'inhibeix amb cations extracel·lulars com el  $Ba^{2+}$ , el  $Cs^{2+}$  i el  $Ca^{2+}$  i amb l'anàleg no hidrolitzable d'AMPc, 8-Br-AMPc. Aquest canal podria col·laborar en mecanismes contràctils i de regulació del volum cel·lular modulant la permeabilitat del teixit trabecular (Llobet et al., 2001).

#### 1.5.5.7 Canals clorur

L'augment del volum cel·lular induït per un estímul hipotònic activa corrents de  $Cl^-$  rectificadors de sortida, sensibles al NPPB i amb una permeabilitat de  $Cl^-$  >metilsulfonat>aspartat a les cèl·lules trabeculars humanes. El corrent presenta característiques electrofisiològiques típiques dels corrents de  $Cl^-$  activats per augments de volum ( $ICl_{swell}$ ) descrits en nombrosos tipus cel·lulars. La inhibició del RVD amb NPPB l'implica en aquest mecanisme (Mitchell et al., 2002).

Recentment s'ha descrit a les cèl·lules trabeculars bovines corrents de  $Cl^-$  activats per augments de volum i sensibles a NPPB i fluoxetina. Aquests corrents són més permeables al  $I^-$  i al  $NO_3^-$  que al  $Cl^-$ . Els mateixos autors detecten el mRNA que codifica pels canals de  $Cl^-$  voltatge-dependents CIC-2 i CIC-5 mentre que no detecten l'expressió de CIC-3 ni de CFTR (Srinivas et al., 2004).



## 1.6 Canals de clorur

### 1.6.1 Canals de clorur voltatge-dependents CLC

En mamífers, la família de canals de Cl<sup>-</sup> voltatge-dependents CLC consta de 9 membres anomenats CIC1-7 i els dos renals CIC-Ka i CIC-Kb (Jentsch et al., 2002). El CIC-0 va ser el primer membre de la família clonat a l'òrgan elèctric de *Torpedo* (Jentsch et al., 1990). Basats en l'homologia, els canals s'agrupen en tres branques, la primera comprèn CIC-0, CIC-1, CIC-2, CIC-Ka i CIC-Kb que es troben a la membrana plasmàtica, i les altres dues comprenen CIC-3, 4 i 5 i CIC-6 i 7 que es troben a les membranes intracel·lulars (Jentsch et al., 2002).

#### 1.6.1.1 Estructura dels canals CLC

Els canals de Cl<sup>-</sup> de la família CLC presenten una estructura homodimèrica anomenada *double-barrelled* on cada una de les dues subunitats és idèntica i té un porus amb un mecanisme d'obertura independent ràpid. Els dos porus del canal també es poden tancar conjuntament amb un mecanisme comú més lent (Estévez and Jentsch, 2002). Experiments d'electrofisiologia van suggerir aquesta arquitectura en detectar tres nivells de conductància independents i idèntics al CIC-0 abans d'identificar l'estructura molecular dels canals CLC (Miller and White, 1984).

Els experiments de mutagènesi han aportat informació sobre les regions responsables del mecanisme d'obertura d'aquests canals. Així, mutacions a l'extrem amino-terminal de CIC-2 resulten en canals constitutivament oberts, amb una relació corrent-voltage gairebé lineal, fent-los insensibles a canvis de pH i osmolaritat extracel·lulars. Aquests resultats indiquen que els dominis necessaris per l'activació dependent de voltatge, augments de volum i pH se situen en aquest extrem i s'han anomenat dominis essencials (Jordt and Jentsch, 1997). En canvi, delecions en la regió carboxi-terminal del CIC-2 produeixen canals parcialment oberts que mantenen la seva resposta al voltatge i a canvis osmòtics i per això s'han denominat dominis moduladors (Gründer et al., 1992). D'altra banda, mutacions en el fragment citoplasmàtic entre els dominis transmembrana D7 i D8 aboleixen els tres mecanismes d'activació del canal provocant que es trobi constitutivament obert (Jordt and Jentsch, 1997). Tot i que aquests resultats van permetre suggerir que el domini amino-terminal i la regió entre els dominis D7 i D8 podrien formar part d'un mecanisme de tipus "bola i cadena", la delecio de l'extrem amino-terminal del CIC-2 no aboleix la seva dependència al voltatge en un sistema d'expressió en mamífers (Pusch et al., 1999). A més a més, en un altre estudi també es demostra que al canal CIC-2 amb una delecio a l'extrem amino-terminal el mecanisme d'obertura dependent de voltatge i pH segueix intacte (Varela et al., 2002).

Recentment, la cristal·lització de les proteïnes bacterianes dels canals CLC ha permès completar els resultats obtinguts amb experiments de mutagènesi i corroborar l'estructura formada per dues subunitats idèntiques amb porus independents predita amb altres tècniques. Aquests estudis mostren que cada subunitat CLC té 17 hèlix B intramembranals amb una estructura repetida i que cadascuna de les meitats té una orientació antiparalela (Estévez and Jentsch, 2002). Les proteïnes bacterianes cristal·litzades amb una resolució de fins a 3Å han permès aprofundir sobre algunes propietats del porus. La regió més estreta del filtre de selectivitat consta de tres llocs d'unió al Cl<sup>-</sup> amb interaccions electrostàtiques. S'ha proposat que quan el canal es troba tancat, un dels llocs d'unió és ocupat per un grup carboxil glutamat altament conservat, mentre que en obrir-se, possiblement per un canvi conformacional, aquest residu es desplaçaria deixant espai per a un Cl<sup>-</sup> addicional. Mutacions en el residu glutamat del canal CIC-0 de *Torpedo* alteren el seu mecanisme d'obertura en assajos electrofisiològics (Dutzler, 2004). L'extrem carboxi-terminal dels canals CLC en eucariotes conté dos dominis CBS (cistationina B sintasa) altament conservats, la importància dels quals s'ha demostrat en malalties hereditàries causades per mutacions en aquestes regions. Delecions d'aquests dominis alteren el mecanisme d'obertura comú i suggereixen que poden estar implicats en la interacció, la oligomerització i el tràfic de proteïnes (Estévez et al., 2004). L'estructura cristal·litzada dels canals permet conèixer amb més detall el seu funcionament i regulació, així com desenvolupar nous fàrmacs, tenint en compte la farmacologia poc específica existent per aquests canals i la seva importància fisiològica (Estévez and Jentsch, 2002).

#### 1.6.1.2 Malalties associades a mutacions en gens *CLCN*

Els canals de la família CLC tenen funcions a la membrana plasmàtica i a les membranes intracel·lulars de les vesícules de la via endosomal, lisosomal i de les vesícules sinàptiques. El rol de molts d'aquests canals a nivell cel·lular i la seva importància a l'organisme ha estat facilitada per models *knockout* de ratolí i malalties humanes causades per mutacions en els gens (Jentsch et al., 2005).

Mutacions en el gen *CLCN1* causen miotonia congènita en humans i ratolins ja que codifica pel canal responsable del manteniment del potencial de repòs de la membrana plasmàtica de les cèl·lules del múscul esquelètic (Koch et al., 1992). Ratolins *knockout* pel *CLCN2* presenten una degeneració severa de les cèl·lules germinals masculines i dels fotoreceptors de la retina (Bösl et al., 2001). Els canals CIC-Ka i CIC-Kb presenten gran homologia entre ells; s'expressen primordialment a nivell renal en diferents segments de la nefrona (Kieferle et al., 1994) i també a l'oïda interna (Estévez et al., 2001), on poden desenvolupar funcions de transport epitelial. Mutacions en la subunitat B *barttin*, comuna als dos canals CIC-K, causen disfuncions renals, l'anomenat Síndrome de Bartter associat amb sordesa en humans (Birkenhäger et al., 2001) i diabetis insípida nefrogènica en ratolins (Matsumura et al., 1999).

Ratolins *knockout* pel *CLCN3* presenten una severa degeneració de l'hipocamp i la retina. S'ha descrit que el canal CIC-3 és present als endosomes i a les vesícules sinàptiques però no hi ha evidències de si la degeneració és causada per un impediment de l'acidificació d'aquestes vesícules (Stobrawa et al., 2001). Mutacions en el gen *CLCN5* causen la malaltia de Dent, una disfunció renal hereditària que cursa amb pedres al ronyó i proteïnúria per una endocitosi reduïda en el túbul proximal (Piwon et al., 2000). Probablement el canal CIC-5, igual que el CIC-3, juga un paper important en la H<sup>+</sup>-ATPasa responsable de l'acidificació dels endosomes. I mutacions en el gen *CLCN7* alteren l'acidificació dels lisosomes i dificulten la reabsorció dels osteoclasts, la degeneració dels quals causa osteoporosis congènites. De fet, hi ha evidències de que mutacions de *CLCN7* provoquen osteoporosi en ratolins i en humans (Kornak et al., 2001).

Aquests fenotips permeten deduir que els canals de Cl<sup>-</sup> de la família CLC juguen un paper important en establir el potencial de membrana en el múscul i possiblement en neurones, en l'acidificació d'endosomes i vesícules sinàptiques, en el transport epitelial i en la degradació dels osteoclasts (Jentsch et al., 2005).

## 1.6.2 Canals de clorur modulats per canvis de volum

### 1.6.2.1 CIC-2

El CIC-2 és un canal de Cl<sup>-</sup> dependent de voltatge de la família CLC que en mamífers consta de 9 membres organitzats en 3 branques filogenètiques. A la mateixa branca que el CIC-2 es troben els canals CIC-0 (exclusiu de *Torpedo*) i CIC-1 amb els que comparteix un grau d'homologia en la seva seqüència del 49% i del 55%, respectivament (Thiemann et al., 1992), i els canals CIC-Ka i CIC-Kb localitzats al ronyó i a l'oïda interna (Estévez et al., 2001). El canal CIC-2 va ser clonat per primera vegada per homologia al CIC-1 de múscul esquelètic de rata (Jentsch et al., 2002).

Aquest canal s'expressa de manera ubiqua i s'han detectat elevats nivells d'expressió en el cervell, el ronyó i l'intestí (Thiemann et al., 1992). L'elevada especificitat del CIC-0 de *Torpedo* i del CIC-1 de múscul esquelètic, així com dels canals CIC-Ka i CIC-Kb típics de ronyó, contrasten amb l'expressió ubiqua de CIC-2. La seqüenciació del CIC-2 ha revelat l'expressió de dues formes específiques en el pulmó de rata que resulten de la deleció dels exons 13 i 20 (Chu and Zeitlin, 1997) i d'una forma amb una deleció de 10 aminoàcids a l'extrem amino-terminal en el ronyó (Cid et al., 2000). Aquests i altres treballs demostren que existeix diversitat del CIC-2 i que per *splicing* alternatiu es poden generar formes del canal amb diferents característiques electrofisiològiques (Furukawa et al., 1995).

#### 1.6.2.1.1 Propietats biofísiques de CIC-2

En expressar de manera heteròloga el canal CIC-2 en oòcits de *Xenopus* mostra una baixa activitat a voltatges de membrana de repòs mentre que el corrent s'activa lentament a potencials hiperpolaritzants. Igual que en els seus homòlegs CIC-0 i CIC-1, la seqüència de permeabilitats descrita pels corrents mitjançats pel canal CIC-2 és  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$  (Thiemann et al., 1992). Aquesta selectivitat aniònica s'ha detectat en diferents treballs i tipus cel·lulars i es considera una característica típica del CIC-2 (Jentsch et al., 2002).

Els corrents de CIC-2 s'activen a potencials hiperpolaritzants i presenten una rectificació d'entrada (Clark et al., 1998). El seu llindar d'activació pel voltatge va de -30 mV a -80 mV depenent del sistema d'expressió o del tipus cel·lular. Les característiques biofísiques dels corrents del CIC-2 són similars quan el canal s'expressa de manera heteròloga en cèl·lules de mamífer (Park et al., 1998) o d'insecte (Xiong et al., 1999). Però la velocitat i la cinètica d'activació dels corrents pot variar segons les condicions experimentals i les cèl·lules utilitzades.

#### 1.6.2.1.2 Activació de CIC-2

El canal CIC-2 s'activa lentament amb la hiperpolarització tant en expressar-se de manera heteròloga (Thiemann et al., 1992) com de manera endògena en diferents tipus cel·lulars (Bond et al., 1998a; Clark et al., 1998). Igual que en els membres de la mateixa branca filogenètica CIC-0 i CIC-1, l'activitat del CIC-2 està influenciada per la *concentració de Cl<sup>-</sup>* intracel·lular. D'aquesta manera, la reducció de la  $[\text{Cl}^-]_i$  desplaça l'activació del canal cap a potencials més negatius. Aquest fet ha permès deduir que el  $\text{Cl}^-$  és la principal càrrega en el mecanisme d'obertura dependent de voltatge d'aquests canals (Pusch et al., 1999).

#### 1.6.2.1.3 Inhibició de CIC-2

La farmacologia del CIC-2 i dels canals aniònics en general resulta difícil per la manca de bloquejants específics. No obstant, nombrosos treballs demostren que el corrent de  $\text{Cl}^-$  del CIC-2 es bloqueja per diferents compostos depenent del tipus cel·lular. Els corrents activats en expressar el CIC-2 de manera heteròloga en oòcits de *Xenopus* es bloquegen per 9-AC i DPC mentre que resulten insensibles al DIDS (Thiemann et al., 1992). A les cèl·lules epitelials de l'intestí  $\text{T}_{84}$  els corrents activats per hiperpolarització típics de CIC-2 són parcialment bloquejats per DPC i NPPB. El  $\text{Cd}^{2+}$  sembla el bloquejant més efectiu d'aquest corrent que resulta insensible al DIDS i al  $\text{Ba}^{2+}$  (Fritsch and Edelman, 1996).

D'altra banda, el 9-AC, DIDS, NPPB i  $\text{Cd}^{2+}$  bloquegen el corrent activat per hiperpolarització que resulta insensible a l'aplicació de SITS i àcid niflúmic en neurones de rata (Clark et al., 1998). Tot i que l'activitat del CIC-2 es modula per

hipotonicitat, les seves propietats electrofisiològiques i farmacològiques són clarament diferents dels corrents activats per l'augment de volum ( $ICl_{swell}$ ).  $ICl_{swell}$ , que resulta insensible al  $Cd^{2+}$ , es bloqueja per tamoxifen, mentre que el CIC-2 es bloqueja per  $Cd^{2+}$  i no per l'acció del tamoxifen (Bond et al., 1998a). En la majoria de cèl·lules, cations divalents com el  $Cd^{2+}$  i el  $Zn^{2+}$  resulten inespecífics però potents bloquejants dels corrents del canal CIC-2 (Clark et al., 1998).

#### 1.6.2.1.4 Regulació de CIC-2

L'acidificació extracel·lular augmenta el corrent mitjançat pel CIC-2 mentre que l'alcalinització el disminueix en expressar el canal de manera heteròloga en oòcits de *Xenopus* (Jordt and Jentsch, 1997) i endògena en cèl·lules de mamífer (Clark et al., 1998). Experiments de mutagènesi van descriure l'abolició de la modulació del CIC-2 per pH en delectonar l'extrem amino-terminal, suggerint que en aquest extrem es localitza la regió responsable de la regulació per pH (Jordt and Jentsch, 1997). Posteriorment s'ha proposat que el pH àcid activaria el CIC-2 protonant un residu glutamat del porus, ja que en mutar-lo es perd la modulació del canal per pH àcid (Niemeyer et al., 2003). L'activació màxima del canal es dona a un pH proper a 6.5 i s'inhibeix amb una acidificació més potent (Arreola et al., 2002; Jordt and Jentsch, 1997). S'ha demostrat que la sensibilitat del canal és màxima dins d'un rang de pH fisiològic (Jordt and Jentsch, 1997) i s'inhibeix de manera irreversible a pHs amb valors superiors a 9 i inferiors a 5 en cèl·lules ciliades respiratòries (Tarran et al., 2000). Aquesta complexa modulació del CIC-2 pel *pH extracel·lular* es podria explicar amb l'existència de dos llocs d'unió a  $H^+$  independents, que modulen la seva activitat desplaçant la seva dependència al voltatge (Arreola et al., 2002). La regulació de l'activitat del canal CIC-2 pel pH extracel·lular podria tenir una rellevància funcional en determinats teixits.

Els corrents del CIC-2 incrementen amb l'*augment del volum cel·lular* induït per hipotonicitat quan s'expressa en oòcits de *Xenopus* (Gründer et al., 1992), fet que suggereix que el canal podria estar involucrat en mecanismes de regulació del volum cel·lular (Jordt and Jentsch, 1997). En cèl·lules epitelials T<sub>84</sub>, s'ha demostrat que els corrents de  $Cl^-$  del CIC-2 només es modulen per l'augment del volum cel·lular en activar-lo prèviament amb un pols hiperpolaritzant llarg (Bond et al., 1998a). La implicació del CIC-2 en la modulació del volum cel·lular es comenta amb detall a l'apartat que tracta les funcions d'aquest canal (1.6.2.1.5).

Fins ara, hi ha poques evidències sobre la regulació de CIC-2 per fosforilació quan el canal s'expressa de manera heteròloga. S'ha descrit que aquest canal no s'activa per *fosforilació dependent d'AMPC* en oòcits de *Xenopus* (Furukawa et al., 1998). No obstant, en alguns treballs es mostra que els corrents endògens podrien estar modulats per fosforilació (Fritsch and Edelman, 1996), suggerint que aquest mecanisme de regulació pot requerir proteïnes associades. En línies cel·lulars humanes HEK-293 que expresen el CIC-2 aquest s'activa per PKA i l'activació es pot prevenir amb l'inhibidor permeable de PKA, mPKI (Tewari et al.,

2000). A més a més, experiments de mutagènesi dirigida han permès determinar dos llocs responsables de l'activació de PKA situats a l'extrem carboxi-terminal del canal CIC-2 en humans (Cuppoletti et al., 2004).

Factors que alteren els *nivells d'expressió* del CIC-2 també podrien estar regulant la seva activació. Diferents treballs han descrit augments en l'expressió de CIC-2 al ronyó per l'acció d'hormones que modulen la reabsorció renal com l'aldosterona (Ornellas et al., 2002) i la vasopressina (Morales et al., 2001), suggerint el rol del canal en el transport de Cl<sup>-</sup>. Els nivells d'expressió del CIC-2 en el ronyó de rata també augmenten per l'acció d'estrogens (Nascimento et al., 2003). Tant el mRNA com la proteïna que codifica pel canal CIC-2 incrementen amb el factor de creixement KGF a les cèl·lules epitelials respiratòries de rata en estadi fetal possiblement per l'estabilització del seu mRNA (Blaisdell et al., 1999).

S'ha descrit que determinats compostos com el *TNF-B* (Bali et al., 2001) o l'*àcid araquidònic* (Cuppoletti et al., 2001) poden modular l'activitat del CIC-2 en cèl·lules epitelials de còlon o de pulmó, respectivament. Finalment, el CIC-2 podria regular-se per alteracions en el *citoesquelet* ja que s'ha descrit l'existència d'interaccions electroestàtiques entre l'extrem amino-terminal del canal i el citoesquelet d'actina (Ahmed et al., 2000).

#### 1.6.2.1.5 Funcions de CIC-2

Tot i que les funcions del CIC-2 segueixen per ser determinades, l'expressió ubiqua del canal indica que aquestes podrien ser generals i imprescindibles a tots els tipus cel·lulars (Thiemann et al., 1992). A partir de la modulació per hipotonicitat dels seus corrents s'ha estudiat la seva possible implicació en la regulació del volum en diferents tipus cel·lulars (Gründer et al., 1992). El fet de que els oòcits de *Xenopus* injectats amb mRNA del CIC-2 presentin un diàmetre inferior en ser exposats a condicions hipotòniques que els oòcits controls suggereix el seu possible rol en la *regulació del volum cel·lular* (Furukawa et al., 1998). L'expressió heteròloga de CIC-2 en cèl·lules d'insecte Sf9 activa corrents de Cl<sup>-</sup> amb característiques típiques del canal CIC-2 i augmenta significativament el RVD, suggerint que podria estar implicat en mecanismes de regulació de volum (Xiong et al., 1999). Anticossos contra la regió amino-terminal considerada essencial pel mecanisme d'obertura de CIC-2 eviten l'activació dels corrents en cèl·lules HTC d'hepatoma de rata per hipotonicitat. A més a més de la pèrdua de sensibilitat al volum dels corrents, els anticossos endarrereixen el RVD activat en condicions hipotòniques, suggerint un possible rol del CIC-2 en la homeòstasi del volum cel·lular (Roman et al., 2001).

D'altra banda, s'ha descrit que les cèl·lules de glioma humà presenten un potent mecanisme de RVD que és bloquejat parcialment amb NPPB i DIDS però no s'altera amb Cd<sup>2+</sup>. No obstant, l'aplicació simultània de NPPB i Cd<sup>2+</sup> bloqueja gairebé per complet la regulació del volum d'aquestes cèl·lules (Ernest et al.,

2005). Aquests resultats indiquen que com a mínim dues proteïnes diferents estarien implicades en l'eflux de  $\text{Cl}^-$  durant el RVD. El canal CIC-2 podria ser responsable del component sensible al  $\text{Cd}^{2+}$  mentre que la conductància sensible a DIDS seria mitjançada per  $\text{ICl}_{\text{swell}}$ . En el mateix treball es descriu l'alentiment del RVD per l'acció de bloquejants com el DIOA o la furosemida demostrant que el cotransportador  $\text{K}^+-\text{Cl}^-$  col·labora amb els canals iònics en la regulació del volum d'aquestes cèl·lules (Ernest et al., 2005). En astròcits corticals, el RVD resulta intacte en bloquejar amb furosemida o bumetanida el cotransportador de  $\text{Cl}^-$  però s'inhibeix en bloquejar els canals de  $\text{Cl}^-$  amb NPPB, DIDS o àcid niflúmic. No obstant, l'aplicació conjunta de cadascun d'aquests tres compostos amb el  $\text{Cd}^{2+}$  bloqueja el RVD de manera més potent que en aplicar-los per separat, de manera que podria existir més d'un canal de  $\text{Cl}^-$  implicat en el RVD (Parkerson and Sontheimer, 2003).

Mesures del volum de les cèl·lules intestinals humanes  $T_{84}$  demostren que la recuperació del volum cel·lular no s'altera en presència de  $\text{Cd}^{2+}$  mentre que el tamoxifen i DDFSK inhibeixen part del RVD. Aquests resultats indiquen que el RVD de les cèl·lules  $T_{84}$  requereix l'activació d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  però no de CIC-2. La total inhibició del RVD per DIDS, que és un altre potent bloquejant d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$ , corrobora aquesta hipòtesi. La regulació del volum és independent de CIC-2 en aquest tipus cel·lular, ja que el  $\text{Cd}^{2+}$  tampoc no interfereix en l'activació del RVD després d'una lleu hipotonicitat del 10% (Bond et al., 1998a). També s'ha demostrat que el CIC-2 no és essencial pel RVD activat a les cèl·lules salivals acinars ja que ratolins *knockout* pel CIC-2 recuperen el volum després d'un xoc hipotònic amb la mateixa eficiència que els ratolins control (Nehrke et al., 2002).

L'activitat del CIC-2 augmenta significativament amb elevats nivells de  $\text{Cl}^-$  intracel·lular de tal manera que el canal podria actuar com un regulador d'aquest paràmetre (Pusch et al., 1999). L'activació del CIC-2 per la  $[\text{Cl}^-]_i$  podria tenir una importància fisiològica considerable. L'augment en la  $[\text{Cl}^-]_i$  incrementa l'activitat del CIC-2 però limita la del cotransportador  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  que també es troba reduïda en cèl·lules trabeculars provinents d'individus amb glaucoma. Tot i que l'activitat del  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  està disminuïda, les cèl·lules trabeculars glaucomatoses exhibeixen un volum superior respecte les cèl·lules trabeculars normals. La regulació de la  $[\text{Cl}^-]_i$  per l'acció de proteïnes responsables de l'eflux d'anions podrien explicar la reducció de l'activitat del  $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  i l'augment del volum a cèl·lules trabeculars glaucomatoses (Putney et al., 1999).

La modulació del CIC-2 per la  $[\text{Cl}^-]_i$  permet l'eflux de  $\text{Cl}^-$  quan excedeix el seu equilibri electroquímic a les neurones GABAèrgiques (Staley et al., 1996). Els receptors de GABA són canals de  $\text{Cl}^-$  modulats per lligand que dependent de la  $[\text{Cl}^-]_i$  activen corrents despolaritzadors o hiperpolaritzadors i per tant respostes inhibidores o excitadores. En les primeres etapes del desenvolupament el GABA és excitador en moltes neurones i l'excitació dona lloc a una inhibició a mesura que la  $[\text{Cl}^-]_i$  disminueix (Jentsch et al., 2005). Tot i que s'ha descrit que el responsable d'aquesta disminució és el cotransportador  $\text{K}^+-\text{Cl}^-$ , la transfecció de CIC-2 en neurones dels ganglis de l'arrel dorsal provoca un canvi de resposta al

GABA d'excitatòria a inhibidòria (Staley et al., 1996). Aquest fet suggereix que la pèrdua de l'activitat de CIC-2 podria causar una acumulació de Cl<sup>-</sup> intracel·lular que podria resultar en una hiperexcitabilitat neuronal, fet que explicaria els casos d'epilèpsia detectats en individus amb mutacions en el *CLCN2*. Tot i que alguna d'aquestes mutacions podria alterar el gradient transmembrana de Cl<sup>-</sup> necessari per la *inhibició GABAèrgica* (Haug et al., 2003; Niemeyer et al., 2004) en ratolins *knockout* pel *CLCN2* no s'han detectat aquestes alteracions (Bösl et al., 2001).

La presència del mRNA i la proteïna de CIC-2 i del seus corrents a les línies cel·lulars intestinals Caco-2 (Mohammad-Panah et al., 2001) i epitelials del còlon (Catalan et al., 2004) suggereix la contribució del canal a la *secreció de Cl<sup>-</sup>* en aquests teixits. A més a més, la disrupció del CIC-2 amb l'estratègia *antisense* redueix l'activació dels seus corrents i la secreció de Cl<sup>-</sup> a l'epiteli intestinal (Mohammad-Panah et al., 2001). La presència funcional del CIC-2 en cèl·lules de l'epiteli respiratori de pacients adults de fibrosi quística, ha permès proposar que el transport de Cl<sup>-</sup> pel CIC-2 podria compensar l'acció del CFTR absent o defectiu en aquestes cèl·lules (Schwiebert et al., 1998).

Els ratolins *knockout* pel gen *CLCN2* presenten una severa degeneració de les cèl·lules germinals masculines i dels fotoreceptors de la retina que depenen de les interaccions amb les cèl·lules de Sertoli i de l'epiteli pigmentat de la retina, respectivament (Bösl et al., 2001). Aquest fet indica que el canal CIC-2 podria *regular l'homeòstasi aniònica* en les interaccions entre cèl·lules (Strange, 2002).

### 1.6.2.2 Corrents de Cl<sup>-</sup> activats per augments de volum (ICl<sub>swell</sub>)

#### 1.6.2.2.1 Característiques biofísiques d'ICl<sub>swell</sub>

L'augment del volum cel·lular o *swelling* induït per hipotonicitat activa de manera ràpida corrents aniònics en la majoria de tipus cel·lulars que han estat estudiats (Jentsch et al., 2002). Aquests corrents presenten una moderada rectificació de sortida i una inactivació dependent del temps a potencials més positius de 40 mV (Shuba et al., 1996). Ambdues característiques biofísiques depenen del tipus cel·lular indicant que podria haver una diversitat molecular en el canal responsable d'aquests corrents (Nilius et al., 1996).

La seqüència de permeabilitats aniòniques d'ICl<sub>swell</sub> és I<sup>-</sup>>Br<sup>-</sup>>Cl<sup>-</sup>>F<sup>-</sup>>gluconat<sup>-</sup> i difereix clarament de la dels canals de la família CLC (Cl<sup>-</sup>>Br<sup>-</sup>>I<sup>-</sup>). Pel que fa a les conductàncies, els corrents també presenten més preferència pel I<sup>-</sup> que pel Cl<sup>-</sup> (Jentsch et al., 2002). ICl<sub>swell</sub> és responsable del flux d'osmòlits com l'aspartat, el glutamat o la taurina (Banderali and Roy, 1992) tot i que algun estudi indica que altres proteïnes poden estar implicades en aquests fluxos (Stutzin et al., 1999).



#### 1.6.2.2.2 Activació d' $ICl_{swell}$

Nombrosos treballs demostren que el corrent  $Cl_{swell}$  s'activa per l'*augment del volum cel·lular* induït per un xoc hipotònic o per l'aplicació de pressió positiva (d'Anglemont de Tassigny et al., 2003). El mecanisme mitjançant el qual l'augment del volum cel·lular activa  $ICl_{swell}$  es desconeix però a l'activar-se de manera progressiva, podria tractar-se d'un mecanisme indirecte amb segons missatgers implicats (Jentsch et al., 2002). L'activació de tirosines i MAP quinases com *Erk 1* i *2* podrien jugar un paper important en l'activació d' $ICl_{swell}$  (Crepel et al., 1998) ja que s'activen per hipoosmolaritat i augments de volum cel·lular (Schliess et al., 1995). Com que l'augment del volum cel·lular pot induir canvis en el citoesquelet, alteracions en els filaments d'actina podrien participar en l'activació d' $ICl_{swell}$  (Schwiebert et al., 1994). La dilució del medi intracel·lular per l'augment de volum provoca una disminució de la força iònica que modula la sensibilitat al volum i el radi d'activació d' $ICl_{swell}$ . S'ha demostrat que la reducció de la força iònica també pot d'activar  $ICl_{swell}$  fins i tot sense l'augment de volum de la cèl·lula (Cannon et al., 1998). A més a més, s'ha descrit que aquest corrent es pot activar amb GTP $\beta$ S (Doroshenko et al., 1991) i pH àcid extracel·lulars amb un mecanisme possiblement independent a l'augment del volum cel·lular.

Generalment està acceptat que l'activació d' $ICl_{swell}$  no depèn del  $[Ca^{2+}]_i$ . Però existeixen algunes excepcions com és el cas de les cèl·lules renals (Rubera et al., 1997), acinars lacrimals (Kotera and Brown, 1993) o pancreàtiques (Verdon et al., 1995). En alguns tipus cel·lulars l'augment de volum induïx un increment de la  $[Ca^{2+}]_i$  que pot tenir diferents orígens i ser responsable de l'activació de corrents implicats en el RVD, majoritàriament de  $K^+$ . D'aquesta manera, a les cèl·lules on el RVD depèn del  $Ca^{2+}$  com en la majoria de cèl·lules epitelials, els canals de  $K^+$  serien els que aportarien aquesta dependència al  $Ca^{2+}$  (Pasantés-Morales and Morales, 2000).

L'activació d' $ICl_{swell}$  depèn de la presència d'ATP intracel·lular (Diaz et al., 1993) tot i que no es requereix la seva hidròlisi ja que pot ser substituït per anàlegs no hidrolitzables (Jackson et al., 1994). A més a més, s'ha descrit que el  $Mg^{2+}$  intracel·lular inhibeix  $ICl_{swell}$  quan la  $[ATP]_i$  és baixa (Oiki et al., 1994).

#### 1.6.2.2.3 Inhibició d' $ICl_{swell}$

La farmacologia dels corrents de  $Cl^-$  resulta difícil d'interpretar perquè molts dels bloquejants utilitzats són poc selectius. Però la caracterització farmacològica d' $ICl_{swell}$  és una eina indispensable per a la seva identificació ja que no es coneix la proteïna responsable d'aquest corrent. La resposta d' $ICl_{swell}$  als principals agents farmacològics efectius és força similar en els diferents teixits i organismes provats, fet que en facilita la seva identificació.

El tamoxifen bloqueja de manera independent al voltatge i selectiva  $ICl_{swell}$  ja que no inhibeix altres corrents de  $Cl^-$  (Valverde et al., 1993). En canvi, el DIDS bloqueja  $ICl_{swell}$  de manera voltatge-dependent amb una inhibició superior dels corrents de sortida (Gosling et al., 1995). El NPPB és un bloquejant inespecífic de corrents de  $Cl^-$  que resulta efectiu per  $ICl_{swell}$ , mentre que compostos com 9-AC o l'àcid niflúmic en són inhibidors menys potents (Jentsch et al., 2002). La gibenclamida inhibeix  $ICl_{swell}$  de manera reversible i dependent de voltatge (Sakaguchi et al., 1997) mentre que la fluoxetina (Maertens et al., 1999), phloretina (Fan et al., 2001) i DCPIB (Decher et al., 2001) són potents inhibidors en algunes cèl·lules. Finalment, s'ha descrit que els cations metàl·lics trivalents com el  $Gd^{3+}$  o el  $La^{3+}$  també inhibeixen  $ICl_{swell}$  (Jentsch et al., 2002).

#### 1.6.2.2.4 Regulació d' $ICl_{swell}$

La  $[Cl^-]_i$  pot regular l'activació d' $ICl_{swell}$  ja que elevades  $[Cl^-]_i$  redueixen el seu radi d'activació desplaçant el seu punt d'activació cap a volums superiors. En canvi, a baixes  $[Cl^-]_i$   $ICl_{swell}$  s'activa de manera més ràpida ja que no requereix grans canvis de volum per activar-se. D'altra banda, l'amplitud d' $ICl_{swell}$  depèn de la  $[Cl^-]$  tant intra com extracel·lular per ser un dels ions permeants majoritari (Doroshenko, 1999).

L'augment de la  $[Ca^{2+}]_i$  no activa  $ICl_{swell}$  en la majoria de tipus cel·lulars, (Doroshenko and Neher, 1992) tot i que s'ha proposat que requereix uns nivells basals (Szucs et al., 1996). L'entrada de  $Ca^{2+}$  a través dels canals de  $Ca^{2+}$  operats per receptor és responsable de la inhibició d' $ICl_{swell}$  en cèl·lules epitelials humanes de càncer de pròstata (Lemonnier et al., 2002). Els mateixos autors proposen en un recent treball que  $ICl_{swell}$  i els corrents de  $Cl^-$  dependents de  $Ca^{2+}$  es poden regular de manera diferent pels mateixos agonistes depenent de l'activitat dels canals de  $Ca^{2+}$  operats per receptor i de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Zholos et al., 2005). Agents quelants de  $Ca^{2+}$  com el BAPTA o l'EDTA inhibeixen  $ICl_{swell}$  de manera ràpida, reversible i voltatge-dependent (Lemonnier et al., 2002). Per tant, tot i que s'ha descrit que l'activació d' $ICl_{swell}$  no requereix el  $Ca^{2+}$  intracel·lular en la majoria de tipus cel·lulars, alguns autors han proposat que la  $[Ca^{2+}]_i$  podria modular la seva activitat.

Tot i que s'ha descrit que l'AMPC pot modular l'activitat d' $ICl_{swell}$  aquest fet segueix sent motiu de controvèrsia (d'Anglemon de Tassigny et al., 2003). Així, en miòcits ventriculars canins,  $ICl_{swell}$  resulta insensible als inhibidors de PKA (Tseng, 1992), mentre que a les cèl·lules cardíques de conill requereix l'activitat de PKA (Hall et al., 1995). Aquesta modulació pot tenir gran importància ja que en alguns tipus cel·lulars la  $[AMPC]_i$  augmenta durant els augments de volum i aquesta inhibició podria actuar regulant l'activitat d' $ICl_{swell}$  (Watson, 1989).

Existeixen evidències de que inhibidors de la proteïna tirosina fosfatasa modulen  $ICl_{swell}$  i el mecanisme de RVD (Thorod et al., 1999). S'ha demostrat que PKC inhibeix  $ICl_{swell}$  en miòcits cardíacs de conill (Duan et al., 1995) i l'activa en miòcits atrials canins (Du and Sorota, 1999), discrepància que es podria explicar per la implicació de diferents isoformes de PKC. La PKC-B controla l'activitat d' $ICl_{swell}$  en les cèl·lules del múscul llis de l'artèria pulmonar (Zhong et al., 2002) mentre que anticossos contra PKC-B atenuen de manera significativa  $ICl_{swell}$  i el RVD en cèl·lules humanes cancerígenes HT-3 (Chou et al., 1998).

Un altre mecanisme de modulació d' $ICl_{swell}$  és la via de senyalització de proteïnes d'unió a GTP ja que l'aplicació intracel·lular de GTP $\beta$ S activa  $ICl_{swell}$  (Voets et al., 1998). La inhibició de RhoGTPasa redueix l'activació d' $ICl_{swell}$  per l'increment de volum o per GTP $\beta$ S intracel·lular (Nilius et al., 1999). Per tant, l'activació d' $ICl_{swell}$  podria requerir una via de fosforilació de Rho, Rho-quinasa, cadena lleugera de la miosina funcional ja que la seva inhibició inactiva el corrent (Nilius et al., 2000; Nilius et al., 1999). No obstant, a les cèl·lules endotelials vasculars s'ha descrit que l'augment del volum cel·lular no activa la via de Rho i que  $ICl_{swell}$  resulta insensible a l'aplicació de GTP $\beta$ S (Carton et al., 2002).

Tal com es comenta més endavant, alguns membres de la família de proteïnes ABC podrien regular l'activitat d' $ICl_{swell}$ . La P-glicoproteïna podria modular  $ICl_{swell}$  variant el seu radi d'activació a través de la fosforilació per PKC (Bond et al., 1998c). La proteïna CFTR també podria regular  $ICl_{swell}$  a través de l'activació de PKA (Egan et al., 1992).

La gran quantitat de vies reguladores de l'activació d' $ICl_{swell}$  (la importància de cada una de les quals pot dependre del tipus cel·lular), la possible diversitat molecular dels corrents i les diferents condicions experimentals dificulten molt la interpretació dels resultats descrits fins ara (Jentsch et al., 2002).

#### 1.6.2.2.5 Funcions d' $ICl_{swell}$

Nombrosos treballs demostren que  $ICl_{swell}$  contribueix a la *regulació del volum cel·lular* mitjançant l'eflux de  $Cl^-$  activat per l'augment del volum cel·lular que es pot induir amb condicions hipotòniques. Els ions  $Cl^-$  surten conjuntament amb els ions  $K^+$  i altres osmòlits facilitant la sortida d'aigua de manera passiva que permet recuperar el volum cel·lular en el mecanisme conegut amb el nom de *regulatory volume decrease* (RVD). En condicions patològiques l'activació del mecanisme conegut amb el nom de *apoptotic volume decrease* (AVD) provoca la disminució de volum en la mort cel·lular programada o apoptosi (Okada et al., 2001). Aquest mecanisme també depèn de l'activació de canals de  $K^+$  i  $Cl^-$  ja que bloquejants d' $ICl_{swell}$  com NPPB, DIDS, SITS o àcid niflúmic i de canals de  $K^+$  com  $Ba^{2+}$  o quinines inhibeixen l'AVD (Maeno et al., 2000). L'activació d' $ICl_{swell}$  per l'acció d'agents pro-apoptòtics confirmen el paper d'aquests corrents en aquest mecanisme (Nietsch et al., 2000).

Els canvis en el potencial de membrana per l'activació d' $ICl_{swell}$  col·laboren a *mantenir el gradient electroquímic*.  $ICl_{swell}$  contribueix a despolaritzar el potencial de repòs activant mecanismes com l'exocitosi a través de canals de  $Ca^{2+}$  de tipus L (Moser et al., 1995). L'activació d' $ICl_{swell}$  escurça la duració del potencial d'acció en cèl·lules de mamífer (Du and Sorota, 1997) fet que podria accelerar el desenvolupament d'arrítmies (Hiraoka et al., 1998). Bloquejants d' $ICl_{swell}$  com 9-AC i SITS, sense efecte cardiosupressiu propi, presenten un efecte protector contra el dany miocàrdic per isquèmia (Tanaka et al., 1996). Finalment, l'activitat d'aquests corrents juntament amb l'acció del  $Ca^{2+}$  podria desenvolupar funcions de marcapàs en cèl·lules atrials (Arai et al., 1996) i ser dianes de fàrmacs per tractar malalties miocàrdiques com l'arítmia o l'isquèmia.

La inhibició d' $ICl_{swell}$  suprimeix la *proliferació* en molts tipus cel·lulars. Ha estat descrit que el tamoxifen, a més a més de ser un bloquejant potent i selectiu d' $ICl_{swell}$ , està involucrat en el control del creixement de cèl·lules endotelials, així com en la seva remodelació vascular (Voets et al., 1995). El bloqueig d' $ICl_{swell}$  també inhibeix la proliferació de cèl·lules cancerígenes i l'activació dels limfòcits T (Phipps et al., 1996). El corrent  $Cl_{swell}$  també ha estat relacionat amb processos de *diferenciació cel·lular* ja que en línies cel·lulars musculars la magnitud d' $ICl_{swell}$  disminueix dràsticament durant la diferenciació (Voets et al., 1997). S'ha descrit una associació entre l'expressió funcional d' $ICl_{swell}$  i la transformació de cèl·lules malignes epitelials de cèrvix (Chou et al., 1995). I amb bloquejants d' $ICl_{swell}$  s'ha demostrat que podria induir la ramificació de la microglia (Eder et al., 1998).

#### 1.6.2.2.6 Els canal responsable d' $ICl_{swell}$ resta per identificar

Les propietats electrofisiològiques dels corrents de  $Cl^-$  activats per l'augment de volum han estat àmpliament descrites en diferents tipus cel·lulars. No obstant, l'origen i estructura molecular del canal responsable d' $ICl_{swell}$  resta per identificar. Per això, els autors han utilitzat diferents noms que es podrien referir als mateixos corrents com *swelling-activated chloride current* ( $ICl_{swell}$ ), però també *volume-activated chloride current* ( $I_{Cl,vol}$ ), *volume-regulated anion channel* (VRAC), *volume-stimulated osmolyte and anion channel* (VSOAC) i *volume expansion-sensing outwardly rectifying anion channels* (VSOR). La dificultat d'identificar la proteïna responsable d' $ICl_{swell}$  radica bàsicament en que aquests corrents són ubiquos a totes les línies cel·lulars i sistemes d'expressió utilitzats, en l'absència de bloquejants específics i en la dificultat de quantificar els corrents a causa de la seva modulació per nombrosos factors exògens i endògens. Fins ara, amb totes les proteïnes proposades com a candidates responsables d' $ICl_{swell}$  s'ha demostrat que no estan implicades en l'activació d'aquests corrents.

L'expressió del *canal de  $Cl^-$  dependent de voltatge CIC-3* en oòcits de *Xenopus* (Kawasaki et al., 1994) i en cèl·lules transfectades NIH/3T3 (Duan et al., 1997) genera una conductància de  $Cl^-$  amb propietats biofísiques similars a les d' $ICl_{swell}$ . Oligonucleòtids *antisense* pel CIC-3 disminueixen l' $ICl_{swell}$  i el RVD

en cèl·lules de l'epiteli no pigmentat boví (Wang et al., 2000), en cèl·lules HeLa i en oòcits de *Xenopus* (Hermoso et al., 2002). A partir d'aquests resultats s'ha suggerit que el CIC-3 podria ser responsable del corrent  $Cl_{swell}$  (Duan et al., 1997). No obstant, aquests treballs han generat gran controvèrsia ja que aquests resultats no han pogut ser reproduïts per cap altre grup en oòcits de *Xenopus* ni en línies cel·lulars de mamífer (Friedrich et al., 1999).

El corrent activat en expressar CIC-3 mostra característiques biofísiques diferents respecte  $ICl_{swell}$  ja que en condicions isotòniques presenta una gran activitat que s'inhibeix per PKC (Duan et al., 1997). A més a més, en un altre treball s'ha descrit que l'expressió de CIC-3 en cèl·lules CHO genera corrents de  $Cl^-$  sensibles al  $Ca^{2+}$  (Kawasaki et al., 1995). Cal tenir en compte que el canal CIC-3 s'expressa en diferents teixits però de manera abundant en cervell i ronyó (Jentsch et al., 2002), distribució que contrasta amb l'expressió ubiqua d' $ICl_{swell}$  i amb un rol generalitzat com el de la regulació del volum cel·lular (Weylandt et al., 2001). Així, les diferències descrites en el corrent  $Cl_{swell}$  amb la disrupció del CIC-3 (Yamamoto-Mizuma et al., 2004) es podrien explicar amb la possibilitat de que altres proteïnes compensin l'absència d'aquest corrent. Un mateix tipus cel·lular pot presentar diferents corrents de  $Cl^-$  sensibles al volum (Arreola et al., 1996; Bond et al., 1998a) i l'expressió de proteïnes de membrana en un sistema d'expressió heteròleg pot induir corrents endògens (Tzounopoulos et al., 1995).

S'ha suggerit que dos llocs d'inici de la traducció diferents podrien generar *in vivo* una versió curta i una llarga amb 58 aminoàcids addicionals a l'extrem amino-terminal que activarien corrents diferents en cèl·lules d'ovari d'hàmsster CHO-K1 (Shimada et al., 2000). La isoforma llarga presenta un corrent sensible a DIDS, amb lleugera rectificació de sortida i una seqüència de conductàncies de  $I < Cl^-$ , característiques similars a  $ICl_{swell}$  (Kawasaki et al., 1994). En canvi, la isoforma curta mostra corrents amb forta rectificació de sortida, conductància de  $Cl^- < I^-$  i insensible al NPPB i al DIDS. Aquests autors proposen que el corrent de la isoforma curta, que resulta insensible als canvis de volum, és el veritable corrent del CIC-3 (Li et al., 2000) ja que presenta característiques biofísiques similars a les del seu canal homòleg CIC-5 (Jentsch et al., 2005).

Cal tenir en compte que s'ha descrit que el canal CIC-3 es localitza a les membranes intracel·lulars de les vesícules de la via endosomal i de vesícules sinàptiques (Stobrawa et al., 2001). Ambdós vesícules s'acidifiquen amb una bomba  $H^+$ -ATPasa electrogènica que requereix una conductància paral·lela de  $Cl^-$  per desenvolupar la seva funció (Jentsch et al., 2002). El canal CIC-3 promou l'acidificació dels lisosomes (Jentsch et al., 2005; Li et al., 2002) i en ratolins *knockout* pel *CLCN3* l'acidificació de les vesícules sinàptiques està reduïda (Stobrawa et al., 2001). Recentment s'ha demostrat en aquests ratolins *knockout* que l'acidificació dels endosomes i l'acumulació de  $Cl^-$  es troben dificultades.

S'ha demostrat que la transfecció del CIC-3 en cèl·lules CHO augmenta l'acidificació dels endosomes i l'acumulació de  $\text{Cl}^-$  (Hara-Chikuma et al., 2005). La localització intracel·lular de CIC-3 explicaria perquè la majoria d'autors no han detectat corrents del CIC-3 quan el canal s'expressa de manera heteròloga en oòcits de *Xenopus* (Jentsch et al., 1995) o en cèl·lules de mamífer (Borsani et al., 1995; Weylandt et al., 2001). La hipòtesi de que  $\text{ICl}_{\text{swell}}$  correspon al canal CIC-3 s'ha invalidat amb els ratolins *knockout* pel *CLCN3* que presenten degeneració de l'hipocamp i dels fotoreceptors de la retina però corrents  $\text{Cl}_{\text{swell}}$  idèntics als dels animals normals (Stobrawa et al., 2001). Per altra banda, l'expressió de les dues isoformes de CIC-3 en cèl·lules HEK293 no altera el radi d'activació, la magnitud ni les característiques d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  i tampoc no influencia el mecanisme de RVD. D'aquesta manera s'ha demostrat que el canal CIC-3 no és responsable del corrent  $\text{Cl}_{\text{swell}}$  ni de la regulació del volum cel·lular. En el mateix treball, la sobreexpressió de CIC-3 no genera corrents de  $\text{Cl}^-$  en resposta a canvis en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular i per tant no estaria implicat en els corrents de  $\text{Cl}^-$  activats pels canvis en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  descrits a les cèl·lules epitelials (Weylandt et al., 2001).

Tal com s'ha descrit prèviament (Duan et al., 2001), en un treball recent es demostra que la diàlisi d'un anticòs anti-CIC-3 en cèl·lules de l'epiteli ciliar no pigmentat inhibeix l'estimulació d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  per hipotonicitat però no altera els corrents basals. El corrent activat per hipotonicitat es retarda per PKC però els corrents basals tampoc no es troben afectats. Tot i que els autors suggereixen que el CIC-3 podria estar involucrat en l'activació d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$ , el diferent efecte bloquejant d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  amb inhibidors de l'activitat PKC i amb anticossos anti-CIC-3 indica que aquests anticossos utilitzats podrien estar modulant  $\text{ICl}_{\text{swell}}$ . En el treball es proposa la possible sobreexpressió d'altres corrents de  $\text{Cl}^-$  sensibles al volum, especialment quan la funció de CIC-3 resulta bloquejada (Do et al., 2005). La possibilitat de que el bloqueig de CIC-3 amb anticossos moduli altres corrents de  $\text{Cl}^-$  es podria aplicar als altres treballs que descriuen canvis a  $\text{ICl}_{\text{swell}}$  amb l'ús d'anticossos contra CIC-3 (Jin et al., 2003; Wang et al., 2003).

A partir de l'activació de corrents de  $\text{Cl}^-$  en oòcits de *Xenopus* per l'expressió de la proteïna *pICln* (Paulmichl et al., 1992) i la inhibició d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  amb anticossos (Kaprivinsky et al., 1994) i RNA *antisense* (Gschwentner et al., 1995) contra aquesta proteïna es va proposar que podria ser responsable dels corrents de  $\text{Cl}^-$ . No obstant, existeixen evidències que indiquen que *pICln* és una proteïna soluble citoplasmàtica sense cap domini transmembrana (Kaprivinsky et al., 1994). Tot i que no ho ha pogut repetir cap altre grup (Emma et al., 1998), un treball mostra una translocació i inserció de *pICln* a la membrana plasmàtica induïdes per hipotonicitat (Ritter et al., 2003). En ser reconstituïda en bicapes lipídiques, la proteïna indueix corrents selectius per cations (Li et al., 1998) i forma canals de  $\text{Cl}^-$  en el cor (Garavaglia et al., 2002). Tot i que *pICln* pot generar corrents no es coneix si s'activen en condicions fisiològiques (Sardini et al., 2003) i si pot formar un canal responsable d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  en condicions normals.

En humans el gen *MDR1* codifica per la *P-glicoproteïna* (P-gp), un membre de la família de transportadors ABC que transporta compostos quimioterapèutics fora de la cèl·lula. L'associació entre l'expressió de *MDR1* amb l'activació de canals selectius pel Cl<sup>-</sup> modulats per augments de volum (Valverde et al., 1992), el bloqueig de corrents similars amb inhibidors de P-gp (Mintenig et al., 1993) i la reducció d'ICl<sub>swell</sub> i la regulació del volum amb oligonucleòtids *antisense* per *MDR1* (Wang et al., 1998) van suggerir la possibilitat que la P-gp fos la proteïna responsable d'ICl<sub>swell</sub>. Posteriorment s'ha demostrat que P-gp no influencia la magnitud d'ICl<sub>swell</sub> però incrementa el radi d'activació (Bond et al., 1998c) i la sensibilitat del canal a solucions hipoosmòtiques (Bond et al., 1998b). Diferents treballs han demostrat que la P-gp modula ICl<sub>swell</sub> (Hardy et al., 1994; Vanoye et al., 1997) i el RVD (Valverde et al., 1996).

Finalment, la proteïna *phospholemman* s'ha relacionat amb ICl<sub>swell</sub> ja que la seva expressió en oòcits de *Xenopus* activa corrents de Cl<sup>-</sup>. Però l'activació lenta a potencials hiperpolaritzants, la rectificació d'entrada i la selectivitat aniònica (Cl<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup>) no corresponen amb les característiques d'ICl<sub>swell</sub> (Moorman et al., 1992).

## 1.7 Modulació de l'evacuació de l'humor aquós per la via convencional

L'evacuació de l'humor aquós a través de la xarxa trabecular i el canal d'Schlemm conformen l'anomenada via convencional, majoritària en humans. Tot i que s'han descrit diferents mecanismes implicats en l'evacuació per aquesta via, les bases de la seva regulació es desconeixen. Fins ara s'han descrit propietats contràctils tant del múscul ciliar com de les cèl·lules trabeculars, canvis en la composició de la matriu extracel·lular, variacions en els nivells d'expressió gènica i mecanismes de regulació del volum a les cèl·lules trabeculars que condicionen la permeabilitat del teixit trabecular. La importància relativa de cada mecanisme a la funció trabecular resta per determinar i és possible que diferents processos actuïn de manera coordinada en la regulació de l'evacuació de l'humor aquós.

### 1.7.1 El to del múscul ciliar

Els lligaments del múscul ciliar s'insereixen entre les làmines de la zona cribiforme de la xarxa trabecular de tal manera que la contractilitat del múscul ciliar modifica la permeabilitat del teixit trabecular. El múscul ciliar rep innervació simpàtica que el relaxa i innervació parasimpàtica que el contrau (Tamm and Lutjen-Drecoll, 1996). Quan el múscul ciliar es contrau, els lligaments insertats a la xarxa trabecular retrauen la regió cribiforme expandint els espais intercel·lulars de manera que relaxen el teixit trabecular i augmenten l'evacuació de l'humor aquós. De manera simultània la contracció d'aquest múscul redueix el flux per la via uveoescleral. En canvi, la relaxació del múscul ciliar contrau el teixit trabecular disminuint els espais de la regió cribiforme i l'evacuació per la ruta

convencional, mentre que el flux per la ruta uveoscleral augmenta (Figura 9). L'existència d'aquest antagonisme funcional entre ambdós teixits s'ha estudiat àmpliament en experiments de contractilitat en tires de teixit (Wiederholt, 1998).

Molts dels fàrmacs que afecten la contractilitat del múscul ciliar afecten també les propietats contràctils de la xarxa trabecular. L'activitat contràctil d'un teixit ve determinada per les propietats de les cèl·lules que el formen i el tipus de receptors, canals i vies de senyalització que expressen. L'efecte net (final) d'aquests fàrmacs sobre l'evacuació depèn de l'equilibri en el nivell de contractilitat d'ambdós teixits en cada cas (Wiederholt et al., 1996), tot i que en moltes ocasions les propietats contràctils del múscul ciliar dominen sobre les del teixit trabecular (Figura 10).

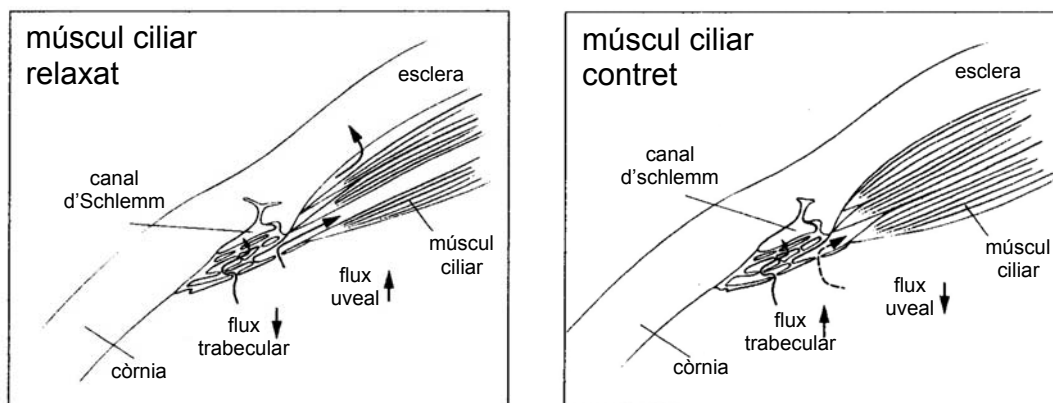


Figura 9. Propietats contràctils del múscul ciliar i la xarxa trabecular. Quan el múscul ciliar es relaxa s'afavoreix el flux per la ruta uveoscleral mentre que quan es contrau s'afavoreix el drenatge per la ruta trabecular. Modificat de Lütjen-Drecoll, E and Rohen, J. W., 1994.

Nombrosos exemples il·lustren l'*antagonisme funcional* entre la contractilitat del múscul ciliar i la xarxa trabecular. L'estimulació parasimpàtica amb un agonista com la *pilocarpina* incrementa l'evacuació de l'humor aquós per la contracció del múscul ciliar. La pilocarpina contrau tant el múscul ciliar com el teixit trabecular de tal manera que l'augment del flux és per un efecte contràctil més pronunciat en el múscul que en el trabècul (Lepple-Wienhues et al., 1991a). Igual que els agonistes colinèrgics, l'*endotelina-1* pot augmentar l'evacuació de l'humor aquós a través de l'acció, al menys en part, sobre el múscul ciliar (Erickson-Lamy et al., 1991a). Però l'efecte contràctil de l'*endotelina-1* predomina al teixit trabecular incrementant la IOP per una reducció del flux d'humor aquós. En canvi, l'augment dels nivells intracel·lulars de GMPc i d'òxid nítric tenen un efecte relaxant sobre el múscul ciliar i més potent a la xarxa trabecular que incrementa l'evacuació i disminueix la IOP (Wiederholt et al., 2000).



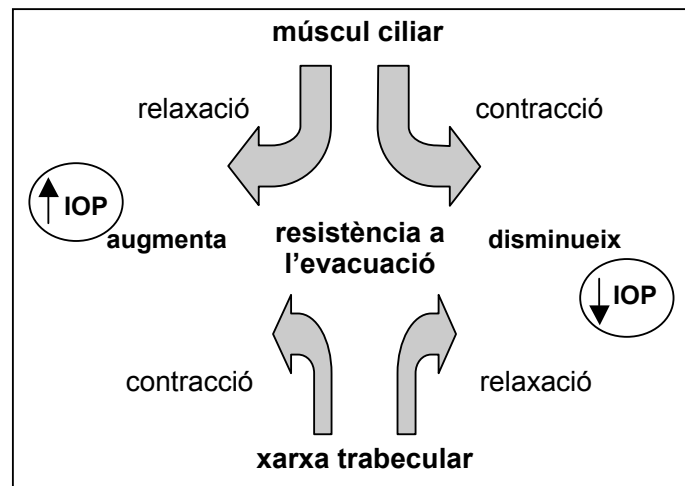


Figura 10. Antagonisme funcional entre les propietats contràctils de la xarxa trabecular i les del múscul ciliar. La contracció de la xarxa trabecular provoca un increment de la IOP mentre que la contracció del múscul ciliar provoca l'efecte contrari. El gruix de les línies que il·lustren la contracció o la relaxació d'ambdós teixits és proporcional a la intensitat de la seva acció. Modificat de Wiederholt, M. and Stumpff, F. 1998.

Cal tenir en compte la presència de l'espeló escleral, una estructura formada per miofibroblasts contràctils i insertada al llarg de la xarxa trabecular, que actuaria de manera independent als altres dos teixits (Tamm et al., 1992). Per tant, l'efecte final en l'evacuació depèn de l'equilibri entre les forces contràctils del múscul ciliar, el teixit trabecular i l'espeló escleral (Wiederholt et al., 2000).

### 1.7.2 Propietats contràctils de la cèl·lula trabecular

Tal com s'ha comentat anteriorment, com a mínim una població de cèl·lules trabeculars presenten propietats contràctils típiques del múscul llis que regulen l'evacuació de l'humor aquós. A nivell cel·lular, la contracció s'associa generalment a una activació dels canals de  $Ca^{2+}$  de tipus L que al despolaritzar la membrana conjuntament amb la sortida de  $Ca^{2+}$  dels dipòsits intracel·lulars incrementen la  $[Ca^{2+}]_i$ . S'ha demostrat que nombroses substàncies estimulen la sortida de  $Ca^{2+}$  dels dipòsits intracel·lulars, mentre que no està tan clara la presència de canals de  $Ca^{2+}$  voltatge-dependents i per tant la entrada de  $Ca^{2+}$  per aquesta via, que resta per caracteritzar. La relaxació, en canvi, es induïda probablement per l'activació dels canals  $BK_{Ca}$ , que permet el flux de sortida de  $K^+$  provocant la hiperpolarització de la membrana. Aquest fet podria bloquejar els canals de  $Ca^{2+}$  operats per voltatge de tipus L provocant una inhibició de l'entrada de  $Ca^{2+}$  des de l'exterior i per tant una disminució de la  $[Ca^{2+}]_i$  (Wiederholt et al., 2000). D'aquesta manera la xarxa trabecular sembla seguir el mateix patró en el mecanisme de contractilitat que el múscul llis. La despolarització i l'augment de la  $[Ca^{2+}]_i$  responsables de la contracció activen el  $BK_{Ca}$  que disminueix la  $[Ca^{2+}]_i$  provocant la relaxació. Així, el canal  $BK_{Ca}$  activa un mecanisme de *feedback* que regularia la contractilitat (Stumpff et al., 1997).

Les mesures del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular han permès determinar les propietats contràctils de les cèl·lules trabeculars típiques de múscul llis. D'aquesta manera, agonistes colinèrgics com l'*acetilcolina* o el *carbacol*, provoquen una sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  dels dipòsits intracel·lulars i una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  des de l'espai extracel·lular que despolaritza la cèl·lula trabecular. La inhibició de la despolarització per atropina indica la presència de receptors muscarínics funcionals en aquestes cèl·lules (Shade et al., 1996). L'estimulació de les cèl·lules trabeculars amb *endotelina* indueix una ràpida despolarització (Lepple-Wienhues et al., 1994) i la *bradiquinina* incrementa els nivells de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Llobet et al., 1999) indicant la presència dels seus receptors en aquestes cèl·lules. S'ha descrit que l'augment del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induït per l'estimulació d'aquests receptors provoca una contracció en les cèl·lules trabeculars (Steinhausen et al., 2000).

La mesura de les contraccions isomètriques en tires aïllades de teixit trabecular en resposta a determinats agents farmacològics ha estat un dels mètodes més utilitzats per l'estudi de les seves propietats contràctils (Lepple-Wienhues et al., 1991a). Els *agonistes colinèrgics* com l'acetilcolina, l'aceclidina, la pilocarpina o el carbacol provoquen contraccions dosidependents a la xarxa trabecular que s'inhibeixen per atropina (Lepple-Wienhues et al., 1991a) així com l'*endotelina* que també contrau les tires de teixit trabecular de manera dosidependent (Wiederholt et al., 2000). L'efecte de la contracció per pilocarpina més pronunciada al múscul ciliar explicaria l'increment de la facilitat d'evacuació i la disminució de la IOP (Wiederholt et al., 2000), mentre que la contracció per endotelina superior al teixit trabecular redueix la facilitat d'evacuació amb el consegüent augment de la IOP (Lepple-Wienhues et al., 1991b).

L'activació de receptors *adrenèrgics*  $B_1$  amb fenilefrina i  $B_2$  amb brimonidina contrau les tires aïllades de teixit trabecular mentre que l'agonista dels receptors *adrenèrgics*  $B_2$  isoproterenol relaxa el teixit trabecular precontret amb carbacol (Wiederholt et al., 1996). Finalment, l'epinefrina disminueix la IOP a través de l'increment dels nivells d'AMPC i de la facilitat d'evacuació en ulls humans. Aquest efecte és mitjançat pels receptors B-adrenèrgics ja que es bloqueja amb el B-bloquejant timolol (Erickson-Lamy and Nathanson, 1992). No obstant, s'ha descrit que l'epinefrina a concentracions elevades presenta propietats contràctils actuant com agonista B-adrenèrgic (Stumpff and Wiederholt, 2000).

L'increment de la  $[\text{GMPc}]_i$  per l'activació del sistema intracel·lular GMPc/òxid nítric per part dels nitrovasodilatadors orgànics i els vasodilatadors no nitrats o bé per l'aplicació directa de l'anàleg permeable *8-Br-GMPc*, relaxen el múscul ciliar i la xarxa trabecular amb o sense contracció prèvia amb carbacol (Wiederholt et al., 1994). Com que l'acció relaxant és superior al tràbecul, l'efecte final resulta en un increment de la facilitat d'evacuació i una disminució de la IOP (Wiederholt et al., 2000). S'ha demostrat que el GMPc intracel·lular activa els canals  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  a la xarxa trabecular (Stumpff et al., 1997). L'àcid *flufenàmic* també relaxa el teixit trabecular estimulants els canals  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  i inhibint els canals de  $\text{Ca}^{2+}$

de tipus L (Stumpff et al., 1999a). La *nifedipina* i el *verapamil* també redueixen la  $[Ca^{2+}]_i$  pel bloqueig dels canals de  $Ca^{2+}$  de tipus L i augmenten l'evacuació de l'humor aquós en humans relaxant la xarxa trabecular (Erickson et al., 1995).

D'altra banda, els anàlegs de les *prostaglandines* poden actuar de manera diferent ja que el tromboxà contrau les tires de teixit trabecular mentre que els prostanoids indueixen la relaxació (Krauss et al., 1997). Tot i que els diurètics com la bumetanida no tenen aquests efectes, l'àcid *etacrínic* relaxa el teixit trabecular precontret amb carbacol o endotelina incrementant l'evacuació en ulls humans (Wiederholt et al., 1997). L'àcid etacrínic actua despolimeritzant els microtúbuls i modificant la forma de les cèl·lules i les unions cel·lulars. En canvi, compostos com la *latrunculina-A* (Peterson et al., 1999) i la *latrunculina-B* (Okka et al., 2004) així com la *citocalasina B* (Kaufman and Bárány, 1977) augmenten l'evacuació i s'ha descrit que actuen evitant la polimerització dels filaments d'actina mitjançant diferents estratègies (Liang et al., 1992). D'altra banda, els *inhibidors de la tirosina quinasa* relaxen el teixit trabecular activant el canal  $BK_{Ca}$  i tenen poc efecte sobre el múscul ciliar (Stumpff et al., 1999b). També els *inhibidors de la PKC* relaxen el teixit trabecular sense afectar el múscul ciliar sent, per tant, candidats ideals per actuar com a fàrmacs hipotensors.

L'existència d'un *mecanisme contràctil independent de  $Ca^{2+}$*  a la xarxa trabecular s'ha demostrat amb experiments de contractilitat i l'absència de  $Ca^{2+}$  extracel·lular. En aquestes condicions es dona una relaxació completa del múscul ciliar mentre que un 42% de la resposta contràctil induïda per carbacol i un 23% de la resposta per endotelina queden intactes a la xarxa trabecular (Lepple-Wienhues et al., 1992). Aquest mecanisme podria ser regulat per la isoforma B de la PKC que no requereix el  $Ca^{2+}$  per la seva activació i que s'expressa en gran quantitat a les cèl·lules trabeculars bovines i humanes i en nivells inferiors al múscul ciliar (Thieme et al., 1999a). A més a més, amb inhibidors específics s'ha demostrat que a la contracció independent de  $Ca^{2+}$  activada a la xarxa trabecular hi participa la proteïna rho-A. Aquesta GTPasa activaria la serina-treonina quinasa ROCK que fosforilant la quinasa de la cadena lleugera de la miosina pot induir la contracció (Thieme et al., 2000).

### 1.7.3 Canvis en la composició de la matriu extracel·lular

Les cèl·lules trabeculars expressen diferents gens que codifiquen per proteïnes que se secreten i formen la matriu extracel·lular, com el col·lagen, la laminina i la fibronectina, i per enzims responsables de la seva remodelació com les metal·loproteïnases. Els canvis en l'expressió dels gens que codifiquen per aquestes proteïnes determinen la composició de la matriu extracel·lular.

Pel que fa a les proteïnes que formen la matriu extracel·lular, el tractament amb DEX sobreexpressa la *laminina*, les *integrines B2, B5 i BV* (Dickerson et al., 1998) i la *fibronectina* (Steely et al., 1992). L'excés en la síntesi de fibronectina per part de les cèl·lules trabeculars causa una disminució de la permeabilitat que ha estat associada al POAG (Li et al., 2004). D'altra banda, s'ha demostrat que els nivells d'expressió del *col·lagen* es veuen alterats per la DEX segons els subtipus i les condicions experimentals (Borrás, 2003a).

La producció de les *metal·loproteïnases* de la matriu extracel·lular es troba afectada per lesions de tipus mecànic (WuDunn, 2001). La disminució de la secreció de *MMP-2* i *TIMP-1* per seleni podria alterar la remodelació de la matriu extracel·lular i causar una disminució de l'evacuació i un increment de la IOP (Conley et al., 2004). Els nivells d'expressió d'*estromelisina* augmenten per acció de la trabeculoplastia i aquesta inducció es bloqueja parcialment amb anticossos contra citoquines com l'IL-1B i factors de creixement com TNF-B de tal manera que aquests factors podrien ser els responsables de l'augment de l'evacuació per la remodelació de la composició de la matriu extracel·lular (Bradley et al., 2000). S'ha descrit que metal·loproteïnases com la *gelatinasa B* i l'*estromelisina* se sobreexpressen per la pressió mecànica a les cèl·lules trabeculars bovines (WuDunn, 2001). No obstant, a partir de la poca afectació de l'expressió de les MMPs per substàncies relacionades amb el glaucoma com DEX, el TNF-B i TNF-B s'ha proposat que les MMPs podrien ser més importants en l'evacuació en condicions fisiològiques que en patologies com el glaucoma (Borrás, 2003a).

#### 1.7.4 Canvis en l'expressió de gens

Els diferents mecanismes que regulen la fisiologia de la xarxa trabecular actuen de manera independent o coordinada governats per l'expressió dels gens en aquest teixit. La capacitat de la xarxa trabecular a respondre a diferents situacions d'estrès relacionades amb canvis mecànics o bioquímics del teixit, podria donar-se per la inducció o repressió de diferents gens. En els últims anys han estat identificats nombrosos gens, l'expressió dels quals podria ser de gran importància en la funció trabecular. A més a més, canvis en l'expressió d'alguns gens en condicions relacionades amb el glaucoma permeten suggerir la seva relació amb aquesta patologia.

L'associació de mutacions d'alguns gens amb el glaucoma així com la millora en les tècniques que permeten determinar l'expressió gènica, han permès incrementar el nombre de treballs que estudien els canvis en l'expressió de determinats gens com un factor més en la regulació de la funció trabecular.

#### 1.7.4.1 Efectes de l'elevada pressió

La comparació dels perfils d'expressió gènica en segments anteriors oculars exposats a elevada IOP amb els segments contralaterals a pressió normal, mostra canvis en els nivells d'expressió de determinats gens que permeten especular quins són els mecanismes rellevants en la regulació de la IOP (Borrás, 2003a). Els gens que resulten més sobreexpressats a les 6 hores d'elevada IOP estan involucrats en la remodelació de la matriu extracel·lular, la reorganització del citoesquelet, l'efecte antioxidant, la secreció i la permeabilitat vascular. Les funcions d'aquests gens indiquen que podrien col·laborar en un mecanisme homeostàtic similar al que regula la permeabilitat dels vasos sanguinis (Gonzalez et al., 2000).

L'elevada IOP aplicada a segments anteriors oculars humans incrementa la facilitat d'evacuació durant el període d'entre 1 i 4 dies a partir dels quals comença a disminuir. Aquest increment de la facilitat podria formar part d'un mecanisme homeostàtic adaptatiu del teixit trabecular a l'elevada IOP (Borrás et al., 2002b). Recentment s'han descrit els canvis d'expressió gènica al teixit trabecular humà durant el període homeostàtic de resposta a l'elevada IOP amb la hibridació de *microarrays* i RT-PCR quantitativa relativa (Vittitow and Borrás, 2004). De la gran quantitat de gens estudiats, aquells que resulten més sobreexpressats en sotmetre els segments anteriors a elevada IOP durant 4 dies, s'agrupen en les categories funcionals de senyalització i de transport intracel·lular. El grup de gens amb majors disminucions de l'expressió per l'elevada IOP en el període homeostàtic codifica per proteïnes involucrades en la transcripció i la traducció. L'*espectrina*, però, que codifica per una proteïna involucrada en el manteniment de l'estructura cel·lular és un dels gens amb l'expressió més disminuïda per l'alta IOP (Vittitow and Borrás, 2004).

L'expressió del gen de la MYOC augmenta de manera progressiva a la xarxa trabecular en sotmetre els segments anteriors humans a alta pressió. L'expressió de la MYOC presenta una lleugera inducció després de 24-48 hores d'elevada IOP que augmenta progressivament amb el temps fins als 7 dies. Però els nivells d'expressió de MYOC són màxims als 7 dies d'elevada IOP quan el mecanisme homeostàtic que facilita l'increment de la facilitat d'evacuació ha desaparegut, fet que indica que la inducció d'aquest gen podria tractar-se d'un mecanisme relacionat amb l'estrès més que d'una resposta homeostàtica a l'alta IOP (Borrás et al., 2002b). El gen de la MYOC també se sobreexpressa en resposta a altres estímuls d'estrès com el peròxid d'hidrogen (Polansky et al., 1997) i la pressió mecànica (Tamm et al., 1999). L'expressió d'OPTN incrementa progressivament amb l'elevada IOP a les cèl·lules trabeculars i esdevé clarament augmentada als 4 i 7 dies. Tot i que la funció d'aquesta proteïna no es coneix, l'augment significatiu de la seva expressió durant el període homeostàtic ha suggerit que podria tenir una funció neuroprotectora a les lesions relacionades amb el glaucoma (Vittitow and Borrás, 2002).

Les cèl·lules trabeculars bovines sotmeses a pressió mecànica mostren un augment de l'activitat de la *gelatinasa B* i de l'*estromelisin*a que poden alterar la matriu extracel·lular i afectar la resistència d'evacuació en resposta a canvis en la IOP (WuDunn, 2001). Els resultats provinents de diversos treballs mostren que diferents gens podrien formar part de la resposta del teixit trabecular a lesions mecàniques.

#### 1.7.4.2 Efectes del tractament amb dexametasona

Els canvis en l'expressió de diferents gens amb el tractament amb DEX han estat estudiats recentment per poder entendre com el tractament amb esteroides induïx elevada IOP i glaucoma.

Un dels primers gens estudiats ha estat el de la MYOC, ja que aquest va ser descrit precisament per la seva sobreexpressió induïda per esteroides a les cèl·lules trabeculars humanes. L'expressió de MYOC augmenta amb DEX durant 1 dia en cèl·lules trabeculars humanes en cultiu, efecte que incrementa de manera significativa als 3 dies de tractament (Tamm et al., 1999). Aquest és un dels gens més sobreexpressats per DEX en un estudi realitzat amb hibridació en *microarrays* i RT-PCR, on s'ha demostrat amb les tècniques de *northern* i *western blot* que aquesta sobreexpressió és específica del teixit trabecular. Per això i perquè el curs temporal de la inducció de MYOC per DEX coincideix amb el del desenvolupament del glaucoma induït per esteroides, la sobreexpressió de MYOC podria estar relacionada amb l'aparició d'aquesta patologia (Lo et al., 2003). D'altra banda, el gen de l'OPTN augmenta la seva expressió 2.6 vegades amb el tractament amb DEX durant 7 dies. (Vittitow and Borrás, 2002). Ja que mutacions que trunquen aquestes proteïnes s'han associat al glaucoma, s'ha suggerit que la seva inducció per DEX a les cèl·lules trabeculars podria tenir una funció protectora (Lo et al., 2003; Vittitow and Borrás, 2002).

El tractament amb DEX induïx l'expressió d'altres proteïnes secretables que, tot i que es desconeix la funció que exerceixen en el teixit trabecular, podrien alterar la composició de la matriu extracel·lular (Lo et al., 2003). La DEX causa la sobreexpressió de la *laminina* i de diverses *integrines* de la matriu, tot i que no s'han detectat diferències en la seva expressió entre cèl·lules normals i glaucomatoses (Dickerson et al., 1998). L'expressió de la *fibronectina*, una altra proteïna de la matriu extracel·lular, també resulta induïda pel tractament amb DEX (Steely et al., 1992). Els resultats permeten especular que l'acumulació de proteïnes secretables a la xarxa trabecular podria col·laborar en l'aparició del glaucoma induït per esteroides tot i que no es pot descartar una possible funció protectora (Lo et al., 2003). Els nivells d'expressió proteica de  $Na^+-K^+-Cl^-$  i la seva activitat mesurada amb l'influx de  $K^+$  sensible a bumetanida incrementen amb el tractament durant 5 dies amb DEX. En canvi a períodes de temps més llargs l'expressió proteica es redueix en cèl·lules trabeculars bovines i humanes (Putney et al., 1997).

### 1.7.5 Regulació del volum de les cèl·lules trabeculars

El manteniment d'un volum constant és essencial per a una correcta funció cel·lular. Per regular el volum, les cèl·lules transporten ions i osmòlits orgànics a través de proteïnes de transport que s'activen quan el volum cel·lular s'altera. A conseqüència de l'elevada permeabilitat de la membrana plasmàtica a l'aigua, seguidament al pas d'ions i osmòlits orgànics, l'aigua atravesa la membrana a favor de gradient osmòtic restaurant el volum cel·lular (Lang et al., 1998).

L'augment del volum cel·lular (induït de manera experimental amb un estímul hipotònic, per exemple) activa mecanismes de regulació per recuperar el volum inicial. La sortida de  $K^+$  i  $Cl^-$  s'indueix a través de l'activació del cotransportador  $K^+-Cl^-$  o dels canals de  $K^+$  i de  $Cl^-$  activats per augments de volum. L'activació d'aquestes proteïnes transportadores seguida de la sortida passiva d'aigua de la cèl·lula forma part del mecanisme anomenat *regulatory volume decrease* (RVD). D'altra banda, la disminució del volum cel·lular o *shrinkage* (induït per exemple amb una solució hipertònica) estimula l'entrada de  $Na^+$  i de  $Cl^-$ . Generalment, aquests ions entren a la cèl·lula mitjançant l'activació del cotransportador  $Na^+-K^+-Cl^-$  o d'intercanviadors com el de  $Na^+-H^+$  i  $Cl^-HCO_3^-$ . Seguidament el  $Na^+$  se substitueix pel  $K^+$  amb la bomba  $Na^+-K^+$  ATPasa que resulta en una acumulació neta de  $K^+$  i  $Cl^-$  dins la cèl·lula. L'entrada d'aquests ions va seguida d'una entrada passiva d'aigua que permet recuperar el volum en el mecanisme conegut amb el nom de *regulatory volume increase* (RVI) (Okada et al., 2001).

La regulació del volum de les cèl·lules trabeculars és un dels mecanismes proposats per regular el pas de l'humor aquós a través del teixit trabecular. Un dels primers estudis basats en aquest fet, demostra el comportament osmòtic de les cèl·lules trabeculars humanes en cultiu en disminuir el seu volum amb una solució hipertònica (O'Donnell et al., 1995). La disminució de la facilitat d'evacuació en segments anteriors oculars bovins perfundits amb solucions hipotòniques s'explicaria amb l'augment del volum de les cèl·lules trabeculars. Amb solucions hipertòniques, la facilitat augmenta per la disminució del volum cel·lular demostrant que aquest paràmetre pot determinar la resistència que el teixit ofereix al pas del fluid (Gual et al., 1997).

Posteriorment s'ha identificat l'activació del RVD a les cèl·lules trabeculars humanes per un estímul hipotònic que no s'altera amb l'augment de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Aquest mecanisme permet la recuperació d'un 30% del volum cel·lular després de 35 minuts d'estar sotmeses a hipotonicitat. La inhibició del RVD amb NPPB, bloquejant dels canals de  $Cl^-$ , a més a més de TEA i  $Ba^{2+}$ , bloquejants dels canals de  $K^+$ , i DIOA, bloquejant del simport  $K^+-Cl^-$ , involucra aquestes proteïnes en el mecanisme regulador del volum. En condicions isotòniques, l'antiport  $Na^+-H^+$  acoblat al  $Cl^-/HCO_3^-$  modula el volum de les cèl·lules trabeculars en presència de  $[HCO_3^-]_e$  normals mentre que l'activitat de  $Na^+-K^+-2Cl^-$  podria predominar quan  $[HCO_3^-]_e$  és baixa (Mitchell et al., 2002).

Recentment altres autors han descrit corrents de  $\text{Cl}^-$  activats per un xoc hipotònic sensibles al NPPB a les cèl·lules trabeculars bovines similars als descrits en cèl·lules trabeculars humanes. En aquest mateix estudi, es descriu que les cèl·lules trabeculars bovines expressen P-gp i els canals de  $\text{Cl}^-$  voltatge-dependents CIC-2 i CIC-5 mentre que no es detecta l'expressió de CIC-3 ni de CFTR. Aquestes cèl·lules presenten una robusta activació de la conductància aniònica però activen un RVD poc potent i podria ser que aquest mecanisme resultés limitat per la conductància de  $\text{K}^+$  (Srinivas et al., 2004).

En el mateix treball es demostra que l'augment d'AMPc intracel·lular provoca una disminució del volum de les cèl·lules trabeculars bovines tant en condicions isotòniques com hipotòniques (Srinivas et al., 2004). Aquest fet explicaria l'augment de la facilitat d'evacuació per l'increment d'AMPc intracel·lular descrit prèviament (Gilabert et al., 1997). Un dels primers treballs que descriu un mecanisme regulador del RVD demostra que l'adenosina redueix el volum de les cèl·lules trabeculars humanes potenciant l'eflux de  $\text{K}^+$  probablement a través de l'activació dels canals  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (Fleischhauer et al., 2003).

Les cèl·lules trabeculars humanes expressen elevats nivells de la proteïna  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$  i una robusta activitat d'aquest cotransportador. La reducció del volum cel·lular per la inhibició de  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$  amb bumetanida o àcid etacrínic, tant en condicions isotòniques com hipotòniques, indica que aquest cotransportador participa tant en el manteniment del volum com en la seva regulació en el RVI de les cèl·lules trabeculars (O'Donnell et al., 1995). La bumetanida i l'absència de  $\text{Cl}^-$  extracel·lular, a més a més de reduir l'activitat del cotransportador i del volum cel·lular, incrementa la facilitat d'evacuació. En canvi, la vassopresina activa el cotransport  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$  i disminueix la facilitat en segments anteriors bovins i humans (Al-Aswad et al., 1999). Altres autors no detecten canvis per efecte de la bumetanida en la facilitat d'evacuació en primats ni en la IOP en humans (Gabelt et al., 1997). Aquests resultats contradictoris es podrien explicar per diferències en les condicions experimentals d'ambdós treballs. L'expressió proteica i l'activitat del cotransportador  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ , però, es troben disminuïdes en cèl·lules trabeculars provinents d'ulls amb POAG en comparació amb ulls sans. No obstant, el volum de les cèl·lules trabeculars amb POAG està augmentat respecte les cèl·lules normals (Putney et al., 1999).

Finalment, el canal d'aigua o aquaporina-1 (AQP1) s'expressa a les cèl·lules trabeculars humanes en cultiu (Stamer et al., 1995a) i a les cèl·lules endotelials del canal d'Schlemm (Hamann et al., 1998). Els nivells d'expressió de l'AQP1 a les cèl·lules trabeculars humanes determinen el seu volum en repòs afectant la permeabilitat paracel·lular; tot i que podrien alterar també la permeabilitat paracel·lular i transcel·lular al canal d'Schlemm (Stamer et al., 2001). A més a més, ratolins *knockout* per l'AQP1 presenten una recuperació del volum impedida a l'endoteli corneal després d'un xoc hipotònic (Kuang et al., 2004).



No obstant, la IOP reduïda en aquests ratolins probablement seria per la disminució de la producció d'humor aquós, ja que les cèl·lules de l'epiteli ciliar expressen l'AQP1 i l'AQP4 (Zhang 2002). Tot i que s'ha proposat que les diverses aquaporines que s'expressen en teixits oculars podrien col·laborar en funcions implicades en el transport de fluids, fins ara no s'ha descrit la seva implicació directa en els mecanismes de regulació del volum de les cèl·lules trabeculars.

**Objectius**

---

## OBJECTIUS

### Objectiu general

Tal com s'ha descrit anteriorment, d'entre els diversos mecanismes que modulen el pas de l'humor aquós a través de la xarxa trabecular, s'ha postulat que el volum cel·lular pot ser un factor important en determinar la permeabilitat del teixit. Així, és d'interès estudiar els mecanismes implicats en la regulació del volum de les cèl·lules trabeculars i caracteritzar quins canals iònics hi participen.

### Objectius específics:

1. Determinar l'expressió dels diferents canals de  $\text{Cl}^-$  dependents de voltatge i l'abundància relativa dels seus nivells d'expressió a les cèl·lules trabeculars.
2. Quantificar els canvis en els nivells d'expressió dels canals CIC-2 i CIC-3 a les cèl·lules trabeculars en condicions relacionades amb el glaucoma.
3. Identificar i caracteritzar electrofisiològicament el canal de  $\text{Cl}^-$  dependent de voltatge CIC-2 a les cèl·lules trabeculars.
4. Identificar i caracteritzar electrofisiològicament corrents de  $\text{Cl}^-$  activats per l'augment del volum ( $I_{\text{Cl}_{\text{swell}}}$ ) a les cèl·lules trabeculars.
5. Determinar la implicació del canal CIC-2 i els corrents  $\text{Cl}_{\text{swell}}$  en la regulació del volum de les cèl·lules trabeculars.
6. Determinar la implicació del canal CIC-2 i els corrents  $\text{Cl}_{\text{swell}}$  en la modulació de l'evacuació de l'humor aquós.

# Resultats

---

Article 1

**Differential expression of the human chloride channel genes in the trabecular meshwork under stress conditions**

Núria Comes, Xavier Gasull, Arcadi Gual, Teresa Borrás

Experimental Eye Research; 80 (2005) 801–813

## Differential expression of the human chloride channel genes in the trabecular meshwork under stress conditions

Núria Comes<sup>a</sup>, Xavier Gasull<sup>b</sup>, Arcadi Gual<sup>b</sup>, Teresa Borrás<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Ophthalmology, University of North Carolina School of Medicine, 6109 Neuroscience Research Building CB 7041, 103 Mason Farm Road, Chapel Hill, NC 27599-7041, USA

<sup>b</sup>Department of Physiological Sciences I-IDIBAPS, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Barcelona, Spain

Received 8 July 2004; accepted in revised form 13 December 2004

Available online 2 February 2005

### Abstract

Among other channels, voltage-gated chloride channels (CIC) regulate cell volume, membrane potential and cellular transport. Because changes in trabecular meshwork (TM) cell volume influence outflow facility and because the relative abundance of a gene's transcript is an indication of the relevance of the gene's function, we investigated the presence and relative expression of seven members of the CLCN gene family in the human TM. To elucidate the role of CIC-2 and CIC-3 in cell swelling, we studied changes in their mRNA levels after hypotonic shock. In addition, to examine the potential involvement of these two channels in conditions associated with glaucoma, we determined their transcripts levels in response to elevated intraocular pressure (IOP) and dexamethasone (DEX). For our evaluations, we used non-transformed human TM cells and perfused human anterior segments from post-mortem donors. For hypotonic shock, cells were exposed to 260 mOsm kg<sup>-1</sup> medium for 15 and 30 min. For DEX, cells were treated with 0.1 μM DEX for 1, 4 and 10 days. For elevated IOP, one eye of each pair of perfused human anterior segments was subjected to ΔP 38 ± 4 mmHg for 1 hr, 4 and 7 days while the contralateral remained at baseline pressure as a control. CICs transcripts were determined by relative quantitative RT-PCR. Our results showed that all transcripts but CIC-1 were detected in HTM cells. CIC-2 and CIC-3 were the most abundant and comprised about twice the amount of CIC-6 and CIC-7 and four times that of CIC-4 and CIC-5. Hypotonic conditions consistently up regulated CLCN2 and slightly up regulated CLCN3. After short periods of elevated pressure, CIC-2 and CIC-3 transcripts were increased but CIC-2 induction was significantly higher than that of CIC-3. In contrast, after long pressure insults (7 days), CIC-3 mRNA was significantly increased while CLCN2 was not changed. DEX treatment markedly down regulated CLCN3 and little, if any, reduced CIC-2. The extent of response of the CLCN2 and CLCN3 to these conditions was markedly affected by individual traits but at all times maintained the relative expression pattern of both genes. CLCN2 gene expression was predominantly influenced by cell volume regulation while that of CLCN3 was preferentially affected by conditions associated with TM pathology.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** human chloride channels; trabecular meshwork; perfused anterior segments; osmotic shock; elevated intraocular pressure; differential gene expression

### 1. Introduction

The maintenance of physiological IOP is essential for proper ocular function. In the eye, IOP is determined by both the rate of secretion of aqueous humour and by

the resistance offered to this fluid by the outflow tissues (Nilsson, 1994; Lütjen-Drecoll and Rohen, 1996; Lütjen-Drecoll et al., 2001). In humans, the main route of aqueous humour outflow is the conventional outflow pathway, which consists of the trabecular meshwork (TM) and Schlemm's canal (SC). Far from being a passive tissue, the TM has an active role in modulating aqueous humour outflow. It is well established that disruptions of TM function lead to an increase in resistance to flow and to the generation of elevated IOP. In a yet unknown manner, this elevated IOP exerts a mechanical insult to the posterior region of the eye

\* Corresponding author. Dr Teresa Borrás, Department of Ophthalmology, University of North Carolina School of Medicine, 6109 Neuroscience Research Building CB 7041, 103 Mason Farm Road, Chapel Hill, NC 27599-7041, USA.

E-mail address: [tborras@med.unc.edu](mailto:tborras@med.unc.edu) (T. Borrás).

and, in most cases, causes degeneration of retinal ganglion cells and irreversible blindness. The resulting disease, glaucoma, affects 70 million people worldwide.

A variety of factors have been demonstrated to modulate TM outflow resistance (O'Donnell et al., 1995; Al Aswad et al., 1999; Lobet et al., 1999; Wiederholt et al., 2000; Tian et al., 2000; Lütjen-Drecoll et al., 2001; Borrás et al., 2002), which indicated that the TM relies on more than one mechanism to perform its function. In this study we have chosen to investigate the molecular response of genes associated with mechanisms of ion transport and cell volume regulation in the human TM.

Several reports have demonstrated that cell volume regulation is clearly involved in the modulation of aqueous humour outflow (Gual et al., 1997; Al Aswad et al., 1999; Soto et al., 2004). Experiments inducing TM cell shrinkage result in an increase in outflow facility whereas experiments inducing TM cell swelling reduce outflow (Gual et al., 1997; Al Aswad et al., 1999). Also, agents such cAMP whose elevated intracellular levels increase outflow facility, cause TM cell shrinkage and volume reduction (Srinivas et al., 2004). In addition, the human TM cells appear to have a regulatory volume decrease mechanism (RVD), by which cells respond to hyposmolarity by changing their volume toward the baseline isotonic value (Mitchell et al., 2002). Other important cell volume regulators appear also to play a role in TM function such as the plasma membrane protein cotransporter  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$  and water channel proteins (O'Donnell et al., 1995; Stamer et al., 2001).

Chloride channels allow the diffusion of negatively charged ions through biological membranes and are involved in different functions, including volume regulation. Of all, the voltage-gated chloride family is the best characterized at the molecular level. In mammals, it contains nine different members which are encoded by nine genes: CLCN1–7, and the two renal, CLCNKa and CLCNKb (Jentsch et al., 1999; Nilius and Droogmans, 2003).

Two of its members, CIC-2 and CIC-3 have been implicated in cell swelling response and volume regulation (Duan et al., 1997; Furukawa et al., 1998; Roman et al., 2001; Jin et al., 2003). The CIC-2 channel localizes to the plasma membrane, is ubiquitously expressed and is activated by cell swelling and membrane hyperpolarization (Clark et al., 1998; Kajita et al., 2000). CIC-2 appears to be involved in cell volume homeostasis (Roman et al., 2001), and it was proposed that its activation might prevent  $\text{Cl}^-$  intracellular accumulation ( $[\text{Cl}^-]_i$ ) (Staley, 1994; Smith et al., 1995). Interestingly,  $[\text{Cl}^-]_i$  is a potent regulator of  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ , whose activity was found to be reduced in glaucomatous TM cells, which in turn, exhibited a significantly greater intracellular volume than normal TM cells (Putney et al., 1999a,b). A recent report has found that thyroid hormones, which also affect extra cellular fluid volume, induce the expression of CLCN2 at the transcription and translational levels (Santos et al., 2003).

Unexpectedly, knockout mice for CLCN2 exhibit testicular and retinal degeneration, which results in total loss of male germ cells and photoreceptors in adult animals (Bösl et al., 2001).

The CIC-3 channel resides in intracellular membranes and is expressed in many tissues (Jentsch et al., 2002; Nilius and Droogmans, 2003). Its activation by cell swelling is the subject of intense controversy. Some studies report that CIC-3 is the channel which mediates the  $I_{\text{Cl,swell}}$  current (Duan et al., 1997; Jin et al., 2003) while others provide evidence against this finding (Weylandt et al., 2001; Stobrawa et al., 2001). Although an earlier study showed that swelling activated currents in cells from the CLCN3 knockout mice were no different than those from wild type (Stobrawa et al., 2001), a later report showed that such currents were actually different in both types of mice (Yamamoto-Mizuma et al., 2004). In addition, knocking down the gene by antisense in bovine non-pigmented ciliary epithelial cells (Wang et al., 2000), HeLa and *Xenopus laevis* oocytes (Hermoso et al., 2002), significantly reduced the swelling-activated currents. The gene or genes responsible for the  $I_{\text{Cl,swell}}$  current remain to be identified (Jentsch et al., 2002).

The function of a given tissue is determined by the coordinate expression of its genes. Several studies have shown that gene expression in the human TM is influenced by high IOP (Gonzalez et al., 2000; Vittitow and Borrás, 2002; Borrás, 2003) and by treatment with certain drugs (Lo et al., 2003). Because regulation of cell volume has proven to be an important determinant of TM function, and because some other functions described for the family of voltage-gated chloride channels could also be relevant for TM physiology, we sought to characterize the expression of its genes in the human TM. For this study, we used non-transformed HTM cells and human perfused organ cultures. Our results showed that although all but CIC-1 transcripts were present, CIC-2 and CIC-3 are the most abundant in the human TM. We also found that the extent of the expression response of CLCN2 and CLCN3 to the conditions studied appears to have an individual genetic component, which nevertheless maintains the relative expression pattern of both genes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chloride channels primers and sequencing

Primers sets (forward and reverse) for each of the seven chloride channels were designed using the <http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer-program> and intron-spanning mRNA regions of the indicated GenBank accession numbers (Table 1). Exons location from each gene was obtained from the GenAtlas database (<http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/>) (University René Descartes, Paris, France). The specificity of the primers

Table 1  
Primers used for relative quantitative RT-PCR of chloride channels transcripts in HTM cells

Gene	GenBank accession no.		PCR primer sequence	Exon no.	$T_m$ (°C)	Product size (bp)
CLCN1	NM_000083	Forward	5'-AGAGCAGAGGCTTAAGGAGCTAC-3'	1	74	999
		Reverse	5'-ATCCTCTCCAGTAGTCCGAACAG-3'	8	74	
CLCN2	NM_004366	Forward	5'-GCTGTCATTGGTATTGCTAGTGG-3'	9,10	72	218
		Reverse	5'-AGCGTCTCTTTCTGTGAGAGCTGT-3'	11,12	74	
CLCN3	AF172729	Forward	5'-GGGGTTTCTGTAGCTTTTGGTG-3'	8	71	1072
		Reverse	5'-CCACTGTCATATTGTCCTGTGTCAG-3'	11	74	
CLCN4	NM_001830	Forward	5'-TTGCTGGACTTCTAACGAGACCAC-3'	5	74	920
		Reverse	5'-TGGGGTCATTGATGTAGTCACAG-3'	9	72	
CLCN5	NM_000084	Forward	5'-TCAGCCTGAAGAGGTCAGCTACT-3'	7,8	74	1131
		Reverse	5'-TGAGATCTCTTCGGAGGACAAAG-3'	10	72	
CLCN6	NM_001286	Forward	5'-GAGTCTTAGAGAGCCTCCTTGTGTC-3'	13	76	1043
		Reverse	5'-GTATAGGTTGGGGTAGGGAGTGTA-3'	20	74	
CLCN7	NM_001287	Forward	5'-GCTCCTGTCCCTCAAGTATGAGA-3'	3,4	74	1234
		Reverse	5'-GAAGAAGTAGACCAGCGTGAACAG-3'	17	74	

for each target gene was obtained by performing Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) comparisons against the entire nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and selecting alignments with Expectation score values ( $E$ -value) equal or lower than  $10^{-4}$  (expected number of matches to be found merely by chance). For sequencing, amplified RT-PCR products were purified using a QIAquick spin column (QIAGEN) and eluted with 30  $\mu$ l of water according to manufacturer's specifications. A 20  $\mu$ l mix containing 36 ng of each purified channel cDNA and 100–200 pmoles of its corresponding forward primer were sequenced at UNC core facility. Sequencing results were analysed using the BLAST and nucleotide <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> databases.

## 2.2. Culture of outflow pathway cells

Eyes from non-glaucomatous human donors were obtained within 48 hr of death from national eye banks (Lions Eye Bank of Oregon and National Disease Research Interchange) following signed consent of the patients' families. All procedures were in accordance with the Tenets of the Declaration of Helsinki. For isolation of HTM cells, the trabecular meshwork from a single individual was isolated from surrounding tissue by making incisions both anterior and posterior to the meshwork and removing it using forceps. The tissue was then cut into small pieces, treated with 1 mg ml<sup>-1</sup> collagenase in phosphate buffered saline (PBS) and incubated at 37°C in a shaker water-bath for 1 hr. Incubation was followed by low speed centrifugation for 5 min. Pellets were resuspended in 4 ml of Improved Minimal Essential Medium (IMEM; Biofluids, Rockville, MD) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> gentamicin (GIBCO Invitrogen, Carlsbad, CA). Resuspended tissue was plated on a single, 2% gelatin-coated 35 mm dish and maintained in a 37°C, 7% CO<sub>2</sub> incubator. Once confluent (2–3 weeks), cells were passed to a T-25 flask and labelled as passage 1.

Subsequently, cells were passed 1:4 at confluency and maintained in the same medium with 10% FBS (complete IMEM). These primary, non-transformed cells subsist for 9–10 passages. All experiments were performed with a cell line originated from an 18-year-old donor (HTM-41). Two additional cells lines (HTM-39 and HTM-46) from donors aged 17 and 35 were also tested. All cells were used at passages 4–6.

## 2.3. Cell treatments

For hypotonic shock treatments, cultured HTM cells were grown to confluency in either 3 or 10 cm dishes in complete IMEM medium. Once confluent, cells were washed and media replaced with 20% hypotonic medium. Incubation continued at 37°C during 15 and 30 min, respectively. Hypotonic medium was prepared by adding filtered RNase-free water to complete IMEM and adjusting the osmolality to 260 mOsm kg<sup>-1</sup> in a micro osmometer (Osmette™, Precision Systems, Natick, MA). Control dishes received the isotonic IMEM medium (with an osmolality of 320 mOsm kg<sup>-1</sup>) and were incubated for the same period of time as the hypotonic treated dishes.

For treatments with dexamethasone (DEX) (Sigma, St Louis, MO) subconfluent HTM cells in complete IMEM were exposed to final concentrations of 0.1  $\mu$ M for 1, 4 and 10 days, respectively. DEX was prepared in absolute ethanol at 0.1 mM, freshly diluted 1000-fold into complete IMEM and added to the cells every other day. Control dishes received fresh medium containing drug vehicle at the same days. At the end of each treatment, both control and treated sample were washed 2 $\times$  with PBS, lysed using 350  $\mu$ l guanidine thiocyanate buffer (RLT, QIAGEN) scraped from the plate and processed for RNA extraction as indicated below. RNA recoveries for both treatments averaged 2 and 50  $\mu$ g per 3 and 10 cm plate, respectively.



#### 2.4. Induction of elevated pressure in perfused human anterior segment organ culture

Pairs of normal, non-glaucomatous human eyes ranging in age from 59 to 91 years were obtained from national eye banks as indicated above. The eyes were dissected within 30–40 hr of death and organ cultures were prepared as described previously (Johnson and Tschumper, 1987; Borrás et al., 1999). Briefly, eyes were bisected at the equator and the lens, iris, and vitreous were removed. The anterior segment was then secured to a custom-made, 2-cannula polycarbonate dish and perfused into the chamber through one cannula at constant flow using a Harvard microinfusion pump (Harvard Bioscience, South Natick, MA). IOP was continuously monitored with a pressure transducer connected to the dish's second cannula and recorded via an automated computer system. The culture medium was Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin, 0.1 mg ml<sup>-1</sup> streptomycin, 170 µg ml<sup>-1</sup> gentamicin and 250 µg ml<sup>-1</sup> amphotericin B. One eye pair of the six used was perfused with a specialized lens medium consisting of modified TC-199 prepared as described by Zigler and Hess (1985). Flow rates of 3 µl min<sup>-1</sup> were used to mimic the flow rate of the human aqueous humor. Anterior segments were maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and eyes were allowed to equilibrate for 24 hr to establish a stable baseline.

For the elevated pressure treatment, we used our previously published elevated pressure model (Gonzalez et al., 2000; Vittitow and Borrás, 2002; Borrás et al., 2002; Borrás, 2003; Vittitow and Borrás, 2004). In this model, the mechanical pressure exerted on the intact human TM tissue mimics the physiological force received by the tissue in vivo. After perfusing both eyes at baseline pressure for 24 hr, the flow of one eye in each pair was raised to obtain a  $\Delta P$  of  $38 \pm 4$  mmHg for periods of time of either 1 hr, 4 or 7 days. The contralateral eye was maintained at baseline pressure and did not increase during the same periods (average  $\Delta P$  of  $0.13 \pm 1.4$  mmHg). At the end of each experiment, anterior segments were immediately immersed in RNAlater (Ambion, Austin, TX) and stored at 4°C.

#### 2.5. RNA extraction and reverse transcription (RT)

Human TM tissues were excised from anterior segments under a dissecting microscope. Each individual isolated TM was then placed into one sterile glass micro tissue grinder (Kimble-Kontes, Vineland, NJ) and homogenized with 350 µl RLT (QIAGEN). RNA extraction was performed by first loading the homogenized tissue onto a QIAshredder column (QIAGEN) and continued by the use of the RNeasy Mini kit with on-column RNase-free DNase digestion (QIAGEN) according to manufacturer's directions. Total RNA averaged 2 µg per individual TM, which was eluted in 30 µl Rnase-free water. Human skeletal muscle total RNA was purchased from Clontech (Palo Alto, CA).

Reverse transcription (RT) reactions were performed using random primers (RETROscript kit, Ambion). Approximately 1 µg of total RNA was mixed with 2 µl of 50 µM random decamers and nuclease-free water in a total of 12 µl, heated at 75°C for 2 min and cooled on ice. The reaction continued in a 20 µl mix containing 2 µl of 10× RT buffer (500 mM Tris-HCl, pH 8.3, 750 mM KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, and 50 mM DTT), 4 µl dNTP (2.5 mM each), 1 µl RNase inhibitor (10 U), and 1 µl M-MuLV reverse transcriptase (100 U). The RT reactions were incubated at 42°C for 60–90 min and terminated at 92°C for 2 min.

#### 2.6. Relative quantification (RQ) of the expression of the chloride channels genes

To first determine the linear range of the polymerase chain reaction (PCR) amplification for each gene, a 2.5 µl aliquot RT reaction was used in a 50 µl reaction mixture containing 5 µl 10× PCR buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 4 µl dNTP (2.5 mM each), 4 µl of each gene specific primer mix (5 µM each forward and reverse), and 0.5 µl SuperTaq polymerase (2.5 U) (Ambion). The PCR mixture was split into four tubes and amplification was carried out as follows: 94°C, 4 min and cycles of 94°C for 30 sec, 60–62°C for 30 sec, 72°C for 60 sec, and a final extension at 72°C for 4 min. The number of amplification cycles was increased by four in each of the four tubes and RT-PCR products were electrophoresed on Tris-borate 1.5% SuperAcryl Agarose (DNA Technologies, Gaithersburg, MD) gels containing 25 ng ml<sup>-1</sup> ethidium bromide. For each primer pair, the cycle number at which the band intensity was clearly at the increasing rate was selected as the linear range cycle.

Quantification of these RT-PCR products was accomplished by the use of 18S rRNA internal standards. Because 18S rRNA is far more abundant than any gene's mRNA under study, to obtain a linear amplification of this marker we used a primer/competimer mix (Quantum RNA classic set, 489 bp, Ambion). Competimers are modified 18S primers, which block extension by DNA polymerase; when combined with the functional 18S primers they compete for annealing to the 18S rRNA and allow amplification of a reduced number of 18S rRNA molecules. To determine the correct ratio of primers to competimers to use with any given gene, a 2.5 µl aliquot of the RT reaction was used in a 40 µl reaction mixture containing 5 µl 10× PCR buffer, 4 µl of dNTP (2.5 mM each), and 0.5 µl SuperTaq polymerase (Ambion). The mixture was split into five, 8 µl tubes each containing 1 µl of gene specific primers (5 µM each) and 1 µl of different 18S primer/competimer ratios (usually 1:25, 1:20 and 1:15) plus controls. Multiplex PCR amplifications were performed at the pre-determined linear cycle for each gene and ran on the SuperAcryl agarose gel. Selection of the 18S rRNA primer/competimer ratio was accomplished by selecting the 18S ratio band

which matched the intensity of the gene amplification product.

Once the linear range and 18S primer/competimer ratios were determined for each gene, final RQ was conducted 2–6 times for each gene and condition. Master mixtures containing all reagents but the RTs templates (buffer, dNTPs, gene primers mix, 18S primer/competimer mix, and SuperTaq) were divided into equal amounts in PCR tubes. After addition of 0.5  $\mu$ l of RT to each aliquot, amplifications were conducted at conditions where all multiplex PCR products were all in the linear range. Products were run on 1.5% SuperAcryl agarose gels along with  $\Phi \times 174$  *Hae*III digested DNA markers. Band intensities were captured using a ChemiDoc System equipped with a Chemi cooled CCD camera, PCI digitizing image acquisition board, EpiChemii II Darkroom with transilluminator, and LabWorks Software (UVP, Upland, CA) and transferred to a Microsoft Excel spread sheet for calculation of fold change averages and standard errors. Correction for the distinct band intensity/abundance of the different size PCR amplification products was performed by normalizing intensity values of all bands to the 1078 molecular weight (MW) band of the marker. Because each band of the marker contains the same number of DNA molecules, ratios of intensities between smaller and bigger MW bands served as correction abundance factors.

### 2.7. Data analysis

Experimental effects were statistically obtained by comparing the 18S normalized expression of the experimental values to the 18S normalized expression values of the controls by the Student's paired *t*-test. Normality of all control and treated data sets was assessed using the Kolmogorov–Smirnov normality test available in the SPSS software statistical package. No difference was found between the distribution of each data set and a normal one.

## 3. Results

### 3.1. Identification and relative abundance of chloride channel transcripts in human TM cells

Voltage-gated chloride channels have been reported to be involved in cell volume regulation of several different cell types (Jentsch et al., 2002). Because changes in cell volume of the human trabecular meshwork tissue were shown to modify outflow facility (Gual et al., 1997; Al Aswad et al., 1999), we asked whether genes encoding chloride channels were expressed in non-transformed HTM cells. Intron-spanning primers corresponding to genes CLCN1 through CLCN7 are shown in Table 1. Using RNA from the three HTM cell lines, each originated from a different individual, our results showed that transcripts from genes CLCN2, CLCN3, CLCN4, CLCN5, CLCN6 and CLCN7 were

clearly present in all samples while those from the CLCN1 gene were not detected (Fig. 1(A)). As a follow up control, primers for the CLCN1 positively amplified total cDNA from human skeletal muscle, a tissue known to express the gene for this channel (Fig. 1(B)) (Steinmeyer et al., 1991). Sequence of all amplification products revealed the correct identity of the corresponding chloride channel cDNA (not shown).

To gain further insight onto the relative relevance of the expressed channels in the human TM, we assessed their relative abundance by RQ RT-PCR using 18S rRNA as an internal control. For this, taking identical aliquots from each RT reaction, we conducted five PCR reactions with the primers for each channel at 19, 23, 27, 31 and 35 cycles (total of 30 reactions per cell line). We thus determined the amplification cycle at which all channels were at the exponential, linear range. For example, for HTM-39 such number was 29 cycles. Subsequently, additional identical RT aliquots were used to determine which 18S primer/competimer ratio would render a non-saturated 18S band at 29 cycles, which resulted to be 1:22. The final reaction was then conducted by first preparing a PCR master mix with the RT and 18S primer/competimers at 1:22, split it into six tubes and adding the specific channels CLCN primers (CLCN2–7) to each of them. The multiplex PCR tubes containing the primers of each channel together with 1:22 18S primer:competimers were run at 29 cycles (Fig. 1(A) for HTM-39) and analysed. The intensity of each channel transcript band was first normalized to that of the 1072 MW band of the  $\Phi \times 174$  DNA marker as indicated in methods. Then, the ratio of the normalized intensity band to that of its internal 18S in each given sample was taken as the relative abundance of the channel, and expressed in fold change values.

Fig. 1(C) shows the average relative abundance expression on the HTM cell lines ( $n=3$ ). CLCN4 and CLCN5 genes are the lowest expressed genes, with fold change normalized values of  $1.0 \pm 0.4$  and  $0.8 \pm 0.3$ , respectively. CLCN6 and CLCN7 are next, and equally expressed, with fold change values over the 18S control of  $2.5 \pm 0.9$  and  $2.7 \pm 0.8$ . The highest expressed chloride channel genes in the HTM cells are CLCN2 and CLCN3, with fold change values of  $5.7 \pm 1.2$  and  $4.7 \pm 0.9$ , respectively. The same relative expression pattern was observed in all HTM cell lines tested. This result is an indication that most likely, CIC-2 and CIC-3 are the most relevant channels in human TM physiology.

### 3.2. Effect of hypotonic shock on the expression of CLCN2 and CLCN3

It is well established that osmotic cell swelling causes the activation of chloride channels CIC-2 and CIC-3 (Duan et al., 1997; Bond et al., 1998). It is also known that HTM cells exposed to extracellular hypotonic conditions show a RVD volume response mechanism that is in part mediated

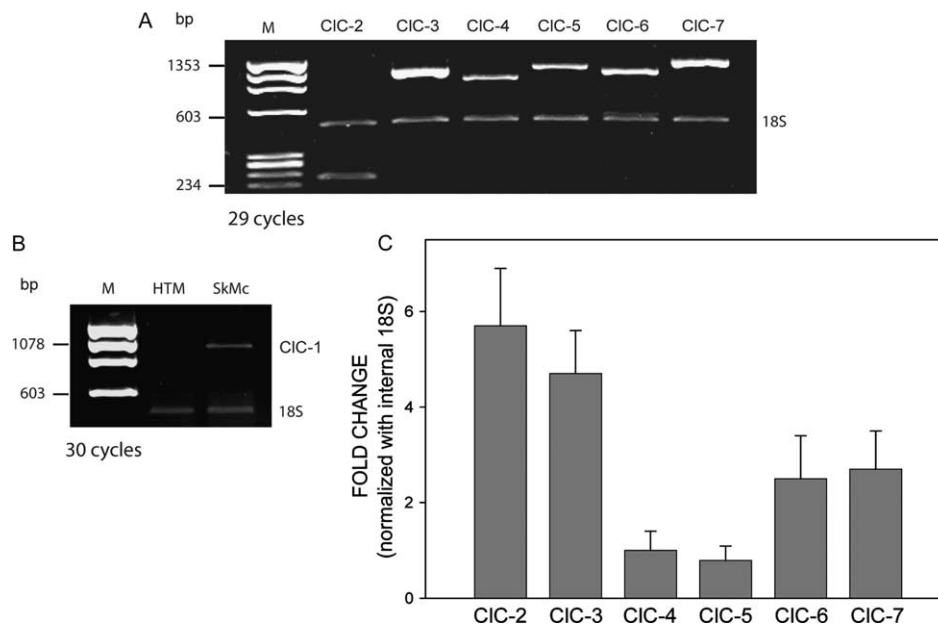


Fig. 1. Relative abundance of voltage-gated chloride channels transcripts in HTM cells. RNAs from three different HTM cell lines were RT using random primers, and their cDNAs amplified with specific primers (Table 1). Multiplex amplifications were performed at the exponential number of cycles (shown underneath each panel) and an 18S primer/competimer ratio of 1:22. PCR products were run on Tris–borate 1.5% Super AcrylAgarose using  $\Phi \times 174$  RF DNA/HaeIII markers (lane M). Band intensities were captured, normalized to the intensity of the 1078 MW marker and analysed. (A) Representative gel of multiplex products of CIC-2 to CIC-7 and 18S (HTM-39). (B) Representative gel of multiplex products of CIC-1 and 18S from HTM-39 and human skeletal muscle (SkMc) cDNAs. (C) Expression of CIC-2 to CIC-7 normalized against 18S RNA. Results are expressed as mean CIC fold changes  $\pm$  SEM from three sets of independent experiments performed in different HTM cell lines ( $n=3$ ). All channels but CIC-1 are expressed in the HTM. CIC-2 and CIC-3 were the most abundant followed by CIC-7 and CIC-6; CIC-4 and CIC-5 are expressed at the lowest level. Thus, CIC-2 and CIC-3 might be the most relevant chloride channels in the human TM physiology.

by the swelling-activated chloride channels (Mitchell et al., 2002). In order to investigate whether the reported activation of CIC-2 and CIC-3 could be coupled with increasing levels of their mRNA, we studied changes in the expression of their genes after hypotonic shock. For these experiments we subjected HTM cells to hypotonic shocks for periods lasting 15 and 30 min. After treatment, total RNAs from treated and parallel, untreated controls were analysed and quantified by RQ RT-PCR upon 18S RNA normalization. Results are shown on Fig. 2.

Expression of CLCN2 was significantly induced at both time periods of hypotonic shock. Expression of CLCN3 was, in contrast, weakly or barely induced. Thus, at 15 min, expression of CLCN2 was up regulated  $8.3 \pm 2.7\%$  ( $n=4$ ;  $p=0.047$ ) and, at 30 min, the up regulation increased to  $30.6 \pm 10.8\%$  ( $n=5$ ;  $p=0.042$ ). Expression of CLCN3 was induced a low value of  $2.0 \pm 10.0\%$  ( $n=3$ ;  $p=0.96$ ) at 15 min, and went slightly higher,  $6.5 \pm 13.4\%$  ( $n=6$ ;  $p=0.75$ ) at the second time point of 30 min.

Non-transformed HTM cell lines vary from each other. Despite being prepared the same way, differences arise due to potential differences in the number of TM cell types obtained in each preparation. Most importantly, however, these cell lines are different because they are generated from different individuals. In order to test the influence of individual traits (age, gender, genetic background) in the response of the two channels to hypotonic treatment, we performed a similar

experiment in a different cell line derived from a single different individual (HTM-39). We found that, although the extent of induction varied, the pattern of expression remained the same, that is, CLCN2 was more up regulated than CLCN3. After 15 min hypotonic shock CLCN2 was up regulated  $21.0 \pm 11.0\%$  ( $n=2$ ;  $p=0.22$ ) and after 30 min, the induction increased to  $76.7 \pm 26.1\%$  ( $n=3$ ;  $p=0.097$ ). For CLCN3, the increased expression from untreated control was  $20.7 \pm 25.8\%$  ( $n=3$ ;  $p=0.68$ ) at 15 min and lowered to  $12.0 \pm 3.6\%$  ( $n=3$ ;  $p=1.0$ ) at the 30 min time point. Overall, the normalized CIC-2 mRNA levels of hypotonic treated cells were consistently higher than the controls in 12 out of 12 measurements. Normalized induction levels of CIC-3 in the same cells were lower than those of CIC-2 in 14 out of 15 measurements.

These results suggest that the gene encoding the CIC-2 channel appears to be under a higher osmotic regulatory control than the gene encoding the CIC-3. These regulatory differences between the two genes under osmotic stress could be an indication of the different relevance of CIC-2 and CIC-3 during RVD regulation of the human trabecular meshwork.

### 3.3. Individual response of CLCN2 and CLCN3 to elevated pressure

To investigate whether conditions of elevated pressure would affect mRNA levels of CIC-2 and CIC-3 we analysed

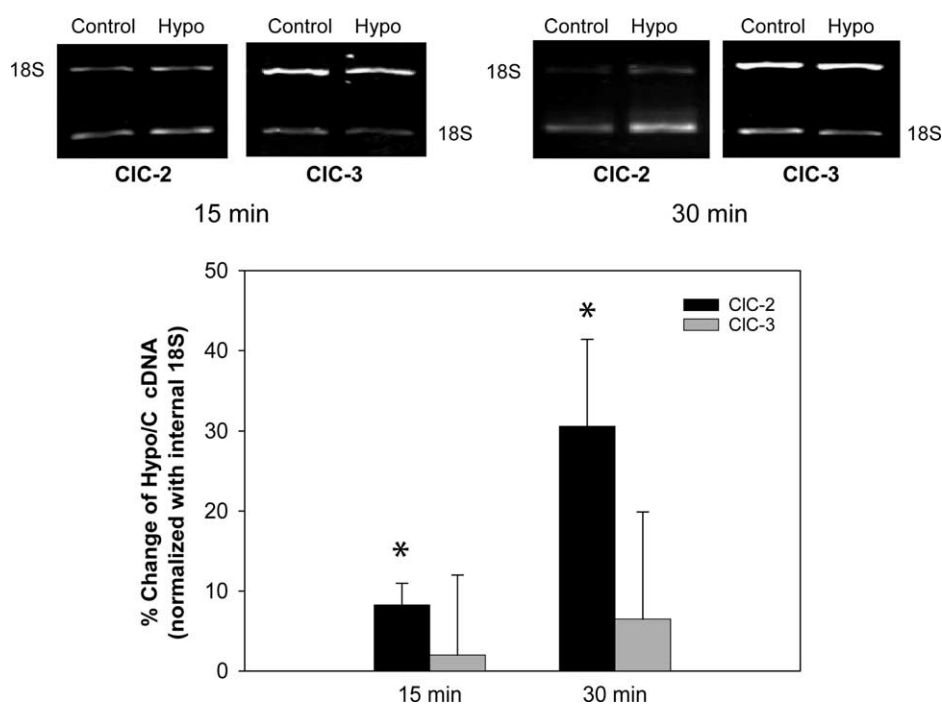


Fig. 2. Effect of hypotonic shock on CLCN2 and CLCN3 expression in HTM cells. HTM cells were treated with hypotonic (260 mOsm kg<sup>-1</sup>) (Hypo) or isotonic (320 mOsm kg<sup>-1</sup>) control (C) IMEM media for 15 and 30 min. Total RNAs were RT using random primers and amplified as described in Section 2. Multiplex CIC-2/18S and CIC-3/18S amplifications were performed at the exponential number of cycles of 30 (CIC-2, 15 and 30 min) and 26 (CIC-3, 15 and 30 min) and 18S primer/competimers ratios of 1:22 (CIC-2, 15 and 30 min) and 1:20 (CIC-3, 15 and 30 min). PCR products were run on Tris-borate 1.5% Super AcrylAgarose gels containing 25 ng ml<sup>-1</sup> ethidium bromide, band intensities captured, and analysed. Amplifications were repeated between 2 and 6 times per channel, per time point. Top panel: representative gels of CIC-2/18S and CIC-3/18S transcripts at 15 and 30 min. Bottom panel: expression of CLCN2 (black bars) and CLCN3 (grey bars) normalized against 18S rRNA and expressed as percent increase of the hypotonic from the isotonic control. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM from independent experiments performed at the time points of 15 and 30 min ( $n=3-6$  per time point). Statistical differences (paired  $t$ -tests) are shown between the hypotonic and the control groups; \* $p < 0.05$ . CLCN2 is considerably more up regulated by hypotonicity than CLCN3.

their differential expression under a pressure insult. For these experiments we used perfused human anterior segment organ cultures from non-glaucomatous post-mortem donors. This perfused system uses paired eyes from the same individual, thus comparison between elevated pressure and normotense tissue is not confounded by different genetic backgrounds. A total of six paired anterior segments were studied. After perfusing for 24 hr at a constant flow of 3  $\mu$ l min<sup>-1</sup>, the flow of one eye of each pair was raised to an average pressure increase of  $38 \pm 4$  mmHg while the contralateral controls pressure did not change ( $\Delta P = 0.16 \pm 1.4$  mmHg). The average pressure of all 12 eyes at baseline was  $16.9 \pm 3.5$  mmHg.

Of the six pair of eyes, three pairs (or 50%) were high responders while the transcriptional responses of the other three were low to moderate. Results from the high responders are shown in Fig. 3. In this set, one eye of each pair was subjected, respectively, to 1 hr, 4 and 7 days of elevated pressure, while their contralaterals were maintained at baseline. Total RNA from each TM was reversed transcribed (RT) and the same RT reaction amplified separately with either CLCN2 and 18S, or CLCN3 and 18S primers. These multiplex, exponential amplifications were repeated for each channel and for each eye between two and six times. The top panel of Fig. 3

shows representative gels of the CLCN2 and CLCN3 expression determined at 1 hr, 4 or 7 days, in the normal pressure (NP) and high pressure (HP) eyes from each individual. The bottom panel represents the average values of the percent change in expression observed in the HP eye versus that of the contralateral NP.

This high response set resulted in the following expression changes. After 1 hr insult, CLCN2 and CLCN3 expressions were induced in the HP over the normotense  $149.3 \pm 24.5\%$  ( $n=3$ ;  $p=0.002$ ) and  $66.7 \pm 10.0\%$  ( $n=3$ ;  $p=0.003$ ), respectively. After 4 days HP, the expressions of CLCN2 and CLCN3 were reversed. The CLCN2 high pressure eye showed an increase over the normotense contralateral of  $29.5 \pm 4.5\%$  ( $n=2$ ;  $p=0.03$ ) while that of CLCN3 increased  $83.0 \pm 10.5\%$  ( $n=3$ ;  $p=0.02$ ). When elevated pressure was maintained for 7 days, CIC-2 mRNA was further decreased in the high pressure eye,  $-3.8 \pm 10.9\%$  ( $n=6$ ;  $p=0.7$ ) while the CLCN3 expression was induced  $64.5 \pm 10.9\%$  ( $n=6$ ;  $p=0.008$ ).

Interestingly, the set of low-moderate responders showed the same coordinated pattern of expression than the high responders. That is, after 1 hr, CLCN2 was the more up regulated of the two genes while the pattern was reversed at later periods. Thus, at 1 hr CIC-2 levels increased  $15.0 \pm 9.9\%$  ( $n=4$ ;  $p=0.2$ ) while those of

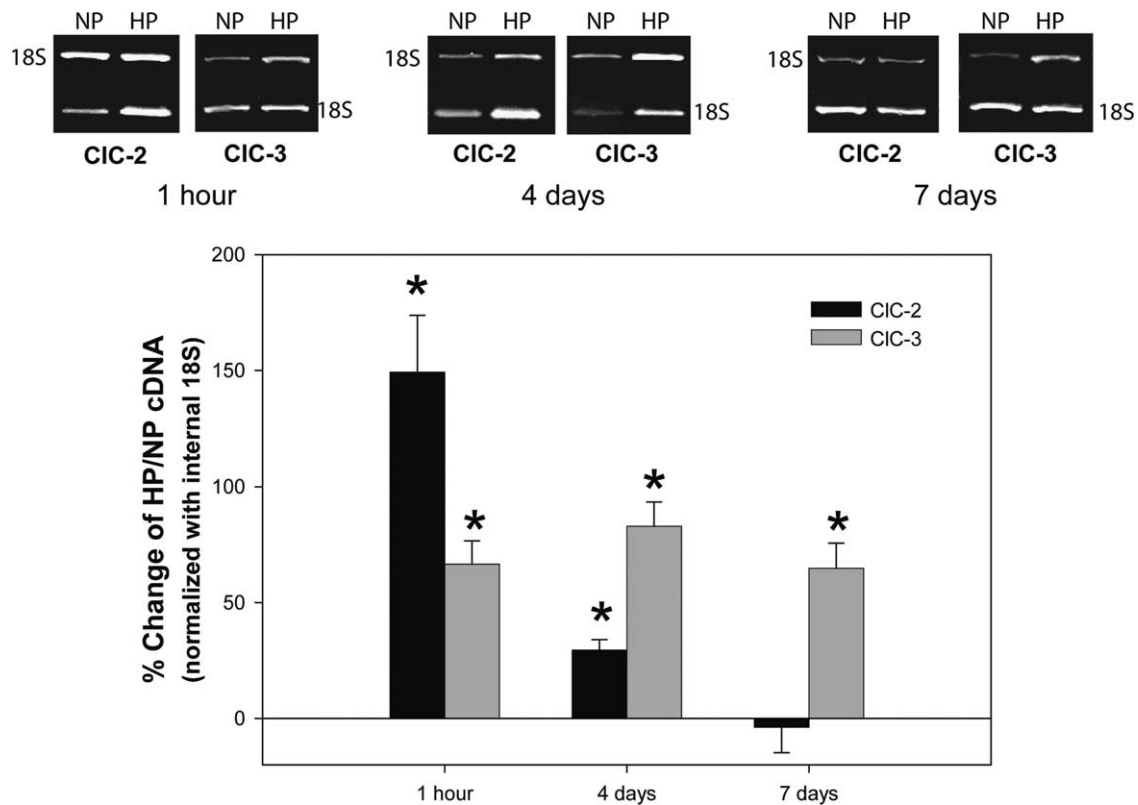


Fig. 3. Effect of elevated pressure on CLCN2 and CLCN3 expression in the perfused human TM of the high responder set ( $n=3$ ). One eye from each of three eye pairs was subjected to a  $\Delta P \cong 35$  mmHg (high pressure: HP) during 1 hr, 4 or 7 days. The contralateral eyes were maintained at normal baseline pressure  $\Delta P \cong 0.16$  mmHg (control: C). Total RNA from each TM was RT using random primers and amplified using RQ RT-PCR as described in Section 2. Multiplex CIC-2/18S and CIC-3/18S amplifications were performed at exponential 30 cycles (CIC-2, 1 hr and 4 days; CIC-3, 7 days); 35 cycles (CIC-2, 7 days) and 26 cycles (CIC-3, 1 hr and 4 days). 18S primer/competimers ratios were of 1:20 (CIC-2, 1 hr and 7 days; CIC-3, 1 hr, 4 and 7 days) and 1:22 (CIC-2, 4 days). PCR products were run on Tris-borate 1.5% Super AcrylAgarose gels containing  $25 \text{ ng ml}^{-1}$  ethidium bromide, band intensities captured, and analysed. Amplifications were repeated between 2 and 6 times per eye, per channel. Top panels: representative gels of CIC-2/18S and CIC-3/18S transcripts at 1 hr, 4 and 7 days of elevated pressure. Bottom panel: expression of CLCN2 (black bars) and CLCN3 (grey bars) normalized against 18S rRNA and expressed as percent increase of the high pressure from the normal pressure, control. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical differences (paired *t*-tests) are shown between the high pressure and control eyes. \* $p < 0.05$ . Short time period insults of elevated pressure induced up regulation of CLCN2 and CLCN3 but induction of CLCN2 was significantly higher than that of CLCN3 ( $p=0.04$ ). In contrast, after long pressure insults CLCN3 was significantly more up regulated than CLCN2 ( $p=0.008$ ).

CIC-3 were reduced  $-39.7 \pm 11.9\%$  ( $n=6$ ;  $p=0.13$ ). At 4 days, CIC-2 was slightly reduced,  $-1.7 \pm 2.9\%$  ( $n=4$ ;  $p=0.5$ ) in the high pressure eye while the CIC-3 increased  $6.6 \pm 15.4\%$  ( $n=5$ ;  $p=0.4$ ). At 7 days, the CIC-2 mRNA on the elevated eye showed a reduction of  $-8.0 \pm 4.0\%$  ( $n=2$ ;  $p=0.26$ ) while CIC-3 was slightly increased to  $4.5 \pm 4.2\%$  ( $n=4$ ;  $p=0.8$ ).

We then calculated whether all induced values of CLCN2 were different from the induced values of CLCN3 by the student's *t*-test. We found that at an earlier time period (1 hr of insult), CLCN2 is more induced than CLCN3 ( $p=0.04$ ), while the induction is reversed after a long-term insult, with CLCN3 being more induced than CLCN2 at 4 days ( $p=0.22$ ) and becoming significant at 7 days ( $p=0.008$ ).

These results indicate that whether high or low response eyes, the CLCN2 gene appears to be more involved than CLCN3 in early response mechanisms, perhaps in those dealing with homeostasis. On the contrary, regulation of

CLCN3 appears to be more relevant than that of CLCN2 at prolonged insults situations, perhaps in those mechanisms dealing with pathological conditions. In addition, although a higher number of individual human subjects are needed, these results suggest the presence of an individual response of these chloride channel genes to elevated pressure. This personal response would vary in intensity but would nevertheless maintain the relative expression pattern of the CLCN2 and CLCN3 genes.

#### 3.4. Effect of DEX treatment on the expression of CLCN2 and CLCN3

DEX, a glucocorticoid commonly used to treat several ocular diseases, is known to cause ocular hypertension and to induce glaucoma in approximately 30–40% of patients who are treated with steroids (Johnson, 1997). To investigate whether CIC-2 and CIC-3 could be potential mediators in the response of the TM to steroids,

we determined the expression of their genes after exposing HTM cells to DEX treatment for 1, 4 and 10 days. Expression of both genes in DEX-treated and vehicle controls was analysed by RQ RT-PCR and controlled with the internal expression of the 18S gene as described above. To further validate the HTM cell line DEX treatment, we amplified the TIGR/MYOC gene using the same RT reaction. TIGR/MYOC's mRNA and protein are known to

be specifically induced by DEX in HTM cells and not in other cell lines (Lo et al., 2003).

Results are shown on Fig. 4. The top panel shows photographs of representative gels run with the exponentially amplified cDNA from all genes after DEX treatments. The bottom panel shows the graph averaging percent changes of DEX versus untreated controls of all the repeated experiments. In the presence of a high up

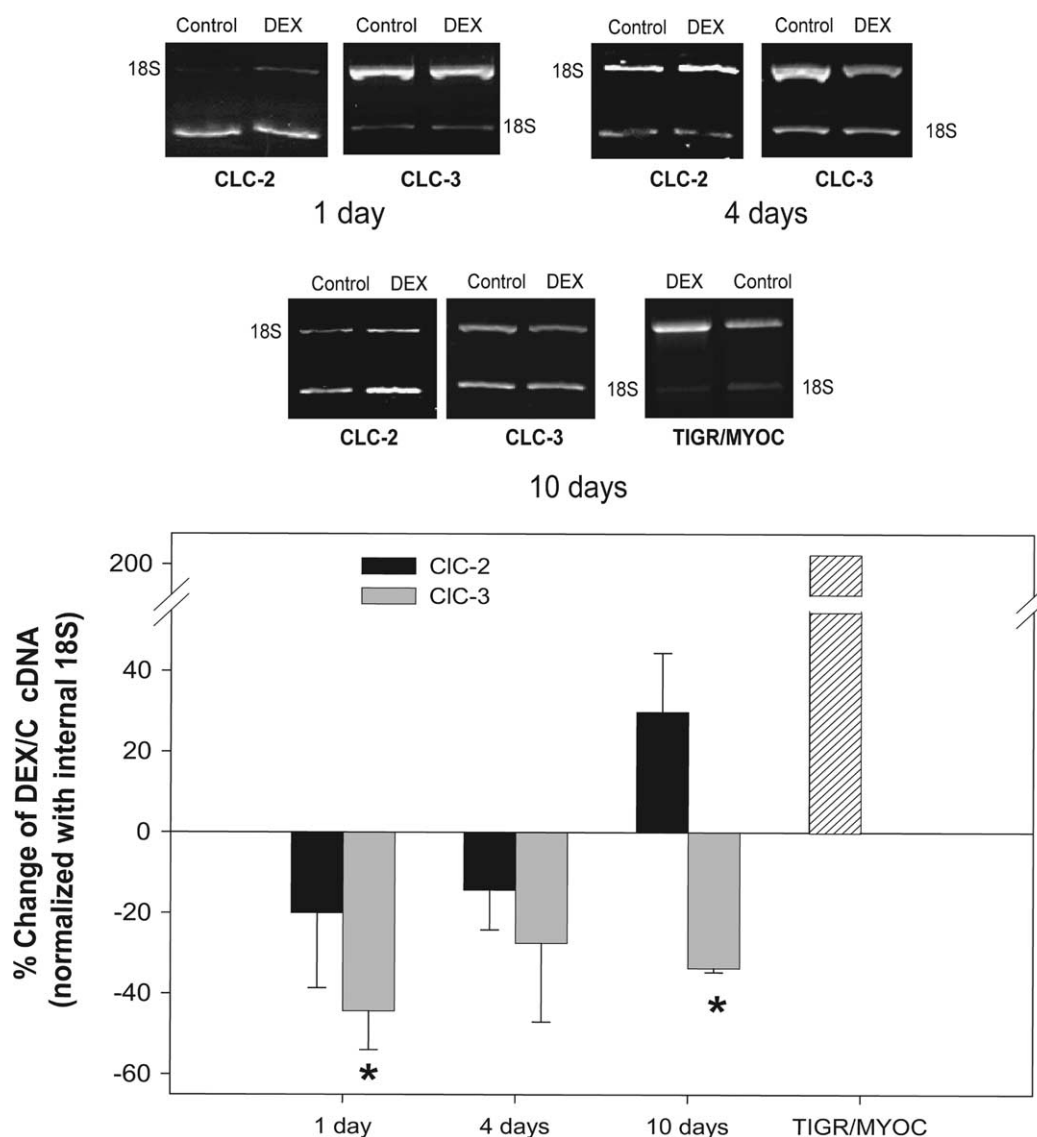


Fig. 4. Effect of DEX on CLCN2 and CLCN3 expression in HTM cells. HTM cells were treated with IMEM media containing 0.1  $\mu$ M DEX (DEX) or vehicle (control; C) for 1, 4 or 10 days. Total RNAs were RT using random primers and amplified as described in Section 2. Multiplex CIC-2/18S and CIC-3/18S amplifications were performed at the exponential 30 cycles (CIC-2, 1, 4 and 10 days and CIC-3, 1 and 4 days), 26 cycles (CIC-3, 10 days) and 29 cycles (TIGR/MYOC, 10 days). 18S primer/competimers ratios were 1:22 (CIC-2, 1 and 4 days and CIC-3, 4 days), 1:20 (CIC-3, 1 day), 1:15 (CIC-2 and TIGR/MYOC, 10 days) and 1:9 (CIC-3, 7 days). PCR products were run on Tris-borate 1.5% Super AcrylAgarose gels containing 25  $\text{ng ml}^{-1}$  ethidium bromide, band intensities captured, and analysed. Amplifications were repeated between 2 and 6 times per channel, per time point, and 3 times for the positive control, TIGR/MYOC. Top panels: representative gels of CIC-2/18S and CIC-3/18S transcripts at 1 and 4 days. Mid panel: representative gels of CIC-2/18S, CIC-3/18S and TIGR/MYOC/18S transcripts at 10 days. Bottom panel: expression of CLCN2 (black bars), CLCN3 (grey bars) and TIGR/MYOC (stippled bar) normalized against 18S rRNA and expressed as percent increase of DEX from the vehicle treated control. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM from independent experiments. Statistical differences (paired *t*-tests) are shown between the DEX and vehicle treated cells. \**p* < 0.05. In the presence of a high up regulation of TIGR/MYOC, the chloride channel CLCN3 gene is markedly down regulated by DEX treatment, more than that of CLCN2.

regulation of the TIGR/MYOC gene ( $203 \pm 33\%$ ) the expression of CLCN2 was down regulated at two out of three time points studied while CLCN3 was always down regulated after DEX treatment. The down regulation of the CLCN3 gene was always more pronounced than that of CLCN2. After 1 day exposure to DEX, normalized CIC-2 levels were reduced  $-20.0 \pm 18.6\%$  ( $n=3$ ;  $p=0.37$ ) from the untreated control, whereas CIC-3 was reduced  $-44.3 \pm 9.6\%$  ( $n=6$ ;  $p=0.05$ ). After 4 days, CIC-2 mRNA was down  $-14.3 \pm 9.8\%$  ( $n=3$ ;  $p=0.3$ ) and reduction of CIC-3 was  $-27.5 \pm 19.5\%$  ( $n=2$ ;  $p=0.2$ ). After 10 days, while unexpectedly, CIC-2 was increased to  $29.8 \pm 14.7\%$  ( $n=6$ ;  $p=0.1$ ), the reduction of CIC-3 and thus the down regulation of the CLCN3 gene became highly significant,  $-33.7 \pm 0.3\%$  ( $n=3$ ;  $p=0.001$ ).

Because it is well established that responses to glucocorticoids vary with each individual in the general population, specially in glaucoma (Johnson, 1997), we tested the influence of an individual's genetic background in the expression of CLCN2 and CLCN3. We conducted parallel experiments on HTM-46, a cell line derived from a 17-year-old individual. With the exception of one point, the overall effects of DEX on CIC-2 and CIC-3 mRNA levels were very similar. The CLCN3 gene was more significantly down regulated than CLCN2. At 1 and 10 days of treatment, CIC-3 was reduced  $-20.4 \pm 3.4\%$  ( $n=5$ ;  $p=0.04$ ) and  $-43.3 \pm 11.1\%$  ( $n=3$ ;  $p=0.03$ ), respectively. CIC-2 was slightly reduced at all times, although as above, the down regulation induced on this channel by DEX did not reach significant values.

Therefore, these results indicate that CIC-3 transcripts are significantly affected by a DEX treatment. Transcripts values for CIC-2 showed a low reduction level in all 12 measurements of the early time periods, which was not significant. At this time we do not know whether this reduction represents a real trend for CIC-2, or if this channel gene was not affected by DEX. A higher number of measurements, or different technology (such as fluorescence determination) could help answer the question. In any event, our findings reveal that, regardless of the different extent of down regulation of CLCN3 in different individuals, the mRNA encoded by this gene was at all times more strongly reduced than CIC-2.

#### 4. Discussion

Voltage-gated chloride channels of the plasma membrane play a key role in physiological processes involving cell volume regulation, ionic homeostasis, transepithelial transport, and regulation of electrical excitability (Jentsch et al., 2002). Intracellular members of the chloride channel family are also involved in organellar volume regulation and electroneutrality maintenance. Because cells of the human TM are subjected to the effects of fluid dynamics, it would seem logical to presume that

such physiological properties would have an influence in the outflow facility of the tissue. In fact, a number of studies have supported an association between cell volume regulation and resistance to aqueous humour outflow (Gual et al., 1997; Mitchell et al., 2002). Although the presence of  $\text{Cl}^-$  currents has been established in the human TM using patch clamp technology (Mitchell et al., 2002; Srinivas et al., 2004; Soto et al., 2004), there is no characterization of the molecular expression of the chloride channel genes in the human tissue. Only one recent study has reported the presence of CIC-2 and CIC-5, and the absence of CIC-3 in the bovine TM by the use of primers homologous to the human sequence (Srinivas et al., 2004).

Determination of transcripts levels for these channel proteins as well as their gene's response to stimuli known to affect outflow facility is of main importance to further elucidate their role in the human TM. Therefore, the purpose of the present study was to perform a normalized relative abundance determination of the transcripts for seven chloride channels, and to determine whether responses of the CLCN2 and CLCN3 highest expressed genes were altered by hypotonic shock, elevated pressure and DEX treatments. Because the complete sequence of the chloride channels cDNAs is available for a number of human tissues, we were able to design specific primers that both, matched each channel cDNA with a lower than  $10^{-4}$  *E*-value, and amplified DNA fragments with a different MW than an 18S internal marker.

RQ RT-PCR experiments indicated that CLCN2 through CLCN7 genes are expressed in HTM cells while expression of CLCN1 is not detected. CIC-1 is highly specific for skeletal muscle (Steinmeyer et al., 1991), where it is dependent on muscle electrical activity and involved in muscle contractility. Because TM cells have shown to have contractile properties (Wiederholt et al., 2000), and because other relevant TM genes, such as TIGR/myocilin, are highly expressed in skeletal muscle (Ortego et al., 1997), we thought CIC-1 might be present in HTM cells. However, muscle cell lines also express very low levels of CIC-1 (Bardouille et al., 1996) and it would be possible that expression of this channel is present in the intact TM but down regulated in cultured HTM cells. The apparent discrepancy between the observed presence of CIC-3 in TM cells from human and its reported absence in those from bovine (Srinivas et al., 2004) is most likely due to sequence variations between the human and bovine gene, whose full sequence is unknown.

Although members of the chloride channel gene family are widely expressed (Jentsch et al., 2002) not many studies have compared the relative abundance of their transcripts in the same tissue. Our results show that, in HTM cells, CIC-2 and CIC-3 were the most abundant, comprising about twice the amount of CIC-6 and CIC-7 and four times that of CIC-4 and CIC-5. Since CIC-2 and CIC-3 are known to have a role in volume regulation (Duan et al., 1997; Furukawa et al., 1998; Roman et al., 2001; Jin et al., 2003), this finding

reinforces the importance of this mechanism in TM physiology. Interestingly, CIC-7, detected here in the second most abundant group, is also quite abundant in osteoclasts where it is involved in bone matrix degradation (Kornak et al., 2001). In addition to skeletal deformities, CLCN7 knockout mice exhibit a severe loss of photoreceptors although have mostly normal retinal ganglion cells (Hubner and Jentsch, 2002). Recently, we reported that genes essential in cartilage and bone formation are modulated by elevated pressure in the human TM, and have introduced the concept of the relevance of bone physiology related genes in the regulation of IOP (Vittitow and Borrás, 2004). The relative higher abundance of this channel in the TM might reinforce this concept. By affecting the consistence of the TM tissue as a whole, CIC-7 might contribute to maintain the physiological resistance.

After subjecting HTM cells to a hypotonic shock, we observed an up regulation of the CLCN2 gene which was significant at both time periods. CLCN3 was slightly up regulated at all points though the induction values did not reach a significant level. CIC-2 is located at the membrane and its activation in other systems has been associated with mechanisms leading to its depolarization and opening. Its activation is also associated with preventing  $[Cl^-]_i$  accumulation. It is likely that, as it does in other tissues, CIC-2 acts to counteract the deleterious effects of swelling on the human TM outflow by increasing  $Cl^-$  permeability and inducing the return to the initial volume. It has recently been shown that  $Cl^-$  (and  $K^+$ ) currents participate in the recovery of bovine TM cell volume and outflow facility after hypotonic treatment (Soto et al., 2004). Our findings here of increased levels of CIC-2 mRNA (and presumably of the encoded protein activity) are then an indication that the CIC-2 channel might play an important role in the process of protecting TM cells from insults leading to increasing cell volumes. They also suggest that this CIC-2 protecting mechanism is due, at least in part, to up regulation of gene expression. Our results on the low changes on the expression of the CLCN3 channel after swelling may also provide some insight as to why changes in swelling activated currents were reported to be or not to be detected in CLCN3 knockout mice (Stobrawa et al., 2001; Yamamoto-Mizuma et al., 2004), and on the extent of participation of the expression of this gene in such currents.

Elevated pressure influenced the expression of the CLCN2 and CLCN3 genes differently. In both sets of IOP responders, CLCN2 and CLCN3 maintained the same relative expression pattern. That is, after 1 hr of high pressure, CLCN2 was more induced than CLCN3, while after long-term treatments CLCN3 was more induced than CLCN2. The mechanisms governing responses at each time-period insult of high pressure are not fully defined. Current studies in our laboratory have identified sets of genes altered at different high pressure time-periods (Gonzalez et al., 2000; Borrás, 2003; Vittitow and Borrás, 2004) as well as the presence of a counteractive response at

2–4 days high pressure (Borrás et al., 2002). The trend seen here for CLCN2, a gene involved in cell volume regulation, seems to fit with the influence of regulation of TM permeability already observed at shorter pressure insults (Gonzalez et al., 2000; Borrás, 2003). In contrast, CLCN3 appears to be preferentially induced at later times, suggesting perhaps a higher association of this gene with pathological conditions in the human TM than CLCN2. Interestingly, other authors have reported changes in CIC-3 levels in a model of cardiac hypertension (Hiramatsu et al., 2002) induced by aortic banding. In such study, CLCN3 gene expression decreased in early but increased in late pressure overload, and both changes were prevented by blood pressure reduction. It would be very intriguing to find the CLCN2 response in the cardiac model and whether the reversal effects of CLCN3 could be observed in the eye by the use of lowering pressure agents.

Additionally, it was also interesting to find that the extent of CIC-2 and CIC-3 mRNA levels in response to pressure is individual-dependent. There is increasing evidence that individual characteristics (age, gender) and genetic background of an individual markedly influences the hypertensive response, both in developing high IOP in response to drugs (Johnson, 1997), or in lowering pressure by the use of drugs (Bardouille et al., 1996; Camras and Hedman, 2003). The phenomenon seen here might be an indication of the presence of a ‘responder pressure effect’ of these channels. Clearly, a higher number of individuals would be needed to substantiate this first observation.

Dexamethasone significantly down regulated CLCN3 and induced a lesser, non-significant reduction of CIC-2 levels in all but one time-points studied. We interpret this finding as an indication of the lack of an active participation of these two channels in the TM pathology and in the development of glaucoma associated with steroid administrations (Johnson, 1997). Rather, this down regulation is perhaps the result of a channel shut off secondary defect due to the overwhelming increase of production of ECM-proteins occurring during the DEX treatment. We have previously shown that the genes most up regulated by DEX belong to the category of secreted glycoproteins and that these up regulations were quite dramatic with fold changes values in the region of a 100-fold (Lo et al., 2003). At the present time, the mechanism of DEX down regulation of the chloride channel genes is not known. Some promoter elements have been involved in the repression of gene expression by DEX. These include the AP-1 sites, involved in the c-jun DEX down regulation (Wei et al., 1998), and adenovirus E4 promoter binding protein (E4BP4) sites, present in such genes as iNoS and Cox-2 (Wallace et al., 1997). It would be of great interest to characterize CLCN2 and CLCN3 promoters for the presence and functional activity of DEX responsive promoter elements.

Finally, in viewing our results it is important to keep into perspective that, although they often go hand in hand, over and under-expression of a gene at mRNA level does not



automatically imply an up or down regulation of protein function. There are a number of intermediate steps which can modify the final outcome of an increased mRNA level such as mRNA stability, efficiency of translation and protein folding. So changes in mRNA, albeit very important, represent only one step of the chain of regulatory events from gene to function.

In summary, we have shown that six of the seven voltage-gated chloride channel genes (CLCN1 to CLCN7) are expressed in the human TM at different relative levels. CIC-2 and CIC-3 mRNAs, which translates into channels implicated in cell swelling, were the most abundant. CIC-7 mRNA, which translate into a channel involved in osteoclast resorption activity (Kornak et al., 2001), was the following third. CLCN2 is consistently induced by conditions of cell swelling (hypotonic shock). This finding reaffirms its involvement in TM cell volume regulation, and make this gene a candidate for the increased cell volume observed in glaucomatous cells (Putney et al., 1999a). Subjection of perfused human TM tissue and HTM cells to conditions of elevated IOP and DEX, respectively, altered the expression levels of the CLCN2 and CLCN3 genes in the same relative manner. CLCN2 appeared to be more affected by conditions associated with early response regulatory mechanisms, while CLCN3 expression was more influenced by late conditions associated with TM pathology. We believe our findings provide the first molecular insight into voltage-gated channels gene expression in the human TM and open the door to study the role of these channels' genes in the regulation of IOP and development of glaucoma.

## Acknowledgements

The authors wish to thank Jason L. Vittitow, PhD for his continuous guidance and advice during the execution of the study. Supported by NIH grants EY11906 (TB) and EY13126 (TB); PM99-0169 (AG), BFI2003-01190 (AG). NC is a MCYT student fellow awardee.

## References

- Al Aswad, L.A., Gong, H., Lee, D., O'Donnell, M.E., Brandt, J.D., Ryan, W.J., et al., 1999. Effects of Na–K–2Cl cotransport regulators on outflow facility in calf and human eyes in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 1695–1701.
- Bardouille, C., Vullhorst, D., Jockusch, H., 1996. Expression of chloride channel 1 mRNA in cultured myogenic cells: a marker of myotube maturation. *FEBS Lett.* 396, 177–180.
- Bond, T.D., Ambikapathy, S., Mohammad, S., Valverde, M.A., 1998. Osmosensitive Cl<sup>-</sup> currents and their relevance to regulatory volume decrease in human intestinal T84 cells: outwardly vs. inwardly rectifying currents. *J. Physiol.* 511, 45–54.
- Borrás, T., 2003. Gene expression in the trabecular meshwork and the influence of intraocular pressure. *Prog. Retin. Eye Res.* 22, 435–463.
- Borrás, T., Rowlette, L.L., Erzurum, S.C., Epstein, D.L., 1999. Adenoviral reporter gene transfer to the human trabecular meshwork does not alter aqueous humor outflow. Relevance for potential gene therapy of glaucoma. *Gene Ther.* 6, 515–524.
- Borrás, T., Rowlette, L.L., Tamm, E.R., Gottanka, J., Epstein, D.L., 2002. Effects of elevated intraocular pressure on outflow facility and TIGR/MYOC expression in perfused human anterior segments. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 33–40.
- Bösl, M.R., Stein, V., Hubner, C., Zdebik, A.A., Jordt, S.E., Mukhopadhyay, A.K., et al., 2001. Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell–cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl<sup>-</sup> channel disruption. *EMBO J.* 20, 1289–1299.
- Camras, C.B., Hedman, K., 2003. Rate of response to latanoprost or timolol in patients with ocular hypertension or glaucoma. *J. Glaucoma* 12, 466–469.
- Clark, S., Jordt, S.E., Jentsch, T.J., Mathie, A., 1998. Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J. Physiol.* 506, 665–678.
- Duan, D., Winter, C., Cowley, S., Hume, J.R., Horowitz, B., 1997. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 390, 417–421.
- Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y., Hiraoka, M., 1998. Characteristics of rabbit CIC-2 current expressed in *Xenopus oocytes* and its contribution to volume regulation. *Am. J. Physiol.* 274, C500–C512.
- Gonzalez, P., Epstein, D.L., Borrás, T., 2000. Genes upregulated in the human trabecular meshwork in response to elevated intraocular pressure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 352–361.
- Gual, A., Llobet, A., Gilabert, R., Borrás, M., Pales, J., Bergamini, M.V., et al., 1997. Effects of time of storage, albumin, and osmolality changes on outflow facility (C) of bovine anterior segment in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 2165–2171.
- Hermoso, M., Satterwhite, C.M., Andrade, Y.N., Hidalgo, J., Wilson, S.M., Horowitz, B., et al., 2002. CIC-3 is a fundamental molecular component of volume-sensitive outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channels and volume regulation in HeLa cells and *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 40066–40074.
- Hiramatsu, M., Furukawa, T., Sawanobori, T., Hiraoka, M., 2002. Ion channel remodeling in cardiac hypertrophy is prevented by blood pressure reduction without affecting heart weight increase in rats with abdominal aortic banding. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 39, 866–874.
- Hubner, C.A., Jentsch, T.J., 2002. Ion channel diseases. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2435–2445.
- Jentsch, T.J., Friedrich, T., Schriever, A., Yamada, H., 1999. The CLC chloride channel family. *Pflügers Arch.* 437, 783–795.
- Jentsch, T.J., Stein, V., Weinreich, F., Zdebik, A.A., 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.* 82, 503–568.
- Jin, N.G., Kim, J.K., Yang, D.K., Cho, S.J., Kim, J.M., Koh, E.J., et al., 2003. Fundamental role of CIC-3 in volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel function and cell volume regulation in AGS cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 285, G938–G948.
- Johnson, D.H., 1997. Corticosteroid glaucoma, in: Epstein, D.L., Allingham, R.R., Schuman, J.S. (Eds.), Chandler and Grant's Glaucoma. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, pp. 404–411.
- Johnson, D.H., Tschumper, R.C., 1987. Human trabecular meshwork organ culture. A new method. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28, 945–953.
- Kajita, H., Omori, K., Matsuda, H., 2000. The chloride channel CIC-2 contributes to the inwardly rectifying Cl<sup>-</sup> conductance in cultured porcine choroid plexus epithelial cells. *J. Physiol.* 523, 313–324.
- Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M.R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., et al., 2001. Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 104, 205–215.
- Llobet, A., Gual, A., Pales, J., Barraquer, R., Tobias, E., Nicolas, J.M., 1999. Bradykinin decreases outflow facility in perfused anterior segments and induces shape changes in passaged BTM cells in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 113–125.

- Lo, W.R., Rowlette, L.L., Caballero, M., Yang, P., Hernandez, M.R., Borrás, T., 2003. Tissue differential microarray analysis of dexamethasone induction reveals potential mechanisms of steroid glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 473–485.
- Lütjen-Drecoll, E., Rohen, J.W., 1996. Morphology of aqueous outflow pathways in normal and glaucomatous eyes, in: Ritch, R., Shields, M.B., Krupin, T. (Eds.), *The Glaucomas*, Second Ed. Mosby, St Louis, pp. 89–123.
- Lütjen-Drecoll, E., Gabelt, B.T., Tian, B., Kaufman, P.L., 2001. Outflow of aqueous humor. *J. Glaucoma* 10, S42–S44.
- Mitchell, C.H., Fleischhauer, J.C., Stamer, W.D., Peterson-Yantorno, K., Civan, M.M., 2002. Human trabecular meshwork cell volume regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C315–C326.
- Nilius, B., Droogmans, G., 2003. Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol. Scand.* 177, 119–147.
- Nilsson, S.F.E., 1994. in: Kaufman, P.L., Mittag, T.W. (Eds.), *The Normal Anterior Segment: Physiology and Neurophysiology of Aqueous Humor Inflow and Outflow*. Mosby-Wolfe, London.
- O'Donnell, M.E., Brandt, J.D., Curry, F.R., 1995. Na–K–Cl cotransport regulates intracellular volume and monolayer permeability of trabecular meshwork cells. *Am. J. Physiol.* 268, C1067–C1074.
- Ortego, J., Escribano, J., Coca-Prados, M., 1997. Cloning and characterization of subtracted cDNAs from a human ciliary body library encoding TIGR, a protein involved in juvenile open angle glaucoma with homology to myosin and olfactomedin. *FEBS Lett.* 413, 349–353.
- Putney, L.K., Brandt, J.D., O'Donnell, M.E., 1999a. Na–K–Cl cotransport in normal and glaucomatous human trabecular meshwork cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 425–434.
- Putney, L.K., Vibat, C.R., O'Donnell, M.E., 1999b. Intracellular Cl regulates Na–K–Cl cotransport activity in human trabecular meshwork cells. *Am. J. Physiol.* 277, C373–C383.
- Roman, R.M., Smith, R.L., Feranchak, A.P., Clayton, G.H., Doctor, R.B., Fitz, J.G., 2001. CIC-2 chloride channels contribute to HTC cell volume homeostasis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280, G344–G353.
- Santos, O.D., Grozovsky, R., Goldenberg, R.C., Carvalho, D.P., Fong, P., Guggino, W.B., et al., 2003. Thyroid hormone modulates CIC-2 chloride channel gene expression in rat renal proximal tubules. *J. Endocrinol.* 178, 503–511.
- Smith, R.L., Clayton, G.H., Wilcox, C.L., Escudero, K.W., Staley, K.J., 1995. Differential expression of an inwardly rectifying chloride conductance in rat brain neurons: a potential mechanism for cell-specific modulation of postsynaptic inhibition. *J. Neurosci.* 15, 4057–4067.
- Soto, D., Comes, N., Ferrer, E., Morales, M., Escalada, A., Palés, J., et al., 2004. Modulation of aqueous humor outflow by ionic mechanisms involved in trabecular meshwork cell volume regulation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 3650–3661.
- Srinivas, S.P., Maertens, C., Goon, L.H., Goon, L., Satpathy, M., Yue, B.Y., et al., 2004. Cell volume response to hyposmotic shock and elevated cAMP in bovine trabecular meshwork cells. *Exp. Eye Res.* 78, 15–26.
- Staley, K., 1994. The role of an inwardly rectifying chloride conductance in postsynaptic inhibition. *J. Neurophysiol.* 72, 273–284.
- Stamer, W.D., Peppel, K., O'Donnell, M.E., Roberts, B.C., Wu, F., Epstein, D.L., 2001. Expression of aquaporin-1 in human trabecular meshwork cells: role in resting cell volume. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1803–1811.
- Steinmeyer, K., Ortland, C., Jentsch, T.J., 1991. Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* 354, 301–304.
- Stobrawa, S.M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A.A., et al., 2001. Disruption of CIC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* 29, 185–196.
- Tian, B., Geiger, B., Epstein, D.L., Kaufman, P.L., 2000. Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 619–623.
- Vittitow, J., Borrás, T., 2002. Expression of optineurin, a glaucoma-linked gene, is influenced by elevated intraocular pressure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 67–74.
- Vittitow, J., Borrás, T., 2004. Genes expressed in the human trabecular meshwork during pressure induced homeostatic response. *J. Cell. Physiol.* 201, 126–137.
- Wallace, A.D., Wheeler, T.T., Young, D.A., 1997. Inducibility of E4BP4 suggests a novel mechanism of negative gene regulation by glucocorticoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232, 403–406.
- Wang, L., Chen, L., Jacob, T.J., 2000. The role of CIC-3 in volume-activated chloride currents and volume regulation in bovine epithelial cells demonstrated by antisense inhibition. *J. Physiol.* 524, 63–75.
- Wei, P., Inamdar, N., Vedeckis, W.V., 1998. Transrepression of c-jun gene expression by the glucocorticoid receptor requires both AP-1 sites in the c-jun promoter. *Mol. Endocrinol.* 12, 1322–1333.
- Weylandt, K.H., Valverde, M.A., Nobles, M., Raguz, S., Amey, J.S., Diaz, M., et al., 2001. Human CIC-3 is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation. *J. Biol. Chem.* 276, 17461–17467.
- Wiederholt, M., Thieme, H., Stumpff, F., 2000. The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Prog. Retin. Eye Res.* 19, 271–295.
- Yamamoto-Mizuma, S., Wang, G.X., Liu, L.L., Schegg, K., Hatton, W.J., Duan, D., et al., 2004. Altered properties of volume-sensitive osmolyte and anion channels (VSOACs) and membrane protein expression in cardiac and smooth muscle myocytes from *Clcn3*<sup>-/-</sup> mice. *J. Physiol.* 557, 439–456.
- Zigler Jr., J.S., Hess, H.H., 1985. Cataracts in the Royal College of Surgeons rat: evidence for initiation by lipid peroxidation products. *Exp. Eye Res.* 41, 67–76.

Article 2

**Identification and functional characterization of CIC-2 chloride channels in trabecular meshwork cells**

Núria Comes, Elena Abad, Miguel Morales, Teresa Borrás, Arcadi Gual and Xavier Gasull

Article en preparació

## Identification and functional characterization of CIC-2 chloride channels in trabecular meshwork cells

Núria Comes<sup>1</sup>, Elena Abad<sup>1</sup>, Miguel Morales<sup>1</sup>, Teresa Borrás<sup>2</sup>, Arcadi Gual<sup>1</sup> and Xavier Gasull<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Neurophysiology, Department of Physiological Sciences I-Institute of Biomedical Investigations August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Faculty of Medicine, University of Barcelona. Spain. <sup>2</sup> Department of Ophthalmology, University of North Carolina, School of Medicine, Chapel Hill, NC.

**Abstract.** In the eye, trabecular meshwork (TM) cell volume is an important determinant of aqueous humor outflow. Among the different functions proposed, CIC-2 chloride channels are proposed to be involved in regulation of cellular volume and intracellular [Cl<sup>-</sup>]. Therefore, we characterized the properties and modulation of an inwardly rectifying chloride current activated in these cells. Patch-clamp recordings revealed inwardly rectifying chloride currents activated by membrane hyperpolarization in primary cultures of both bovine (BTM) and human (HTM) TM cells. Electrophysiological properties and anion permeability sequence (Cl<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > I<sup>-</sup> > F<sup>-</sup>) were in agreement with previous data for CIC-2 in other cells. The currents were blocked by Cd<sup>2+</sup> and enhanced by extracellular acidification, 8Br-cAMP and cell swelling, while extracellular alkalinization decreased them. RT-PCR experiments using total RNA extracted from BTM cells revealed the molecular expression of CIC-2 as well as CIC-5, -6 and -7, while CIC-1, -3 and -4 were not detected. RT-PCR from total HTM RNA confirmed the expression of CIC-2 to -7 channels as we have previously shown. Cell volume experiments in calcein-loaded cells revealed that CIC-2 channels were not involved in the RVD mechanism. Outflow facility studies performed in bovine anterior segments showed that CIC-2 channels do not participate in outflow facility recovery after hypotonic cell swelling. In summary, TM cells express functional CIC-2 channels that are modulated by pH, cAMP and cell swelling. Due to their modulation by diverse stimuli, we propose the involvement of CIC-2 channels in different cellular processes in the TM.

**Running head:** CIC-2 channels in trabecular meshwork cells

**keywords:** trabecular meshwork, aqueous humor outflow, chloride, volume, glaucoma

**Contact** information and corresponding author: Xavier Gasull, Ph.D. Laboratori de Neurofisiologia Facultat de Medicina - U.B. Casanova 143 E-08036 Barcelona Spain Tel: (3493) 402.45.19 Fax: (3493) 403.52.95 E-mail: xgasull@ub.edu

## INTRODUCTION

In the eye, the balance between aqueous humor (AH) inflow and outflow determines intraocular pressure (IOP). The major AH outflow pathway in humans, is through the trabecular meshwork (TM) and the Schlemm's canal (SC), although about 20% of the AH leaves the anterior chamber in between the ciliary muscle fibers to reach the scleral tissue (uveoscleral pathway). Impairment of AH outflow leads to ocular hypertension, which is the main risk factor to develop glaucoma. It is accepted that both TM cells and endothelial cells from the inner wall of SC have an active role in modulating the AH outflow pathway permeability, maintaining IOP values within the physiological range. A combination of several different mechanisms are probably involved in outflow regulation including contractibility of the TM (63), morphological changes and cytoskeletal rearrangements (61), stretch (26), interactions with the extracellular matrix (65), changes in gene expression (8, 28) and changes in TM cells shape and volume (41, 52).

It has been demonstrated that changes in TM cells volume may determine the tissue porosity and therefore, the AH outflow rate (2, 30, 52). Recently, cAMP-dependent cell shrinkage was suggested to participate in the outflow facility improvement induced by some agonists (23, 53) probably through modulation of different ionic channels and pumps involved in maintaining the cellular volume (23, 41, 46, 52, 53). To this effect chloride and potassium channels have been reported to be involved in a regulatory volume decrease (RVD) mechanism (41) and their selective blockade impair outflow facility recovery after cell swelling (52).

Among the ionic channels involved in cell volume regulation, the molecular identity of the swelling-activated chloride channel ( $Cl_{swell}$ ) is still unknown and some controversy exists about whether or not ClC-3 mediates  $Cl_{swell}$  currents (19, 56, 62). Like in other eye tissues (18), both  $Cl_{swell}$  (41, 52, 53) and ClC-3 have also been detected in the TM (15). In fact, we recently described that ClC-3 expression is up-regulated by IOP elevation and down-regulated by dexamethasone treatment (15). However, in TM cells ClC-2 is the most expressed channel of the CLC family and interestingly up-regulated after cell swelling (15). This channel is activated by membrane hyperpolarization in other cell types (33) and, due to its activation by cell swelling, has been involved in cell volume regulation (29). Despite the latter, the exact functions of ClC-2 remain to be identified, and in addition to cell swelling, it may play a role in several cell mechanisms including signal transduction, transepithelial transport, phagocytosis and membrane potential stabilization (33). It has also been described that ClC-2 might influence the intracellular chloride concentration  $[Cl^-]_i$  (48). In neurons,  $[Cl^-]_i$  determines the hyperpolarizing response to  $\beta$ -amino-butyric acid (GABA) and glycine (40) and in TM cells it is an important determinant of cell volume (50). ClC-2 channels can also be important to regulate the anionic homeostasis of cell-

to-cell interactions (57) and also gene *CLCn2*<sup>-/-</sup> knockout mice showed a severe degeneration of male germ cells and photoreceptors (9).

Since little is known about chloride channels and their functions in TM cells, here, we have performed an electrophysiological characterization of ClC-2 currents in human and bovine TM cells and studied their modulation by pH, cAMP and cell swelling. Also, the contribution of these channels in the RVD mechanism in TM cells as well as in AH outflow facility modulation has been evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

### Culture of Bovine and Human Trabecular Meshwork Cells

Eyes from non-glaucomatous human donors, gently provided by the eye bank of Institut Universitari Barraquer (Barcelona, Spain) were kept in phosphate-buffered saline (PBS) at 4°C and used for human trabecular meshwork (HTM) cell cultures. In all cases the TM was dissected after the cornea was removed for transplantation purposes. The time lapsed between the death and the dissection was always less than 20 h. Bovine trabecular meshwork (BTM) cell cultures were performed using eyes from 3 to 6 month-old cows obtained at the local abattoir 0.5 to 2 h after death and kept in PBS at 4°C for not more than 1.5 h. A slight modification of the technique described by Stamer et al. (55) was used. As described (39), TM strips were digested with 2 mg/mL collagenase and 0.5 mg/mL bovine serum albumin (BSA) at 37°C for 2 h. After mechanical digestion with fire-polished glass Pasteur pipettes, the supernatant was collected and centrifuged. The pellet was resuspended and seeded in culture flasks containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) plus 10% fetal bovine serum, 100 mg/mL L-glutamine, 100 U.I./mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 2.5 µg/mL amphotericin-B. Cells reached confluence 12-15 days later. Cell passages were performed using Trypsin-EDTA. Cells from passages 1 to 3 were used for electrophysiology measurements. All products for cell culture were obtained from Sigma (Madrid, Spain).

### Patch clamp procedures

TM cells were plated onto small glass coverslips and studied 24-48 h thereafter. Coverslips were transferred to a special chamber (0.2 mL) in the stage of an inverted microscope (Nikon diaphot, Tokyo, Japan) to perform the recordings. External solutions were superfused at a rate of 3-4 mL/min by gravity. Before starting the recording session, culture medium was exchanged to bath recording solution. Recordings were performed at room temperature. Borosilicate glass patch pipettes were pulled in an electrode puller (P-97, Sutter Instruments, Novato, CA) and had a filled tip resistance between 7-9 MB. Pipette capacitance

to ground was neutralized after the seal was formed. An Ag/AgCl ground electrode mounted in a 3M KCl agar bridge was used. Before the pipette had entered the bath and until cell contact positive pressure was applied. Whole cell currents were recorded using a Heka L/M-EPC7 patch clamp amplifier (Heka, Germany) as described previously (26, 52). Data acquisition and command potentials were controlled with WinWCP 3.5 software (John Dempster, University of Strathclyde, U.K.) using a Digidata 1320A (Axon instruments, California). After breaking into the whole-cell configuration, cells were allowed to stabilize and dialyze for 3-4 min before starting. Whole-cell currents were recorded at 10 kHz without any leak current subtraction protocol. Cells were clamped at 0 mV and a prepulse of -120 mV during 30 s was used to enhance inwardly rectifying Cl<sup>-</sup> currents. Voltage pulses from -120 to +40 mV in 20 mV steps were applied. The intracellular pipette solution contained (in mM): 140 NMDGCl, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 1.0 EGTA, 10 Hepes; pH 7.35 adjusted with tris base. For all experiments an ATP-free intracellular solution was used. The standard isotonic bath solution contained (in mM): 140 NMDGCl, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 10 Hepes and 20 D-Sorbitol; pH 7.35 adjusted with tris base (300±1 mOsm/Kg). Data were corrected with the calculated theoretical junction potential values for each solution. The bath hyposmotic solution contained (in mM): 105 NMDGCl, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 10 Hepes; pH 7.35 adjusted with tris base (219±2 mOsm/Kg). Solutions osmolalities were measured with a Vapro osmometer (Wescor, Utah). 8-Bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (8Br-cAMP) was obtained from Sigma (Madrid, Spain). To study channel ionic permeabilities, 1.2 s voltage ramps from -100 to +100 mV were recorded for Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> and F<sup>-</sup>. In these experiments, the bath isotonic solution used was (in mM): 130 NaX (X = anion), 10 NMDGCl, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 10 Hepes and 20 D-Sorbitol adjusted with tris base.

### Chloride channels primers

Forward and reverse primers for CLC channels were designed using the <http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer> program and intron-spanning mRNA regions of the indicated GenBank accession number as previously published (15). GenAtlas database (<http://www.dsi.univ-paris5.fr/genatlas/>) (University René Descartes, Paris, France) was used to obtain exons location from each *CLCN* gene. The specificity of the primers for each target gene was obtained using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) comparisons against the entire nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and selecting alignment with Expectation score values (E-value) equal or lower than 10<sup>-4</sup> (expected number of matches to be found merely by chance).

### RNA extraction and reverse transcription (RT)

Cultured HTM and BTM cells were scraped and homogenized with 350  $\mu$ l RLT (QIAGEN, Valencia, CA). RNA extraction was performed loading the homogenized culture onto a QIAshredder column (QIAGEN) and continued by the use of the RNeasy Mini kit with on-column RNase-free DNase digestion (QIAGEN) according to manufacturer's directions. Total RNA was eluted in 30  $\mu$ l Rnase-free water.

Reverse transcription (RT) reactions were performed using random primers from RETROscript kit (Ambion, Austin, TX). Approximately 1  $\mu$ g of total RNA was mixed with 2  $\mu$ l of 50  $\mu$ M random decamers and nuclease-free water in a total of 12  $\mu$ l, heated at 75°C for 2 min and cooled on ice. The reaction continued in a 20  $\mu$ l mix containing 2  $\mu$ l of 10X RT buffer (500 mM TrisHCl, pH 8.3, 750 mM KCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, and 50 mM DTT), 4  $\mu$ l dNTP (2.5 mM each), 1  $\mu$ l RNase inhibitor (10 U), and 1  $\mu$ l M-MuLV reverse transcriptase (100 U). The RT reactions were incubated at 42°C for 60 min and terminated at 92°C for 2 min.

### PCR reaction

To perform the polymerase chain reaction (PCR) a 0.5  $\mu$ l aliquot RT reaction was used in a 10  $\mu$ l reaction mixture containing 1  $\mu$ l 10X PCR reaction buffer, 0.8  $\mu$ l dNTP (2.5 mM each), 0.8  $\mu$ l of each gene specific primer mix (5 mM each forward and reverse), and 0.285  $\mu$ l Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Spain). PCR amplifications were carried out with 31 cycles in a DNA thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). The program used was: 94°C for 4 min and cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 60 s, and a final extension at 72°C for 4 min. PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gels (Pronadisa, Madrid, Spain) containing 25 ng/ml ethidium bromide and using the HyperLadder I (Bioline, Randolph, MA) as a molecular weight marker. *CLCN6* gene in BTM cells was amplified by adding 1  $\mu$ l of MgCl<sub>2</sub> (50 mM) to the reaction mixture and using an annealing temperature of 55°C. A tube from the same master mixture containing all reagents but the RTs templates (buffer, dNTPs, CIC-7 or CIC-6 gene specific primer mix and taq polymerase) was amplified and runned in gels as a non-template control.

### Sequencing procedures

For sequencing, amplified cDNA products (200 bp for *CLCN2* and 1000 bp for *CLCN1* to 7) were cut from agarose gel and purified using the Perfectprep Gel Cleanup Kit (Eppendorf, Hamburg, Germany). Excised bands in agarose gel were placed in binding buffer and purified following manufacturer's directions. Cleaned DNA was eluted in 30  $\mu$ l Molecular Biology Grade Water and used as a template to sequence.



The PCR sequencing protocol was performed using the BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Each amplification reaction mixture was prepared in a 20  $\mu$ l reaction mixture including 4  $\mu$ l BigDye Terminator 5X sequencing buffer (100 mM TrisHCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 3.2 pmol of each *CLCN* gene specific forward primer, 4  $\mu$ l BigDye Terminator Cycle sequencing and 6.18 ng (40 ng for 100 bp samples and 10 ng for 200 bp samples) of each template. The sequencing PCR protocol was carried out as follows: 96°C, 3 min and cycles of 96°C for 30 s, 50°C for 15 s, 60°C for 4 min, and a final extension at 60°C for 4 min. The number of amplification cycles was 25 in each PCR reaction. PCR sequenced products were purified using the Big Dye Version 3.1 and following the manufacturer's recommendations. Dry samples of purified sequenced products were runned at DNA Unit (Hospital Universitari CLINIC, Barcelona, Spain). Sequenced results were compared against the entire nucleotide database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> using BLAST comparisons.

### **Measurements of Cell Volume with Calcein Fluorescence**

Changes in the cell water volume were assessed by measuring changes in the intracellular calcein concentration used as a volume indicator as has been described in detail elsewhere (16). BTM cells grown on 3 cm coverslips were loaded with 0.5  $\mu$ M calcein-AM at 37°C for 5 min. After brief harvesting with Trypsin-EDTA (Bio-Whitaker, Barcelona, Spain), coverslips were mounted in a chamber and visualized with a X40 oil-immersion objective lens (Olympus, Barcelona, Spain) on an inverted, epi-fluorescence microscope Olympus IX70. Fields were chosen to contain between one to six nonconfluent cells with comparable dye loading. Using a xenon lamp and a monochromator Polychrome IV (Till Photonics, Munich, Gmbh) adapted to the microscope, calcein was excited every 20 s at 488 nm. Light emitted at 520 nm was detected with a digital coupled device camera (Hamamatsu, Shizuoka, Japan). The total fluorescence from a small central region of fluorophore-loaded single cells was collected. Images were recorded and stored in a PC computer using the AquaCosmos 2.5 Software (Hamamatsu). The fluorescence signal drift resulting from the dye leakage and photobleaching was corrected by fitting a first order exponential decay regression using baseline datapoints from the beginning and the end parts of the experiment and then the signal drift values were subtracted from the record yielding the corrected trace (3, 16). Fluorescence values were normalized with the initial values. To test the osmotic behavior of each cell, steady state changes in fluorescence were measured in response to brief (5 min) exposures to anisotonic solutions in the range between  $\pm$ 13% relative to isotonic solution. We only used the cells that within this range of external osmolarities and exposure times, behaved as perfect osmometers as described (3, 16). Normalized cell water volume changes were computed from monitored changes in relative fluorescence and corrected for background fluorescence as

described (16). The migration and “cat-in-a-bag” phenomena described previously in HTM cells (41) was minimized by addition of 2,3-butanedione 2-monoxime (BDM), an antagonist of actomyosin activity, in the perfusion solutions. Isotonic solution used contained (in mM): 125 NaCl, 5.5 KCl, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 1.25 MgCl<sub>2</sub>, 20 HEPES, 10 dextrose, 20 BDM; pH 7.4 adjusted with NaOH (310±0.7 mOsm/Kg). Hypotonic solution was (in mM): 80 NaCl, 5.5 KCl, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 1.25 MgCl<sub>2</sub>, 20 HEPES, 10 dextrose, 20 BDM; pH 7.4 adjusted with NaOH (185±0.6 mOsm/Kg). 13% hypo/hypertonic test solutions were done from the isotonic solution by reducing NaCl to 105 mM or adding sorbitol to the desired osmolality (271±0.6 and 350±0.5 mOsm/Kg). All experiments were done at room temperature. Chloride channel blockers were added to the bath 3 min before the hypotonic challenge and removed when returning to the isotonic solution.

### Perfusion of Anterior Segments

Eyes from 3 to 6 month-old cows were obtained at the local abattoir 0.5 to 2 h after death and kept in PBS at 4°C for not more than 1.5 h. Isolation and perfusion of bovine anterior segments were performed as previously described (30, 52). Briefly, bovine anterior segments, placed in a specially designed perfusion chamber, were located together with force transducers (Letica, Barcelona, Spain) and the tubing system in an incubator (Selecta, Barcelona, Spain) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Perfusion was carried out at constant pressure with DMEM. The pressure in the artificial anterior chamber was monitored and recorded throughout the experiment with a pressure transducer (9162-0, Mallinckrodt, Northhampton, U.K.) and was kept constant at 10 mmHg with a suspended medium reservoir. Outflow facility ( $C$ ) was averaged during periods of 15 min (mean of 450 data points). Baseline facility ( $C_0$ ) was calculated during the first 90-min period of stable  $C$ . When a different experimental condition or drug was added to the perfusion medium, the tubes and the anterior chamber were flushed and replaced with the new medium. This change was made by rapidly replacing the contents of the artificial anterior chamber by opening the exit needle until 200% of the volume had been exchanged; this exchange was always made at a pressure below 10 mmHg. Recording of  $C$  measurements started after stabilization of flow.

The perfusion procedure was carried out using a protocol with two periods: perfusion with control isotonic DMEM (301±1 mOsm/Kg) for 90 min to establish the  $C_0$ , and perfusion with hypotonic (242±2 mOsm/Kg) DMEM for 360 min to determine changes on outflow facility after two different experimental conditions: hypotonic medium and hypotonic medium + cadmium.

## Data analysis

Data are presented as mean $\pm$ SEM, and were analyzed using paired or unpaired t-tests or by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc tests, using Prism 4.0 software (Graphpad, CA). Two-tailed tests were used, with statistical significance set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Identification of a hyperpolarization-activated chloride current

Whole cell currents were recorded in BTM cells under isotonic conditions in which Cl<sup>-</sup> was the main charge carrier. Recordings from -120 mV to +40 mV in 20 mV voltage steps were applied from a holding potential of 0 mV. A strong hyperpolarization for 30 s to -120 mV was applied prior to the pulse protocol to enhance the currents magnitude, as described elsewhere (7). In these conditions, hyperpolarization-activated chloride currents were detected in BTM cells (Fig 1A). Current measurements at the end of the voltage pulse produced the I-V relationship shown in Figure 1B (left; solid dots). The currents showed a fast instantaneous activation followed by a slow time-dependent activation that was more evident at strong hyperpolarized potentials (Fig 1A). The hyperpolarization-activated Cl<sup>-</sup> currents recorded in BTM cells were similar to inwardly rectifier Cl<sup>-</sup> currents mediated by ClC-2 channels described in different cell types (7, 10, 11, 25, 36). As previously described in T<sub>84</sub> cells (7, 24), these currents were rapidly and reversibly blocked by the addition of Cd<sup>2+</sup> to the bath solution (open dots; n=20;  $p < 0.001$  vs. control). At -120 mV, Cd<sup>2+</sup> application (0.3 mM) significantly inhibited the current by 55% (-24.16 $\pm$ 2.84 to -11.08 $\pm$ 2.34 pA/pF; n=6;  $p < 0.001$ ). The Cd<sup>2+</sup>-sensitive component of the current obtained by subtraction (n=6) showed electrophysiological properties (marked inward rectification, time-dependent activation) similar to the ones described for ClC-2 channels (Fig 1A and B, right). The residual currents still present in the recordings could be part of Cd<sup>2+</sup>-insensitive ClC-2-like currents, but in contrast, did not show inwardly rectification and may be mediated by other unknown channels (Fig 1A, middle).

### Ionic selectivity

The anionic selectivity sequence was determined by replacing the Cl<sup>-</sup> ions in the bath solution by the sodium salts of Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> or F<sup>-</sup> in BTM cells. After a large hyperpolarization (30s, -120 mV) to activate putative ClC-2 currents, voltage ramps (-100 to +100 mV) for each anion were applied. The mean voltage ramp shows the reversal potential ( $V_{rev}$ ) for each anion (Fig 2A-D; mean ramps; SEM omitted for clarity). Cl<sup>-</sup> reversal potential (0.7 $\pm$ 0.3 mV) shifted to more positive values after replacement of this ion by Br<sup>-</sup> (13.2 $\pm$ 1.0 mV), I<sup>-</sup> (22.1 $\pm$ 1.3 mV) and F<sup>-</sup> (35.8 $\pm$ 2.4 mV) (Fig. 2). The relative anion selectivity sequence obtained Cl<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> >

$I^+ F^-$ , was calculated using the Goldman-Hodgkin-Katz equation from the relative anion permeabilities ( $P_x/P_{Cl}$ ) encountered. This selectivity sequence is characteristic for ClC-2 channels as described in different cell types (5, 14, 20, 25) and different from the one obtained for other chloride channels in the same cells (52).

### **Hyperpolarization-activated chloride current in human trabecular meshwork cells**

In human TM cells and using the same protocols, similar voltage-dependent hyperpolarization-activated Cl<sup>-</sup> currents were also detected (Fig 3A and B). The recorded currents showed inwardly rectification and were significantly inhibited by Cd<sup>2+</sup> ( $p < 0.001$ ). At -120 mV, the current magnitude was significantly reduced by 38.6% from  $-18.17 \pm 1.92$  pA/pF ( $n=8$ ; Fig 3B), to  $-11.14 \pm 2.74$  pA/pF in the presence of extracellular Cd<sup>2+</sup> (0.3 mM;  $n=5$ ,  $p < 0.001$ ). Again, the Cd<sup>2+</sup> inhibited currents were isolated by subtraction and showed time-dependent activation (Fig 3A right) as well as marked inwardly rectification (Fig 3B, right).

The anionic selectivity sequence together with the current voltage-dependency, inward rectification and blockade by Cd<sup>2+</sup> clearly suggested that ClC-2 channels mediated these currents as described previously in other cell types (33, 59). To further demonstrate that ClC-2 channels mediate the inwardly rectifying Cl<sup>-</sup> currents identified, the expression of the *CLCN2* gene were further studied by RT-PCR as well as its modulation by different stimuli.

### **Molecular expression of voltage-gated chloride channels in trabecular meshwork cells**

We previously described the presence of several members of the CLC family of Cl<sup>-</sup> channels in HTM cells, including ClC-2 (15). In the present study, we reevaluated ClC-2 expression in the same HTM and BTM cells used in the electrophysiological studies using RT-PCR. In addition, we determined the molecular expression of genes encoding other voltage-gated chloride channels of the CLC family in BTM cells. Intron-spanning primers, corresponding to genes *CLCN1* through *CLCN7* were designed using human sequences as previously described (15). Using these new, different HTM primary cells, we confirmed the presence of transcripts from genes *CLCN2*, *CLCN3*, *CLCN4*, *CLCN5*, *CLCN6* and *CLCN7* (15). Likewise, human transcripts from *CLCN1* gene were not detected (Fig 4, left). When RT-PCR reactions were performed on RNA obtained from BTM cells using human primers and same amplification conditions, transcripts from *CLCN2*, *CLCN5* and *CLCN7* were detected (Fig 4, middle). DNA sequencing by comparing to human sequences successfully verified the bands identity. Since primers were specific to human sequences, PCR conditions were slightly changed to detect the molecular expression of other *CLCN* genes in BTM cells. RT-PCR reactions performed in less stringent conditions revealed faint

bands at the expected molecular weight for *CLCN3*, *CLCN4* and *CLCN6*. After DNA sequencing, only the ClC-6 transcript found at the expected size (1043 bp) matched with the expression of *CLCN6* gene in BTM cells, while the other bands detected for *CLCN3* and *CLCN4* primers were not specific to any CLC channel (Fig 4, right). No ClC-1 transcripts were detected either in human or bovine TM cells.

### Modulation of ClC-2 currents by pH, cAMP and cell swelling

Since ClC-2 channels appear to be modulated by external pH (5, 14, 34), we evaluated whether pH changes in the extracellular solution modulated ClC-2 currents in TM cells.

ClC-2 currents were recorded in BTM cells at physiological (7.4), acidic (6.9) and basic pH (8.0). At physiological pH, the current amplitude activated at -120 mV was  $-18.5 \pm 3.4$  pA/pF (n=6) as shown in Fig 5A. Extracellular acidification significantly enhanced ClC-2 currents by  $42.7 \pm 14\%$  at -120 mV (n=5;  $p < 0.001$ ) as shown in the I-V relationship ( $p < 0.001$  vs. pH 7.4; two-way ANOVA) (Fig. 5A). In contrast, ClC-2 currents decreased significantly by extracellular alkalization ( $p < 0.001$ ; Fig. 5A) showing a  $24.2 \pm 9\%$  reduction in the current measured at -120 mV (n=4;  $p < 0.01$ ).

In addition to pH modulation, it has been postulated that ClC-2 channels are also activated by protein kinase A (PKA) (17). We tested this possibility in whole cell patch clamp experiments in the presence of a membrane permeable cAMP analog (8Br-cAMP; 100  $\mu$ M). After recording ClC-2 currents in control conditions (as previous experiments), 8Br-cAMP was added to the bath and recordings were performed 10 min later. In the presence of the cAMP analog, ClC-2 currents increased in the whole voltage range compared with the control (Fig 5B;  $p < 0.001$ ; two-way ANOVA). ClC-2 currents increased by  $51.3 \pm 18\%$  at -120 mV (n=5;  $p < 0.001$ ).

Finally, ClC-2 channels have been also involved in cell volume regulation due to their modulation by cell swelling (25, 51, 64). We explored these effects by recording ClC-2 whole cell currents in isotonic conditions as previously described, and after swelling of the cells with a hypotonic solution. As shown in Fig 5C, when a hypotonic stimulus was applied, ClC-2 currents increased significantly within 4 min in the whole voltage range, reaching a maximum between 8-10 min ( $p < 0.001$ , two-way ANOVA vs. isotonic). At -120 mV, currents increased by  $59 \pm 6\%$  (from  $-19.6 \pm 2.3$  to  $-30.7 \pm 3.3$  pA/pF;  $p < 0.001$ ; n=8). Fig 5C (left) shows a typical recording at -120 mV in isotonic and hypotonic conditions.

### Participation of chloride channels in cell volume regulation

Since cellular volume has been shown as an important determinant of aqueous humor outflow (2, 30, 52) and CIC-2 currents appear to be regulated by cell swelling, we evaluated the participation of CIC-2 channels in a RVD mechanism and in the modulation of aqueous humor outflow.

In order to study the RVD mechanism of BTM cells and determine which chloride currents are involved in the former, we loaded cells with calcein and used a similar experimental protocol to the one described by Mitchell et al. (41). Briefly, we first monitored calcein fluorescence as an indication of cell volume (see Methods) in isotonic solution during 5 min to establish the initial baseline volume before any osmotic challenge. Then, 40% hypotonic solution was used to increase cellular volume, triggering a RVD mechanism toward the resting volume. In control experiments, cells exhibited a  $21\pm 3\%$  of RVD after 25 min ( $n=16$ ; Fig 6A *top* and 6B). After the hypotonic shock, when the bath solution was replaced by an isotonic one, cell volume returned past the initial baseline and slowly increased to recover resting values as described elsewhere (3). To test the relative contribution of CIC-2 channels in the RVD process, we monitored cell volume changes in response to the same osmotic challenge but in the presence of the CIC-2 channel blocker  $\text{Cd}^{2+}$  (0.3 mM). In these conditions the  $26\pm 4\%$  RVD observed was not significantly different from the control ( $n=13$ ;  $p=0.24$ ; Fig 6A *middle* and 6B). Interestingly, the rebound effect when returning to isotonic conditions appeared greater compared with the control, suggesting that either CIC-2 blockade is actually improving the RVD or that  $\text{Cd}^{2+}$  has some unspecific effects.

Since swelling-activated  $\text{Cl}^-$  channels ( $\text{Cl}_{\text{swell}}$ ) have also been involved in the RVD mechanism in TM cells (41, 52, 53), we tested a blocker of these channels, tamoxifen (5  $\mu\text{M}$ ), to evaluate their participation in the recovery of cell volume. In the presence of tamoxifen, almost no cell volume recovery was seen ( $3\pm 2\%$ ;  $n=10$ ; Fig 6A *bottom* and 6B;  $p<0.001$  vs. control). These results suggest that although the CIC-2 currents are modulated by hypotonic cell swelling, this channel does not appear to participate in the RVD mechanism in TM cells. In contrast,  $\text{Cl}_{\text{swell}}$  seems to be involved in the RVD mechanism.

### Participation of RVD mechanisms on outflow facility modulation

We previously described the involvement of  $\text{Cl}_{\text{swell}}$  and high-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) in outflow facility modulation (52). In this sense, in perfused anterior segments after hypotonic shock, outflow facility abruptly decreases, slowly recovering to baseline values (52). In Fig 7A and for comparative purposes, we replotted the control experiments performed in the previous paper (52). Empty circles ( $\circ$ ;  $n=6$ ) show anterior segments perfused for 90 min with isotonic medium to establish baseline outflow facility. Then, perfusion

medium was exchanged by a hypotonic one and maintained during 360 min. After 15 min in hypotonic medium, outflow facility ratio decreased to  $0.801 \pm 0.019$  ( $p < 0.001$  vs. isotonic baseline; Fig 7) and gradually recovered baseline values to  $1.035 \pm 0.021$  at 360 min. In contrast to previous results where  $BK_{Ca}$  and  $Cl_{swell}$  blockers impaired outflow facility recovery after hypotonic shock (52), addition of the ClC-2 blocker  $Cd^{2+}$  (0.3 mM) to the perfusion medium did not induce significant effects compared with the control (Fig 7A and B). No differences were found either in the initial drop in outflow facility ( $0.787 \pm 0.029$ ) or in the recovery phase. Only at the end of the protocol, a small but significant increase in outflow facility was seen after 360 min of perfusion compared with the perfusion in the absence of the blocker ( $1.107 \pm 0.063$   $p < 0.05$ ; Fig 7B). Finally, as a control, we tested whether in isotonic conditions, addition of  $Cd^{2+}$  to the perfusion medium modified outflow facility. After a baseline period, 0.3 mM  $Cd^{2+}$  did not produce any significant effect on outflow facility even after 90 min in the presence of this compound (data not shown). Washing out the drug for 90 more minutes did not produced any changes in outflow facility either.

## DISCUSSION

In the present study we have identified ClC-2 channels as mediators of hyperpolarization-activated inwardly rectifier chloride currents present in TM cells. We studied their modulation by different stimuli and finally addressed whether these currents are important for volume regulatory mechanisms present in TM cells.

In the last few years, our groups as well as others have identified several anionic channels in TM cells (41, 52, 53), especially from the CLC family of voltage-dependent chloride channels (15, 53). In particular, we reported that HTM cells express ClC-2 to -7 chloride channels, while ClC-1 was not found (15). Because ClC-2 expression in HTM cells was found to be the highest among all the CLC chloride channels assayed, it appears reasonable to hypothesize that this channel might play an important role in TM cell function. Our results here show that ClC-2 channels are also expressed in bovine TM cells (Fig 4) and their electrophysiological characteristics appear to be similar to their counterparts in human cells (Figs. 1 and 2).

The properties of the ClC-2 currents found in TM cells are similar to other ClC-2 currents such as those recorded in pancreatic acinar cells (10), osteoblastic cells (13), sympathetic neurons (14), colonic and  $T_{84}$  epithelial cells (7, 11) or *Aplysia* neurons (12). ClC-2 currents exhibit inward rectification and an activation threshold within the range observed for those currents in other cells. Among the different chloride channel blockers described,  $Cd^{2+}$  appears to block only ClC-2 currents (7, 14, 24) and, in agreement with these studies, we also found a significant reduction of ClC-2 currents in the presence  $Cd^{2+}$ . Moreover, currents obtained by subtraction showed typical exponential activation of ClC-2

channels that was more evident at very hyperpolarized potentials, which is another evidence of the identity of these currents.

The anionic permeability sequence obtained in this study ( $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$ ) was in general agreement with the one described for other CIC-2 channels (10, 14, 25, 29). Nevertheless, other reports found slightly different permeability sequences for CIC-2 channels (35, 58). In our experiments, chloride was the major anion in the solutions to avoid contamination from other currents and we did not include ATP or GTP in the pipette intracellular solution, to minimize a possible activation of  $\text{Cl}_{\text{swell}}$  currents present in TM cells (41, 52). The electrophysiological data presented here correlates nicely with the CIC-2 mRNA expression found in human and bovine TM cells (Fig 4), thus we can conclude that TM cells express functional CIC-2 channels.

To understand the role of CIC-2 channels in TM cells, we studied their modulation by different stimuli. As described for other cell types (5, 14, 34), we found that CIC-2 currents were modified by changes in extracellular pH, increasing their amplitude with acidic pH, while basic pH induced the opposite effect. Extracellular protonation of the channel residue E217 appears to facilitate the CIC-2 activation but opening of the channel by hyperpolarization is previously required (45). Interestingly, only weak acidic pH values activate the channel, while unphysiological acidic pH values decrease its open probability (4). The exact function of the CIC-2 and this pH sensitivity remains still unknown, but CIC-2 channel disruption produces degeneration of photoreceptors and germ cells, probably due to the absence of ionic homeostasis in the cleft between these cells and retinal pigment epithelial or Sertoli cells, respectively (9). The acid load on these clefts after transepithelial transport of lactate may be compensated by  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchangers and  $\text{Cl}^-$  recycling through CIC-2 channels (9). Since lactate is between 6 to 9-times more concentrated in the aqueous humor than in plasma (6), it is possible to speculate that CIC-2 channels may contribute in the pH regulation of the TM.

8Br-cAMP, a membrane permeable cAMP analog, increased CIC-2 currents in TM cells (Fig 5) similarly to other studies where phosphorylation of CIC-2 channels by PKA appears to regulate CIC-2 activation (17). In the TM, substances that signal through the cAMP-PKA pathway have been studied due to their enhancing effect on aqueous humor outflow (21, 27, 37). These drugs, increasing cAMP intracellular concentration, may regulate several effectors, including ionic channels like inward rectifier  $\text{K}^+$  channels (38) or CIC-2 channels, thus contributing somehow to the effect on outflow facility.

It is well known that CIC-2 currents can be modulated by an increase of the  $[\text{Cl}]_i$  (12, 24, 48), shifting the channel activation to more positive voltages (11, 48). As a consequence, it has been proposed that CIC-2 channels may be involved in the regulation of  $\text{Cl}^-$  concentration inside the cell, allowing a passive efflux of this anion when it exceeds its electrochemical equilibrium. This role may be important in several epithelia where they would contribute to the transepithelial



transport working together with cotransporters (32). Interestingly, in TM cells,  $[Cl^-]_i$  is able not only to modulate ClC-2 channels, but also the Na/K/2Cl cotransporter which participates in cell volume regulatory mechanisms (50). In fact,  $[Cl^-]_i$  appears to be an important determinant of cellular volume and has been proposed as the signal that coordinates  $Cl^-$  efflux (through  $Cl^-$  channels) and influx (through the Na/K/2Cl cotransporter) to regulate intracellular volume recovery as well as resting cell volume (50). It has been found that the Na/K/2Cl cotransporter expression and functionality were reduced in glaucomatous TM cells (49). Moreover, ClC-2 expression was reduced in TM cells after dexamethasone treatment (15) that is known to produce steroid-induced glaucoma. Since both systems are modulated by  $[Cl^-]_i$ , alterations in their expression or function may contribute to  $[Cl^-]_i$  deregulation and therefore, to an increased volume found in glaucomatous cells (49), likely to reduce TM permeability (2, 30, 52).

Finally, we found that hypotonicity-induced cell swelling significantly increased ClC-2 currents in TM cells (Fig 5). Other authors previously described the swelling sensitivity of ClC-2 currents (7, 9) and hypothesized that it may be involved in cell volume regulation (29). Although some studies involved ClC-2 channels in the RVD mechanism after cell swelling (22, 51, 64), others have not found significant RVD impairment after blocking the ClC-2 channels (7) or deleting them (44). Our results obtained by blocking ClC-2 currents with  $Cd^{2+}$  showed that ClC-2 had no effect on RVD in the TM cells. These experiments are in agreement with previous studies (7, 44), suggesting that ClC-2 does not have a major role in volume regulation after cell swelling while the major contributor to  $Cl^-$  efflux is  $Cl_{swell}$  as proposed in TM cells (23, 41, 52, 53).

Previously, we showed that trabecular outflow facility decreases after a hypotonic shock and blockers of  $Cl_{swell}$  and  $BK_{Ca}$  channels greatly impaired outflow facility recovery (52). In agreement with the cell volume experiments, ClC-2 channels block by addition of  $Cd^{2+}$  to the perfusion medium did not modify neither the initial fall in outflow facility due to the hypotonic shock, nor the recovery phase towards the baseline level. These results reinforce the evidence that ClC-2 channels are not involved in RVD mechanisms.

Due to its wide distribution and modulation by different stimuli, several functions have been proposed for ClC-2 channels in different cell types (32). Some of these proposed functions have been discussed in previous paragraphs. In neurons, ClC-2 may influence GABA responses due to the regulation of  $[Cl^-]_i$ , enhancing neuronal excitability (54). In fact, mutations in the ClC-2 gene have been found in epileptic patients (31). In the TM, cellular excitability may also be important to regulate the contractile tone, which has been linked to outflow facility modulation (63). Despite the finding of benzodiazepine receptors in the TM (66), their function in this tissue is unknown and we have not explored whether ClC-2 channels may modulate GABA responses or cellular excitability. In our studies, ClC-2 appears not to be involved in RVD mechanisms, but those results do not exclude the possibility that ClC-2 mediates changes in cell volume in response to

agonists that increase cAMP. It is possible that agonist-induced cAMP elevations activate CIC-2 channels as well as other ionic channels (likely  $K^+$  channels) causing TM cells to shrink, thus increasing aqueous humor outflow. This mechanism has yet to be investigated, but it has been shown already that agonists or drugs known to increase trabecular outflow facility elevate cAMP and induce cell shrinkage (53). Moreover, adenosine receptor agonists induced similar effects on cell volume but the intracellular pathways that mediate those effects are still unclear (23). Interestingly, the actin cytoskeleton regulates CIC-2 function by electrostatic interactions in the N-terminus of the channel and cytoskeleton disrupting agents such as cytochalasins or latrunculins enhance CIC-2 currents (1). Since these compounds are also known to increase outflow facility (60), it is possible that CIC-2 contributes to these actions by inducing a shrinkage-like effect due to the cytoskeleton disruption.

Finally, in our previous paper (15) we found that CIC-2 is a member of the CLC family highly expressed in human TM cells and that its expression is modified after exposure to different stimuli such as cell swelling or elevated intraocular pressure. Others have shown that CIC-2 expression is subject to regulation by hormones that modulate  $Cl^-$  transport in the kidney (42, 43, 47). Similar modulation may also be possible in the eye and needs further study.

In summary, we have characterized CIC-2 channels in human and bovine TM cells, showing that these channels are modulated by several different stimuli. Elucidation of CIC-2 functions and regulation in the TM requires further investigation to understand its roles in the trabecular meshwork physiology and aqueous humor outflow regulation.

**Grants:** Work supported by BFI2002-01202, BFI2003-01190, PI031495, Spain; EY13126 and EY11906 (TB).

## REFERENCES

1. **Ahmed N, Ramjeesingh M, Wong S, Varga A, Garami E, and Bear CE.** Chloride channel activity of ClC-2 is modified by the actin cytoskeleton. *Biochem J* 352 Pt 3: 789-794, 2000.
2. **Al-Aswad LA, Gong H, Lee D, O'Donnell ME, Brandt JD, Ryan WJ, Schroeder A, and Erickson KA.** Effects of Na-K-2Cl cotransport regulators on outflow facility in calf and human eyes in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1695-1701, 1999.
3. **Altamirano J, Brodwick MS, and Alvarez-Leefmans FJ.** Regulatory volume decrease and intracellular Ca<sup>2+</sup> in murine neuroblastoma cells studied with fluorescent probes. *J Gen Physiol* 112: 145-160, 1998.
4. **Arreola J, Begenisich T, and Melvin JE.** Conformation-dependent regulation of inward rectifier chloride channel gating by extracellular protons. *J Physiol* 541: 103-112, 2002.
5. **Auzanneau C, Thoreau V, Kitzis A, and Becq F.** A Novel voltage-dependent chloride current activated by extracellular acidic pH in cultured rat Sertoli cells. *J Biol Chem* 278: 19230-19236, 2003.
6. **Berman ER.** 4. Aqueous, Iris-Ciliary Body, and Trabeculum. In: *Biochemistry of the eye* (1st ed.), edited by Berman ER. New York: Plenum Press, 1991.
7. **Bond TD, Ambikapathy S, Mohammad S, and Valverde MA.** Osmosensitive Cl<sup>-</sup> currents and their relevance to regulatory volume decrease in human intestinal T84 cells: outwardly vs. inwardly rectifying currents. *J Physiol* 511 (Pt 1): 45-54, 1998.
8. **Borrás T.** Gene expression in the trabecular meshwork and the influence of intraocular pressure. *Prog Retin Eye Res* 22: 435-463, 2003.
9. **Bösl MR, Stein V, Hubner C, Zdebik AA, Jordt SE, Mukhopadhyay AK, Davidoff MS, Holstein AF, and Jentsch TJ.** Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl<sup>-</sup> channel disruption. *Embo J* 20: 1289-1299, 2001.
10. **Carew MA and Thorn P.** Identification of ClC-2-like chloride currents in pig pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch* 433: 84-90, 1996.
11. **Catalan M, Niemeyer MI, Cid LP, and Sepulveda FV.** Basolateral ClC-2 chloride channels in surface colon epithelium: regulation by a direct effect of intracellular chloride. *Gastroenterology* 126: 1104-1114, 2004.

12. **Chesnoy-Marchais D.** Characterization of a chloride conductance activated by hyperpolarization in *Aplysia* neurones. *J Physiol* 342: 277-308, 1983.
13. **Chesnoy-Marchais D and Fritsch J.** Activation of hyperpolarization and atypical osmosensitivity of a Cl<sup>-</sup> current in rat osteoblastic cells. *J Membr Biol* 140: 173-188, 1994.
14. **Clark S, Jordt SE, Jentsch TJ, and Mathie A.** Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J Physiol* 506 (Pt 3): 665-678, 1998.
15. **Comes N, Gasull X, Gual A, and Borrás T.** Differential expression of the human chloride channel genes in the trabecular meshwork under stress conditions. *Exp Eye Res* 80: 801-813, 2005.
16. **Crowe WE, Altamirano J, Huerto L, and Alvarez-Leefmans FJ.** Volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe. *Neuroscience* 69: 283-296, 1995.
17. **Cuppoletti J, Tewari KP, Sherry AM, Ferrante CJ, and Malinowska DH.** Sites of protein kinase A activation of the human ClC-2 Cl<sup>-</sup> channel. *J Biol Chem* 279: 21849-21856, 2004.
18. **Do CW, Lu W, Mitchell CH, and Civan MM.** Inhibition of swelling-activated Cl<sup>-</sup> currents by functional anti-ClC-3 antibody in native bovine non-pigmented ciliary epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 948-955, 2005.
19. **Duan D, Winter C, Cowley S, Hume JR, and Horowitz B.** Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 390: 417-421, 1997.
20. **Duan D, Ye L, Britton F, Horowitz B, and Hume JR.** A novel anionic inward rectifier in native cardiac myocytes. *Circ Res* 86: E63-71, 2000.
21. **Erickson-Lamy KA and Nathanson JA.** Epinephrine increases facility of outflow and cyclic AMP content in the human eye in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 2672-2678, 1992.
22. **Ernest NJ, Weaver AK, Van Duyn LB, and Sontheimer HW.** Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C1451-1460, 2005.
23. **Fleischhauer JC, Mitchell CH, Stamer WD, Karl MO, Peterson-Yantorno K, and Civan MM.** Common actions of adenosine receptor agonists in modulating human trabecular meshwork cell transport. *J Membr Biol* 193: 121-136, 2003.

24. **Fritsch J and Edelman A.** Modulation of the hyperpolarization-activated Cl<sup>-</sup> current in human intestinal T84 epithelial cells by phosphorylation. *J Physiol* 490 (Pt 1): 115-128, 1996.
25. **Furukawa T, Ogura T, Katayama Y, and Hiraoka M.** Characteristics of rabbit ClC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *Am J Physiol* 274: C500-512, 1998.
26. **Gasull X, Ferrer E, Llobet A, Castellano A, Nicolas JM, Palés J, and Gual A.** Cell membrane stretch modulates the high-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in bovine trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 706-714, 2003.
27. **Gilabert R, Gasull X, Palés J, Belmonte C, Bergamini MV, and Gual A.** Facility changes mediated by cAMP in the bovine anterior segment in vitro. *Vision Res* 37: 9-15, 1997.
28. **Gonzalez P, Epstein DL, and Borrás T.** Genes upregulated in the human trabecular meshwork in response to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 352-361, 2000.
29. **Gründer S, Thiemann A, Pusch M, and Jentsch TJ.** Regions involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360: 759-762, 1992.
30. **Gual A, Llobet A, Gilabert R, Borrás M, Palés J, Bergamini MV, and Belmonte C.** Effects of time of storage, albumin, and osmolality changes on outflow facility (C) of bovine anterior segment in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2165-2171, 1997.
31. **Haug K, Warnstedt M, Alekov AK, Sander T, Ramirez A, Poser B, Maljevic S, Hebeisen S, Kubisch C, Rebstock J, Horvath S, Hallmann K, Dullinger JS, Rau B, Haverkamp F, Beyenburg S, Schulz H, Janz D, Giese B, Muller-Newen G, Propping P, Elger CE, Fahlke C, Lerche H, and Heils A.** Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat Genet* 33: 527-532, 2003.
32. **Jentsch TJ, Poet M, Fuhrmann JC, and Zdebik AA.** Physiological functions of CLC Cl<sup>-</sup> channels gleaned from human genetic disease and mouse models. *Annu Rev Physiol* 67: 779-807, 2005.
33. **Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, and Zdebik AA.** Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82: 503-568, 2002.
34. **Jordt SE and Jentsch TJ.** Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *Embo J* 16: 1582-1592, 1997.

35. **Kajita H and Brown PD.** Inhibition of the inward-rectifying Cl<sup>-</sup> channel in rat choroid plexus by a decrease in extracellular pH. *J Physiol* 498 (Pt 3): 703-707, 1997.
36. **Kajita H, Omori K, and Matsuda H.** The chloride channel ClC-2 contributes to the inwardly rectifying Cl<sup>-</sup> conductance in cultured porcine choroid plexus epithelial cells. *J Physiol* 523 Pt 2: 313-324, 2000.
37. **Karnezis TA, Tripathi BJ, Dawson G, Murphy MB, and Tripathi RC.** Effects of dopamine receptor activation on the level of cyclic AMP in the trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30: 1090-1094, 1989.
38. **Llobet A, Gasull X, Palés J, Marti E, and Gual A.** Identification of Kir2.1 channel activity in cultured trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2371-2379, 2001.
39. **Llobet A, Gual A, Palés J, Barraquer R, Tobias E, and Nicolas JM.** Bradykinin decreases outflow facility in perfused anterior segments and induces shape changes in passaged BTM cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 113-125, 1999.
40. **Miles EW, Rhee S, and Davies DR.** The molecular basis of substrate channeling. *J Biol Chem* 274: 12193-12196, 1999.
41. **Mitchell CH, Fleischhauer JC, Stamer WD, Peterson-Yantorno K, and Civan MM.** Human trabecular meshwork cell volume regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C315-326, 2002.
42. **Morales MM, Nascimento DS, Capella MA, Lopes AG, and Guggino WB.** Arginine vasopressin regulates CFTR and ClC-2 mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *Pflugers Arch* 443: 202-211, 2001.
43. **Nascimento DS, Reis CU, Goldenberg RC, Ortiga-Carvalho TM, Pazos-Moura CC, Guggino SE, Guggino WB, and Morales MM.** Estrogen modulates ClC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflugers Arch* 446: 593-599, 2003.
44. **Nehrke K, Arreola J, Nguyen HV, Pilato J, Richardson L, Okunade G, Baggs R, Shull GE, and Melvin JE.** Loss of hyperpolarization-activated Cl<sup>(-)</sup> current in salivary acinar cells from Clcn2 knockout mice. *J Biol Chem* 277: 23604-23611, 2002.
45. **Niemeyer MI, Cid LP, Zuniga L, Catalan M, and Sepulveda FV.** A conserved pore-lining glutamate as a voltage- and chloride-dependent gate in the ClC-2 chloride channel. *J Physiol* 553: 873-879, 2003.

46. **O'Donnell ME, Brandt JD, and Curry FR.** Na-K-Cl cotransport regulates intracellular volume and monolayer permeability of trabecular meshwork cells. *Am J Physiol* 268: C1067-1074, 1995.
47. **Ornellas DS, Nascimento DS, Christoph DH, Guggino WB, and Morales MM.** Aldosterone and high-NaCl diet modulate ClC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflugers Arch* 444: 193-201, 2002.
48. **Pusch M, Jordt SE, Stein V, and Jentsch TJ.** Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J Physiol* 515 (Pt 2): 341-353, 1999.
49. **Putney LK, Brandt JD, and O'Donnell ME.** Na-K-Cl cotransport in normal and glaucomatous human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 425-434, 1999.
50. **Putney LK, Vibat CR, and O'Donnell ME.** Intracellular Cl regulates Na-K-Cl cotransport activity in human trabecular meshwork cells. *Am J Physiol* 277: C373-383, 1999.
51. **Roman RM, Smith RL, Feranchak AP, Clayton GH, Doctor RB, and Fitz JG.** ClC-2 chloride channels contribute to HTC cell volume homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G344-353, 2001.
52. **Soto D, Comes N, Ferrer E, Morales M, Escalada A, Palés J, Solsona C, Gual A, and Gasull X.** Modulation of aqueous humor outflow by ionic mechanisms involved in trabecular meshwork cell volume regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 3650-3661, 2004.
53. **Srinivas SP, Maertens C, Goon LH, Goon L, Satpathy M, Yue BY, Droogmans G, and Nilius B.** Cell volume response to hyposmotic shock and elevated cAMP in bovine trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 78: 15-26, 2004.
54. **Staley K, Smith R, Schaack J, Wilcox C, and Jentsch TJ.** Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the ClC-2 chloride channel. *Neuron* 17: 543-551, 1996.
55. **Stamer WD, Seftor RE, Williams SK, Samaha HA, and Snyder RW.** Isolation and culture of human trabecular meshwork cells by extracellular matrix digestion. *Curr Eye Res* 14: 611-617, 1995.
56. **Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, Engel D, Schweizer M, Zdebik AA, Bösl MR, Ruether K, Jahn H, Draguhn A, Jahn R, and Jentsch TJ.** Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* 29: 185-196, 2001.

57. **Strange K.** Of mice and worms: novel insights into ClC-2 anion channel physiology. *News Physiol Sci* 17: 11-16, 2002.
58. **Tarran R, Argent BE, and Gray MA.** Regulation of a hyperpolarization-activated chloride current in murine respiratory ciliated cells. *J Physiol* 524 Pt 2: 353-364, 2000.
59. **Thiemann A, Gründer S, Pusch M, and Jentsch TJ.** A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356: 57-60, 1992.
60. **Tian B, Geiger B, Epstein DL, and Kaufman PL.** Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 619-623, 2000.
61. **Wax MB, Tezel G, Kobayashi S, and Hernández MR.** Responses of different cell lines from ocular tissues to elevated hydrostatic pressure. *Br J Ophthalmol* 84: 423-428, 2000.
62. **Weylandt KH, Valverde MA, Nobles M, Raguz S, Amey JS, Diaz M, Nastrucci C, Higgins CF, and Sardini A.** Human ClC-3 is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation. *J Biol Chem* 276: 17461-17467, 2001.
63. **Wiederholt M, Thieme H, and Stumpff F.** The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Prog Retin Eye Res* 19: 271-295, 2000.
64. **Xiong H, Li C, Garami E, Wang Y, Ramjeesingh M, Galley K, and Bear CE.** ClC-2 activation modulates regulatory volume decrease. *J Membr Biol* 167: 215-221, 1999.
65. **Yue BY.** The extracellular matrix and its modulation in the trabecular meshwork. *Surv Ophthalmol* 40: 379-390, 1996.
66. **Zarbin MA and Anholt RR.** Benzodiazepine receptors in the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 2579-2587, 1991.



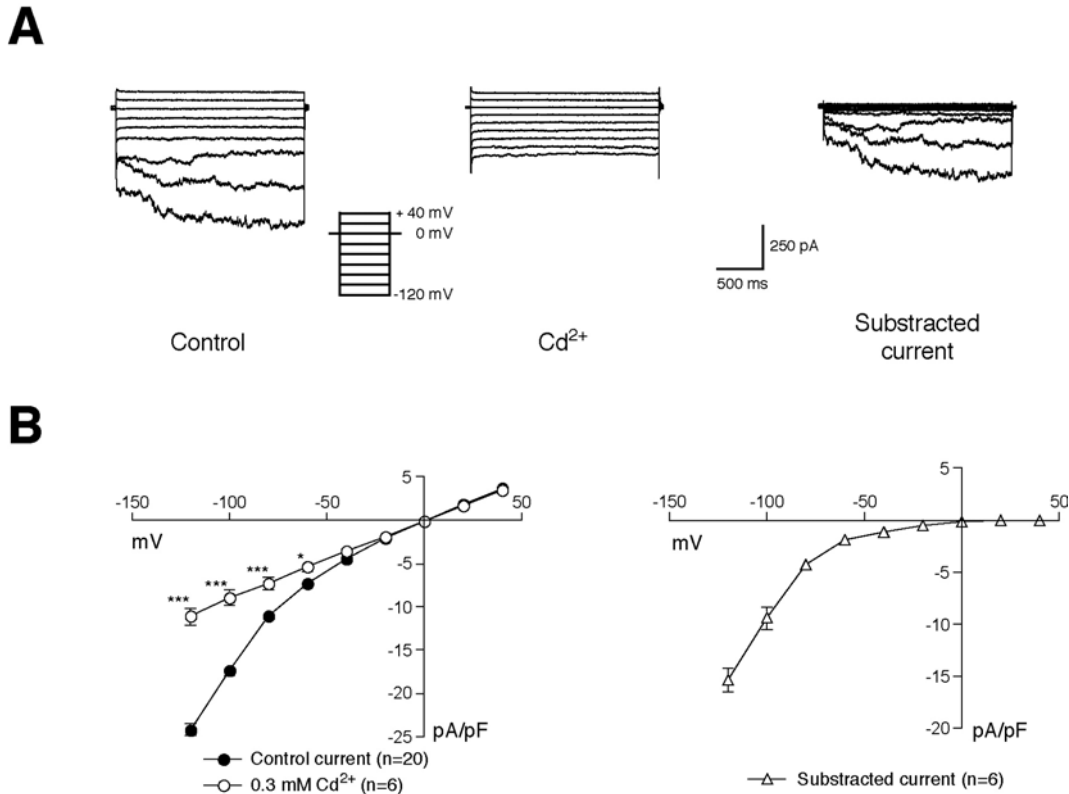


Fig 1

**Figure 1** Activation and Cd<sup>2+</sup> sensitivity of hyperpolarization-activated chloride currents in bovine trabecular meshwork cells. **A.** Representative experiment. Cell was held at -120 mV for 30 s (not shown) and then a voltage protocol of 20 mV steps from -120 to +40 mV were applied (left; control). Bath application of 0.3 mM Cd<sup>2+</sup> blocked most of the currents (middle). Cd<sup>2+</sup>-sensitive currents obtained by subtraction between the currents activated before and after Cd<sup>2+</sup> addition (right). **B. Left:** Normalized current-voltage curves of the currents recorded using the whole-cell configuration. (●) Control currents recorded as described in A (Mean±SEM; n=20); (○): 0.3 mM of Cd<sup>2+</sup> (n=6). Currents were normalized with cell capacitance (current density; pA/pF). Statistical differences were seen between control I-V curve and in the presence of Cd<sup>2+</sup> (ANOVA, p<0.001). \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 control vs. 0.3 mM of Cd<sup>2+</sup> (Bonferroni posttests). **Right:** Normalized current-voltage curve showing inwardly rectifying Cd<sup>2+</sup>-sensitive currents obtained by subtraction (n=6). Data is plotted as current density (pA/pF).

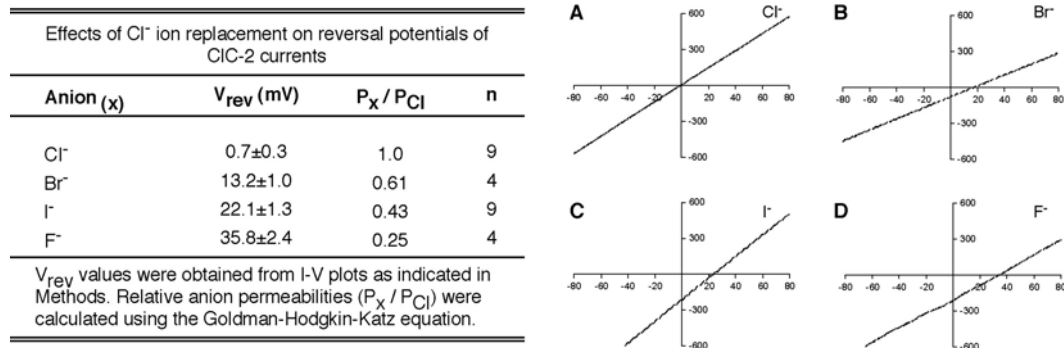


Fig 2

**Figure 2** Effect of Cl<sup>-</sup> ion replacement on reversal potential of CIC-2 currents. *Left*: Reversal potential (mean±SEM), relative permeability and number of experiments for each anion. *Right*: mean recordings in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique for Cl<sup>-</sup> (A), Br<sup>-</sup> (B), I<sup>-</sup> (C) and F<sup>-</sup> (D). SEM was omitted for clarity. Voltage ramps were recorded after holding the cells at -120 mV for 30 s (not shown) in extracellular solution containing Cl<sup>-</sup> or in solutions where Cl<sup>-</sup> had been replaced by each anion.

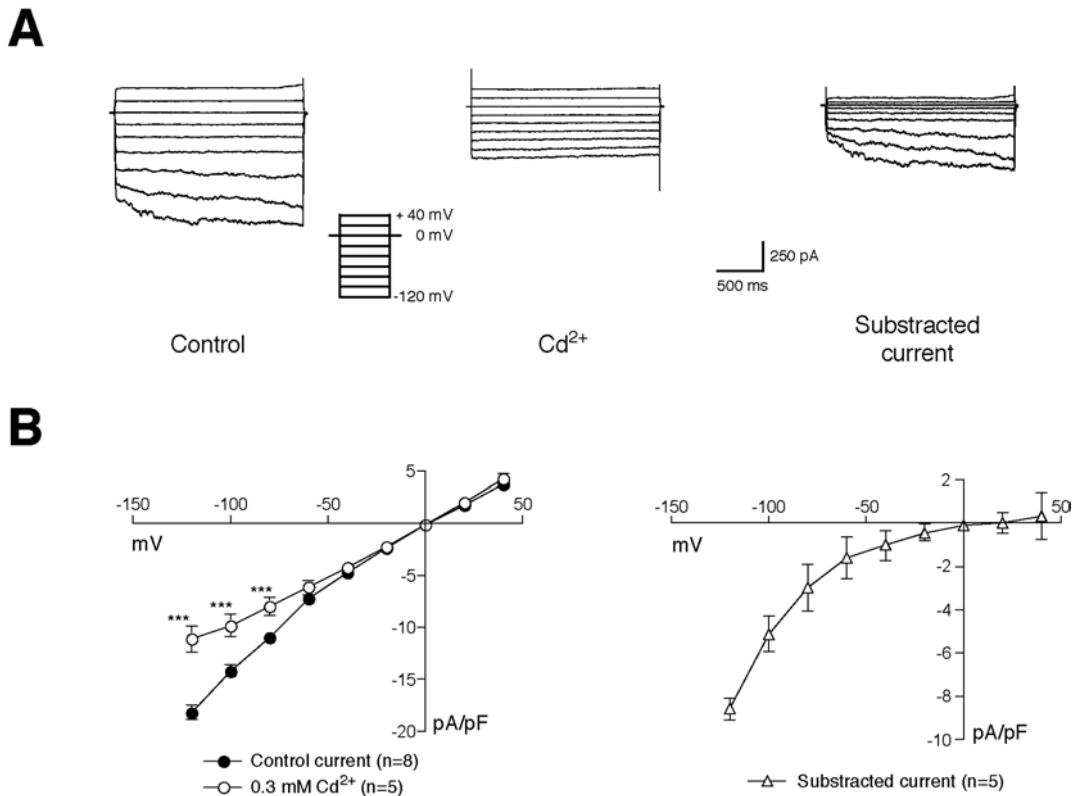


Fig 3

**Figure 3** Activation and Cd<sup>2+</sup> sensitivity of hyperpolarization-activated chloride currents in human trabecular meshwork cells. **A.** Representative experiment. Cell was held at -120 mV for 30 s (not shown) and then a voltage protocol of 20 mV steps from -120 to +40 mV were applied (left; control). Bath application of 0.3 mM Cd<sup>2+</sup> blocked most of the currents (middle). Cd<sup>2+</sup>-sensitive currents obtained by subtraction of the currents activated before and after Cd<sup>2+</sup> addition (right). **B. Left.** Normalized current-voltage curves of the currents recorded using the whole-cell configuration. (●) Control currents recorded as described in A (Mean±SEM; n=8); (○): 0.3 mM of Cd<sup>2+</sup> (n=5). Currents were normalized with cell capacitance (current density; pA/pF). Statistical differences were seen between control I-V curve and in the presence of Cd<sup>2+</sup> (ANOVA, p<0.0001). \*\*\*p<0.001 control vs. 0.3 mM of Cd<sup>2+</sup> (Bonferroni posttests). **Right.** Normalized current-voltage curve showing inwardly rectifying Cd<sup>2+</sup>-sensitive currents obtained by subtraction (n=5). Data is plotted as current density (pA/pF).

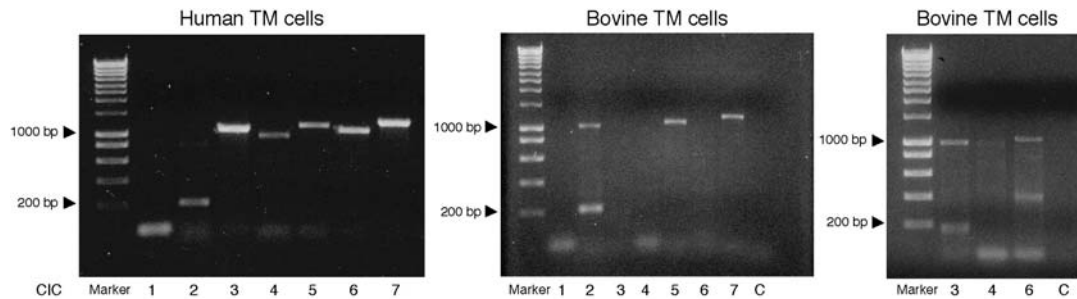


Fig 4

**Figure 4** Voltage-gated chloride channels mRNA expression in human (HTM) and bovine (BTM) trabecular meshwork cells. *Left.* Representative gel showing RT-PCR products amplified using specific, intron-spanning CIC-1 to CIC-7 primers in HTM cells. Amplified transcripts were of the expected size for these primers indicated. The identity of all PCR products was determined by DNA sequencing. All channels but CIC-1 were expressed in HTM cells (lanes 1-7). PCR products were run on 1.5% agarose gel using HyperLadder I molecular weight marker (Marker). *Middle.* Representative gel showing RT-PCR products obtained from BTM cells with the primers designed using human sequences. Transcripts for CIC-2, CIC-5, and CIC-7 were present while CIC-1, CIC-3, CIC-4 and CIC-6 mRNAs were not detected using the same PCR conditions as in HTM cells. The identity of the products was confirmed by DNA sequence analysis. Absence of amplified product in the PCR reaction using CIC-7 specific primer without template excluded the possibility of contamination (lane C). *Right.* Representative gel showing the products detected in BTM cells using CIC-3, CIC-4 and CIC-6 specific primers in a PCR reaction using a 55 °C of annealing temperature and 1  $\mu$ l of MgCl<sub>2</sub>. All the fragments were analyzed by DNA sequencing. The expression of CIC-6 transcript was detected in the fragment with an expected size indicated by an arrow (1043 bp) while the other fragments were attributable to nonspecific amplification. Negative control using CIC-6 specific primer was performed without template (lane C).

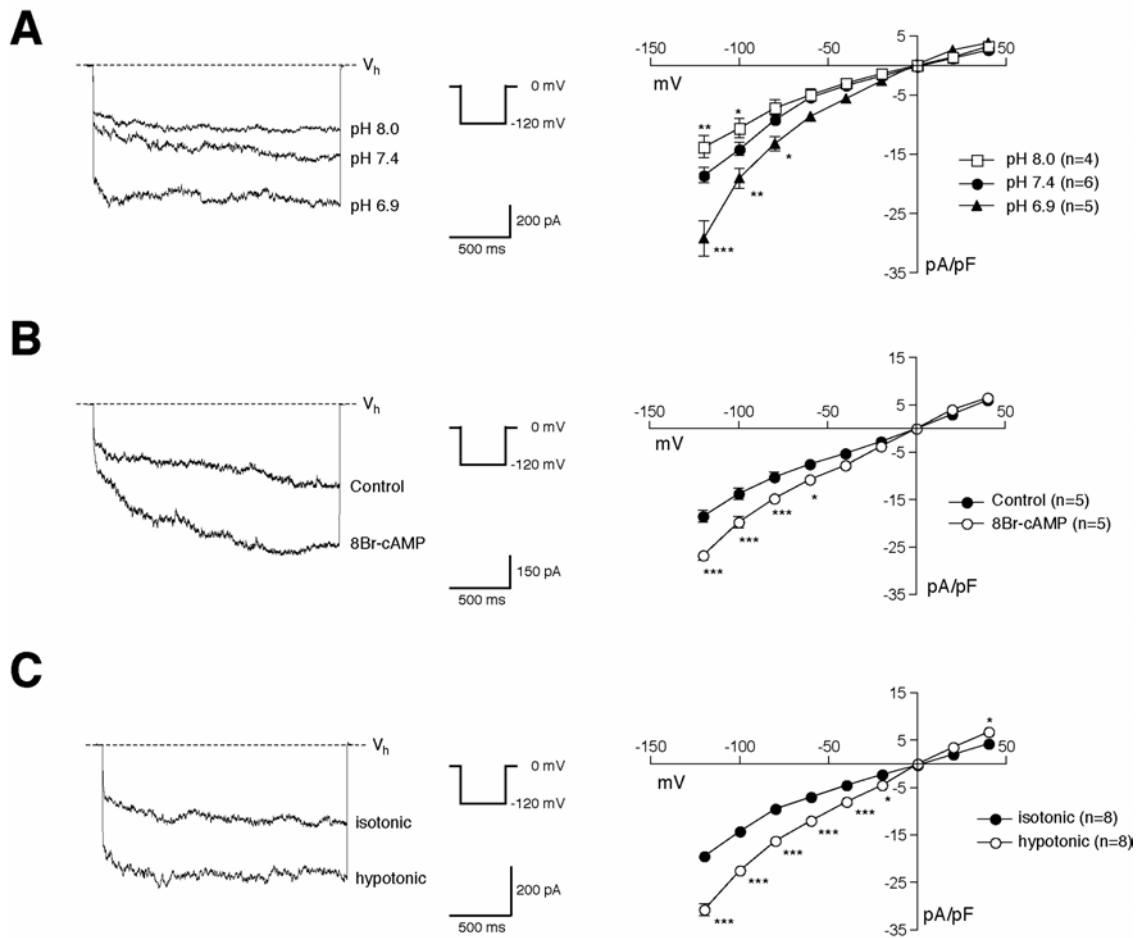


Fig 5

**Figure 5** Modulation of ClC-2 channels by different stimuli in bovine TM cells. **A.** Modulation of ClC-2 currents by external pH. *Left:* Representative experiment showing ClC-2 current traces activated by a hyperpolarizing pulse to -120 mV in extracellular solutions with different pH values: 7.4, 6.9 and 8.0. *Right:* Normalized current-voltage curves showing ClC-2 currents activated at pH 7.4 (●; n=6), pH 6.9 (▲; n=5) and pH 8.0 (□; n=4). Currents were normalized with cell capacitance (pA/pF). Significant differences were found between currents recorded at pH 7.4 and pH 6.9 (ANOVA,  $p < 0.001$ ) or pH 8.0 (ANOVA,  $p < 0.001$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  pH 7.4 vs. pH 6.9 or pH 8.0 (Bonferroni posttest). **B.** Modulation of ClC-2 currents by 8Br-cAMP. *Left:* Representative experiment showing ClC-2 current traces activated by a hyperpolarizing pulse to -120 mV in control conditions and in presence of 8Br-cAMP (100  $\mu$ M). *Right:* Normalized current-voltage curves showing ClC-2 currents activated in control conditions (●; n=5) or in the presence of 8Br-cAMP (○; n=5). Significant differences were found between the control and the 8Br-cAMP group (ANOVA,  $p < 0.0001$ ). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  control vs. 8Br-cAMP (Bonferroni posttest). **C.** Osmosensitivity of ClC-2 currents. *Left:* Representative experiment showing ClC-2 current traces activated by a hyperpolarizing pulse to -120 mV in isotonic and hypotonic conditions. *Right:* Normalized current-voltage curve showing ClC-2 currents in isotonic (●; n=5) and hypotonic (○; n=5) external conditions. ClC-2 currents increased significantly upon exposure to hypotonic external solution (ANOVA,  $p < 0.0001$ ). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  isotonic vs. hypotonic (Bonferroni posttest).

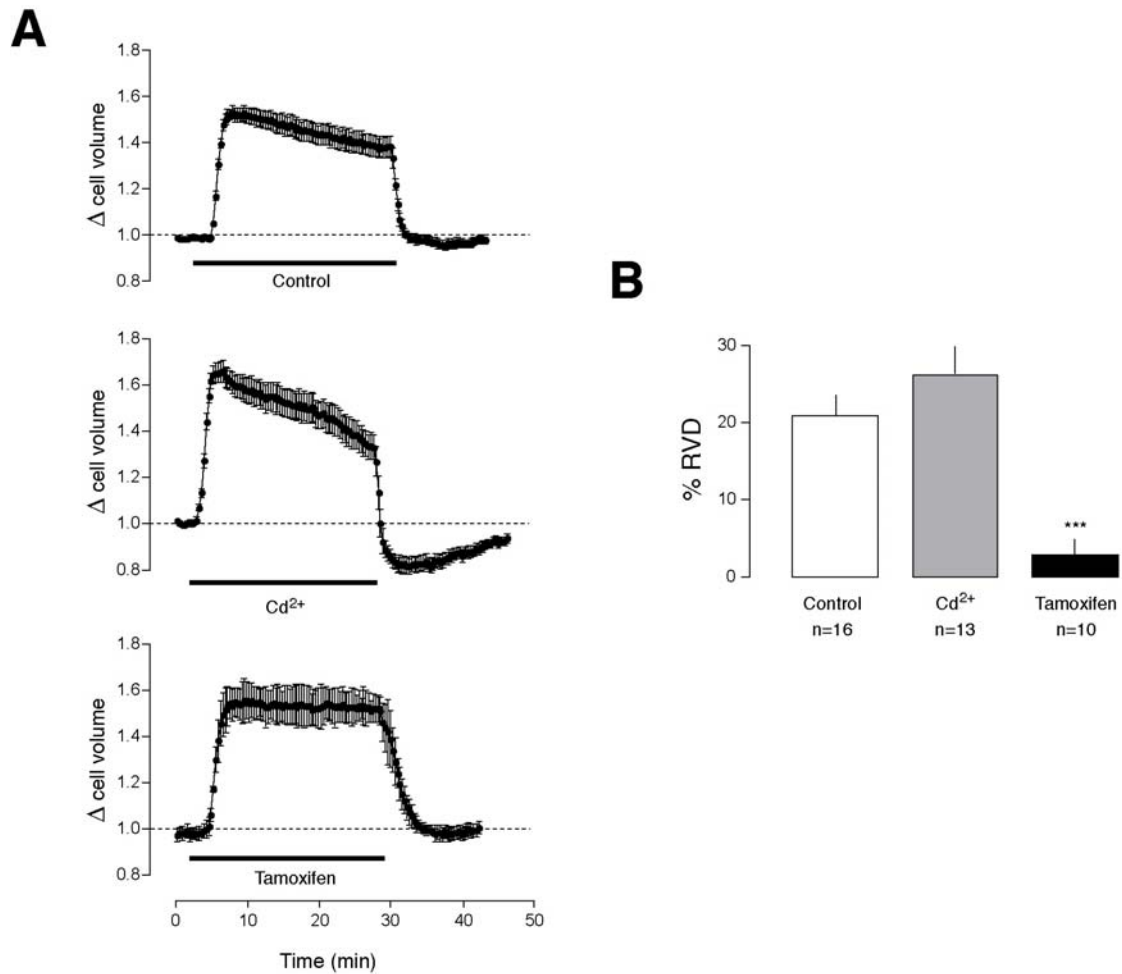


Fig 6

**Figure 6** Participation of chloride channels in bovine TM cells volume regulation. Cells were swollen by exposure to a 40% hypotonic solution to activate a regulatory volume decrease (RVD) mechanism. Cl<sup>-</sup> channel blockers were added 3 min prior to the addition of the hypotonic solution and kept in the bath until exchange for the isotonic solution. *Top*: RVD mechanism activated in control conditions. Data is plotted as mean $\pm$ SEM (n=16). *Middle*: RVD mechanism activated in the presence of  $Cd^{2+}$  to block ClC-2 channels (0.3 mM; n=13). *Bottom*: RVD mechanism activated in the presence of tamoxifen to block ICl<sub>swell</sub> (5  $\mu$ M, n=10). **B**. % RVD was calculated as the percentage ratio between the initial and final cell volume values in the presence of hypotonic medium. A significant reduction in the % RVD was seen in presence of tamoxifen (t-test vs. control,  $p < 0.001$ ) but not with  $Cd^{2+}$ .

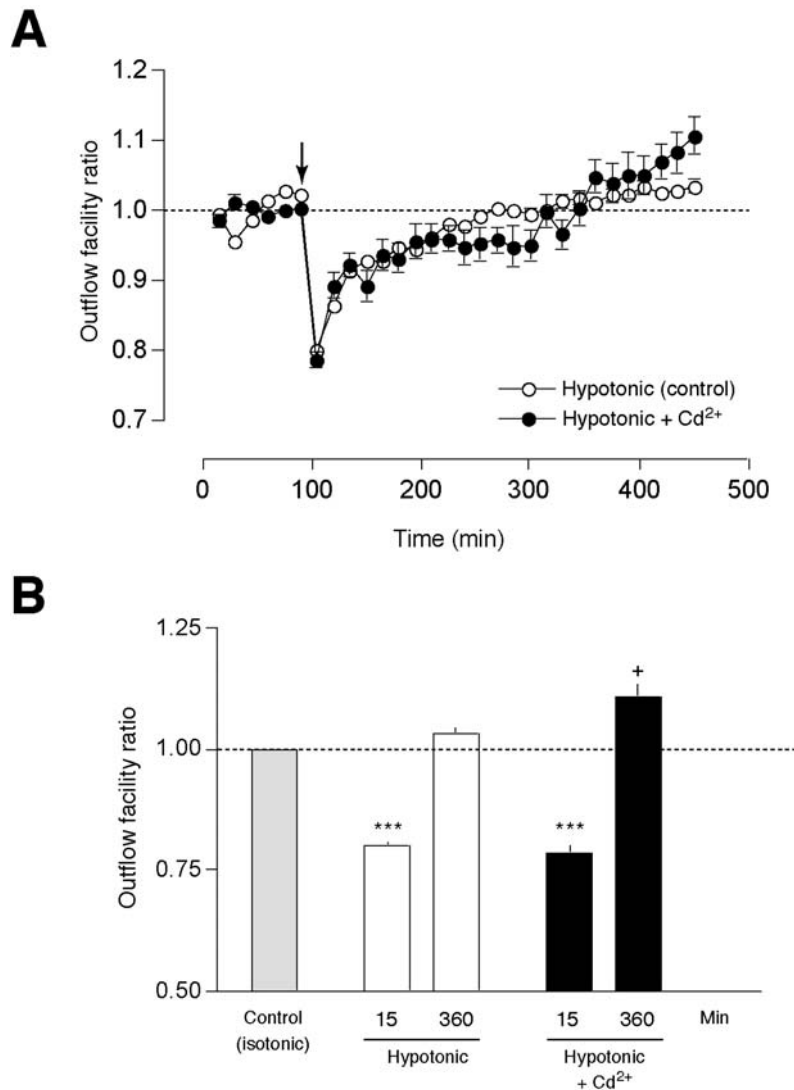


Fig 7

**Figure 7** ClC-2 does not participate in regulatory volume decrease mechanisms involved in outflow facility recovery after hypotonic shock. **A**. Outflow facility ratio (normalized with baseline outflow facility) is plotted against time. Anterior segments were perfused with control medium (DMEM) for 90 min (baseline), and then perfusion medium was replaced (arrow) by hypotonic DMEM with (O; n=6) or without Cd<sup>2+</sup> (0.3 mM; ●; n=6). Hypotonic medium was maintained until the end of the experiment. Control hypotonic data is replotted here for comparative purposes from ref. (52). Neither the initial decrease in outflow facility nor the recovery phase was modified in the presence of Cd<sup>2+</sup>. **B**. Mean ± SEM outflow facility ratios measured after 15 min in the hypotonic medium (or hypotonic medium + Cd<sup>2+</sup>) and after 360 min of perfusion in hypotonic medium (or hypotonic medium + Cd<sup>2+</sup>). Value after 15 min was representative of the initial decrease in outflow facility due to hypotonic medium and was the same for both groups. Measure after 360 min in hypotonic medium was representative of the recovery phase, which was slightly faster in the hypotonic + Cd<sup>2+</sup> group. Statistical differences (t-test, \*\*\*p<0.001) are shown between each group and the baseline in isotonic medium. Differences between the recovery phase in hypotonic vs. the hypotonic + Cd<sup>2+</sup> at 360 min were also found (†p<0.05).

Article 3

**Modulation of aqueous humor outflow by mechanisms involved in trabecular meshwork volume regulation**

David Soto, Núria Comes, Elisa Ferrer, Miguel Morales, Artur Escalada, Jordi Palés, Carles Solsona, Arcadi Gual and Xavier Gasull

Investigative Ophthalmology & Visual Science; 45 (2004) 3650-3661



# Modulation of Aqueous Humor Outflow by Ionic Mechanisms Involved in Trabecular Meshwork Cell Volume Regulation

David Soto,<sup>1,2</sup> Núria Comes,<sup>1,2</sup> Elisa Ferrer,<sup>1</sup> Miguel Morales,<sup>1</sup> Artur Escalada,<sup>3</sup> Jordi Palés,<sup>1</sup> Carles Solsona,<sup>3</sup> Arcadi Gual,<sup>1</sup> and Xavier Gasull<sup>1</sup>

**PURPOSE.** Trabecular meshwork (TM) cell shape, volume, contractility and their interactions with extracellular matrix determine outflow facility. Because cell volume seems essential to TM function, this study was conducted to investigate further the ionic channels and receptors involved in regulatory volume decrease and their roles in modulating outflow facility.

**METHODS.** Primary cultures of bovine TM cells were used.  $K^+$  and  $Cl^-$  currents were studied with whole-cell patch clamping. Swelling was induced by hypotonic shock.  $[Ca^{2+}]_i$  was measured in TM cells loaded with fura-2. Bovine anterior segments were perfused at constant pressure to measure outflow facility.

**RESULTS.** Hypotonic media activated both the high-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel ( $BK_{Ca}$ ) and swelling-activated  $Cl^-$  channel ( $Cl_{swell}$ ) currents and induced release of adenosine 5'-triphosphate (ATP) from TM cells. ATP activated  $P2Y_2$  receptors with the following profile: ATP = uridine 5'-triphosphate (UTP) > adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (ATP- $\gamma$  S) > adenosine 5'-diphosphate (ADP) = uridine 5'-diphosphate (UDP), and increased  $BK_{Ca}$  current. Hypotonic medium initially decreased outflow facility in perfused anterior segments, which recovered with time to baseline levels. Addition of tamoxifen or iberiotoxin ( $Cl_{swell}$  and  $BK_{Ca}$  blockers, respectively) lengthened the recovery phase, which implies that these channels participate in cell volume regulation. In contrast, an activator of  $BK_{Ca}$ s (NS1619) produced the opposite effect.

**CONCLUSIONS.** Cell swelling activates a regulatory volume decrease mechanism that implies activation of  $K^+$  and  $Cl^-$  currents and participation of  $P2Y_2$  receptors. Because previous studies have shown that intracellular volume of TM cells is an important determinant of outflow facility, it seems feasible that cell volume regulation would be part of the homeostatic mechanisms of the TM, to regulate the outflow pathway. (*Invest*

*Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:3650-3661) DOI:10.1167/iov.04-0060

In humans and primates, most of the aqueous humor (AH) produced by the ciliary body flows through the trabecular meshwork (TM) and the Schlemm's canal endothelium to reach the aqueous veins, exiting the eye. The correct performance of this route, as well as the uveoscleral one, is determinant to maintain intraocular pressure (IOP) in the physiological range. On the contrary, when the outflow is somehow impaired, the increase in AH volume raises IOP, which is a major risk factor for the development of glaucoma. TM physiology is still largely unknown, but it has been proposed that TM cells modulate the pathway permeability by showing volume and contractile responses.<sup>1-3</sup> Several mechanisms have been proposed to play a role in TM function, including contraction/relaxation of both TM and ciliary muscle<sup>4,5</sup>; stretch,<sup>6</sup>; composition and remodeling of the extracellular matrix<sup>7-9</sup>; pore formation in the Schlemm's canal endothelium<sup>10,11</sup>; and changes in gene expression,<sup>12-14</sup> cell shape,<sup>6,7,15,16</sup> or cell volume.<sup>2,17</sup> Endothelial cells of Schlemm's canal may also participate in the regulation of outflow facility, showing some of these mechanisms, especially in monkey and human eyes, where Schlemm's canal has a higher degree of organization.<sup>18</sup>

TM cell volume appears to be an important determinant of tissue function, since swelling or shrinking the cells modifies AH outflow facility.<sup>2,3</sup> Mitchell et al.<sup>19</sup> recently showed that TM cells possess a regulatory volume decrease (RVD) mechanism. Thus, after cell swelling, the RVD is mediated, at least in part, by activation of swelling-activated  $Cl^-$  channels ( $Cl_{swell}$ s) and  $K^+$ - $Cl^-$  symports. In this sense, the  $Na^+$ / $H^+$  antiport has also been suggested to participate in volume regulation, and therefore inhibitors of this antiport may increase outflow facility.<sup>19</sup> Another player is the  $Na^+$ - $K^+$ - $Cl^-$  cotransport that would modulate outflow facility by regulating cell volume in response to different conditions-drugs,<sup>2,17</sup> but bumetanide (an  $Na^+$ - $K^+$ - $Cl^-$  cotransport blocker) unexpectedly did not have any effect on outflow facility in monkeys.<sup>20</sup> Moreover, bumetanide did not reduce IOP in monkey or mouse.<sup>20,21</sup> Despite all the players identified and possibly involved in cell volume regulation, a direct relationship between cell volume regulation and outflow facility has not yet been demonstrated.

In other cell types,<sup>22-24</sup> osmotic cell swelling is thought to activate  $Cl_{swell}$ s. Simultaneously, cell swelling induces the release of adenosine 5'-triphosphate (ATP) that, in turn, acts as an autocrine/paracrine signal to activate purinergic  $P2Y$  receptors. Stimulation of purinergic receptors is thought to facilitate activation of  $K^+$  channels. Finally,  $Cl^-$  and  $K^+$  efflux from the cell followed by water outflow permits the cell to recover its volume.<sup>25</sup> It remains to be elucidated whether these mechanisms of cell volume regulation are essential to TM function. In this sense, several mechanisms such as the  $Na^+$ - $K^+$ - $Cl^-$  cotransport<sup>17</sup> or the high-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel ( $BK_{Ca}$ )<sup>26</sup> are tightly modulated by several drugs, and alterations in their regulation may affect TM function and therefore

From the <sup>1</sup>Laboratory of Neurophysiology, Department of Physiological Sciences I-Institute of Biomedical Investigations August Pi i Sunyer, and the <sup>3</sup>Cellular and Molecular Biology Laboratory, Department of Cell Biology and Pathology, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>Contributed equally to the work and therefore should be considered equivalent senior authors.

Supported by Grants PM99-0169, BFI2002-01202, BFI2003-01190, BFI2001-3331 from Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain.

Submitted for publication January 22, 2004; revised June 16 and July 9, 2004; accepted July 15, 2004.

Disclosure: D. Soto, None; N. Comes, None; E. Ferrer, None; M. Morales, None; A. Escalada, None; J. Palés, None; C. Solsona, None; A. Gual, None; X. Gasull, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Xavier Gasull, Laboratori de Neurofisiologia, Facultat de Medicina-U.B., Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain; xgasull@ub.edu.

outflow facility. Our purpose was to identify and characterize the receptors and channels involved in the RVD of TM cells and to determine their functional role in outflow facility modulation as part of a homeostatic system that may regulate TM resistance. We used hypotonic shocks to trigger RVD and to study the receptors and channels involved in this process. Our findings show that changes in TM cell volume modify outflow facility and that regulatory mechanisms to restore cell volume actively participate to maintain AH outflow.

## METHODS

### Bovine TM Cell Culture

Bovine TM (BTM) cells were cultured by using a modification of the technique described by Stamer et al.<sup>27</sup> As described previously,<sup>4</sup> BTM strips were digested with 2 mg/mL collagenase (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and 0.5 mg/mL bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) at 37°C for 2 hours. After mechanical digestion, the supernatant was collected, centrifuged, and resuspended. The resuspended solution was seeded in culture flasks containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; BioWhittaker, Barcelona, Spain) plus 10% fetal bovine serum, 100 mg/mL L-glutamine (Sigma-Aldrich), 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2.5 µg/mL amphotericin B (BioWhittaker). Cell growth was observed 2 to 4 days after seeding and cells reached confluence 12 to 15 days later. Cell passages were performed using trypsin-EDTA (Bio-Whittaker). Cells from passages 1 to 3 were used for electrophysiology,  $[Ca^{2+}]_i$  and ATP measurements.

### Cytosolic Free-Ca<sup>2+</sup> Measurement

Measurement of  $[Ca^{2+}]_i$  was performed as described in detail previously.<sup>4,28</sup> Briefly, BTM cells were plated on 25-mm diameter glass coverslips (VWR Scientific Inc., Philadelphia, PA) and then loaded with 5 µM fura-2/AM (Calbiochem, San Diego, CA) for 60 minutes at 37°C in incubation buffer (121 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, and 0.01% BSA [pH 7.4], adjusted with NaOH, 287 ± 2 mOsm/kg; mean ± SD). Coverslips with fura-2-loaded cells were transferred into an open flow chamber (1 mL incubation buffer) mounted on the heated stage of an inverted epifluorescence microscope (Diaphot-300; Nikon, Tokyo, Japan). Fluorescence images were obtained by a charge-coupled device (CCD) camera (CH250; Photometrics, Tucson, AZ) and were digitized, stored, and analyzed on computer (Macintosh 840AV; Apple, Inc., Cupertino, CA). After a stabilization period of 10 minutes, image pairs were obtained alternately every 4 seconds, and, for a total of 8 minutes, at excitation wavelengths of 340 and 380 nm (10-nm bandwidth filters), to excite the Ca<sup>2+</sup>-bound and Ca<sup>2+</sup>-free forms of this ratiometric dye, respectively. The emission wavelength was 510 nm (120-nm bandwidth filter).  $[Ca^{2+}]_i$  levels were calculated in single cells by determining the 340- to 380-nm fluorescence ratios at each time point.<sup>4,29</sup> In both control and experimental groups, Ca<sup>2+</sup> was recorded for 1 minute before drug application and thereafter, for 7 minutes. Cells were considered as responders when  $[Ca^{2+}]_i$  increased more than 100% above the resting value.

### Patch-Clamp Procedures

TM cells were plated onto small glass coverslips and studied 24 to 48 hours thereafter. Coverslips were transferred to a special chamber (0.2 mL) in the stage of an inverted microscope (IX70; Olympus, Tokyo, Japan) to perform the recordings. External solutions were superfused at a rate of 3 to 4 mL/min by gravity. Before the recording session was started, culture medium was replaced with a bath recording solution. Recordings were performed in 2-hour sessions at 21°C to 23°C. Patch pipettes were pulled in an electrode puller (P-97; Sutter Instruments, Novato, CA) and had a filled tip resistance of between 3 to 6 MΩ. Pipette capacitance to ground was neutralized after the seal was formed. An Ag/AgCl wire bath electrode was used except when re-

ording chloride currents where the Ag/AgCl electrode was mounted in a 3 M KCl agar bridge. As previously described,<sup>6</sup> we took care to avoid stretch activation of BK<sub>Ca</sub>s when performing the patches. Before the pipette had entered the bath and until cell contact, positive pressure was applied.

Whole-cell currents were recorded using a patch-clamp amplifier (L/M-EPC7; Heka, Lambrecht/Pfalz, Germany) as described previously.<sup>6</sup> Data acquisition and command potentials were controlled by computer (WinWCP 3.2 software; John Dempster, University of Strathclyde, UK), using an interface (CED1401; Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK). Whole-cell currents were recorded at 10 kHz.

### Chloride Currents

Cl<sub>swell</sub> currents were recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. After achieving the whole-cell configuration, cells were allowed to stabilize and dialyze for 3 to 4 minutes before recording started. Whole-cell currents were recorded at 10 kHz without any leak current subtraction protocol. Cells were clamped at 0 mV, and voltage pulses from -80 to +120 mV were applied in 20-mV steps to evoke Cl<sup>-</sup> currents. The intracellular pipette solution contained (in mM): 150 N-methyl-D-glucamine (NMDG)Cl, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 1.0 EGTA, 2 ATP, 0.5 guanosine 5'-triphosphate (GTP), 10 HEPES (pH 7.35) adjusted with Tris (303 ± 4 mOsm/kg; mean ± SD). The standard isotonic bath solution contained (in mM): 150 NMDGCl, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES (pH 7.35) adjusted with Tris (295 ± 5 mOsm/kg). The standard hypotonic bath solution contained (in mM): 100 NMDGCl, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES (pH 7.35) adjusted with Tris (219 ± 5 mOsm/kg). The solution osmolalities were measured with an osmometer (Vapro, Wescor, UT). To study channel-relative permeabilities, we recorded voltage ramps from -100 to +100 mV for Cl<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, and gluconate<sup>-</sup>. In these experiments, the bath hypotonic solution used was (in mM): 90 NaX (X = anion), 10 NMDGCl, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES (pH 7.35) adjusted with 0.5 M Tris. Data were corrected with the calculated theoretical junction potential values for each solution.

### Potassium Currents

Potassium currents were recorded in whole-cell configuration, either with the ruptured-patch or the perforated-patch (with Nystatin; Sigma-Aldrich) technique. Leak current and residual capacitive current were subtracted using a P/N protocol where N was -4. Cells were clamped at -60 mV, and depolarizing pulses were applied in 10- or 20-mV steps to evoke outward K<sup>+</sup> currents. In whole-cell recordings, the solution in the pipette was (in mM): 140 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.2), with 0.5 M KOH. The bath physiological solution was (in mM): 140 NaCl, 4.3 KCl, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES (pH 7.4), with NaOH (301 ± 5 mOsm/kg). Hypotonic solution in which NaCl and KCl concentrations were reduced was (in mM): 100 NaCl, 2 KCl, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES (pH 7.4), with NaOH (213 ± 4 mOsm/kg; mean ± SD). Outward potassium currents were blocked with a specific BK<sub>Ca</sub> blocker, iberiotoxin (IBTX, 50 nM) obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). In the whole-cell perforated-patch technique, pipettes were backfilled with intracellular solution containing (in mM): 100 K-acetate, 40 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1.38 EGTA, and 10 HEPES (pH 7.2) with KOH, in which Nystatin (150 µg/mL) was dissolved. The solution was made daily from a stock solution (3 mg/60 mL dimethyl sulfoxide [DMSO]) and sonicated to the final concentration. Slowly developing capacitive transients indicated establishment of the whole-cell perforated-patch configuration. We continuously monitored series resistance to avoid sudden drops in this parameter indicating that ruptured-patch configuration was achieved. Only experiments with constant series resistance during the whole recording were considered for analysis.

### Measurement of ATP Release

ATP release detection was performed in cultured TM cells 3 to 4 days after cell passage. Experiments were performed at 22°C in cells grown

in 35-mm Petri dishes. Culture medium was replaced by physiological solution (mM): 140 NaCl, 4.3 KCl, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, and 10 glucose (pH 7.4), with NaOH (291 ± 2.9 mOsm/kg) and allowed to rest for 30 minutes to minimize a possible ATP release due to medium exchange. Twenty percent and 40% hypotonic medium was obtained by adding distilled water to the physiological solution and resulting osmolalities were 242 ± 2 and 206 ± 2 mOsm/kg (mean ± SD), respectively. A vial of firefly lantern luciferase extract from *Photinus pyralis* (Sigma-Aldrich) was diluted in 1 mL of isotonic physiological solution or distilled water containing 5 mg/mL D-luciferin (Sigma-Aldrich). The resultant suspension was centrifuged for 30 seconds in a benchtop centrifuge. The supernatant was desalted in a 10-mL column (10 DG; Bio-Rad, Hercules, CA) equilibrated with recording solution. A photomultiplier tube (R464; Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan) located over the Petri dish was used to detect photons. The resultant electric signal was filtered at 1 kHz, digitized, and recorded on computer (X-Chart software; Heka). Calibration curves were calculated by adding known doses of ATP (1, 3, 4, and 6 picomoles). Regardless of the different ionic strength of the isotonic and hypotonic solutions used, no significant differences were found between the calibration curves in the 1- to 6-picomole range. Therefore, data were not corrected for each solution and all calculations were done with the calibration values in isotonic conditions. Also, to test a possible lysis due to excessive cell swelling when hypotonic solutions were added, we measured lactate dehydrogenase (LDH) activity in the bath solution.<sup>30</sup> No significant amounts of LDH activity were encountered before and after addition of isotonic or hypotonic solutions.

### Perfusion of Anterior Segments

Eyes of 3- to 6-month-old calves were obtained at the local abattoir 0.5 to 2 hours after death and kept in phosphate-buffered saline (PBS) at 4°C for not more than 1.5 hours. Isolation of bovine anterior segments was performed as described previously.<sup>3</sup> The perfusion technique has been described elsewhere.<sup>3,4</sup> Briefly, bovine anterior segments were placed in a specially designed perfusion chamber. The anterior segments, located in their respective chambers together with force transducers (Letica, Barcelona, Spain) and the tubing system, were placed in an incubator (Selecta, Barcelona, Spain) at 36°C and 5% CO<sub>2</sub>. Perfusion was performed with DMEM. The pressure of the artificial anterior chamber was monitored and recorded throughout the experiment with a pressure transducer (9162-0; Mallinckrodt, Northampton, UK) and was maintained with a suspended reservoir at 10 mm Hg in bovine eyes. Outflow facility (*C*) was averaged during periods of 15 minutes (mean of 450 values). Baseline facility (*C*<sub>0</sub>) was calculated during the first 90-minute period of stable *C*. When a different experimental condition or drug was added to the perfusion medium, the tubes and the anterior chamber were flushed and replaced with the new medium. This change was made by rapidly replacing the contents of the artificial anterior chamber by opening the exit needle until 200% of the volume had been exchanged. This exchange was always made at a pressure below 10 mm Hg. Recording of *C* started after stabilization of the flow.

The perfusion procedure was performed using a protocol with two periods: perfusion with control isotonic DMEM (301 ± 1 mOsm/kg) for 90 minutes, to establish the *C*<sub>0</sub>, and perfusion with hypotonic (244 ± 2 mOsm/kg) DMEM for 360 minutes to determine changes in outflow facility after five experimental conditions: hypotonic medium, hypotonic+tamoxifen, hypotonic+IBTX, hypotonic+tamoxifen+IBTX, and hypotonic+BK<sub>Ca</sub> channel opener (NS1619; 1,3-dihydro-1-[2-hydroxy-5-(trifluoromethyl)phenyl]-5-(trifluoromethyl)-2H-benzimidazol-2-1)).

### Drugs

ATP, uridine 5'-triphosphate (UTP), adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (ATP-γ S), adenosine 5'-diphosphate (ADP), uridine 5'-diphosphate (UDP), suramin sodium salt, 2-MeS-ATP (2-methylthio adenosine 5'-triphosphate tetrasodium salt), thapsigargin, EGTA, U73122 (1-[6-[(17β)-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-

2,5-dione), ryanodine, cyclopiazonic acid (CPA), 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid disodium salt hydrate (DIDS), NMDG, tamoxifen ((*Z*)-1-(*p*-dimethylaminoethoxyphenyl)-1,2-diphenyl-1-butene), IBTX, firefly lantern extract (luciferin-luciferase), the BK<sub>Ca</sub> channel opener NS1619, nystatin, and ARL67156, were obtained from Sigma-Aldrich. PPADS (pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid) was purchased from Calbiochem.

### Data Analysis

Results are given as the mean ± SEM. Data were analyzed with the paired or unpaired Student's *t*-test, the Fisher exact test, and the χ<sup>2</sup> test. Two-way ANOVA with the Bonferroni posttest was used to evaluate differences between control and drug effects in the recorded currents. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

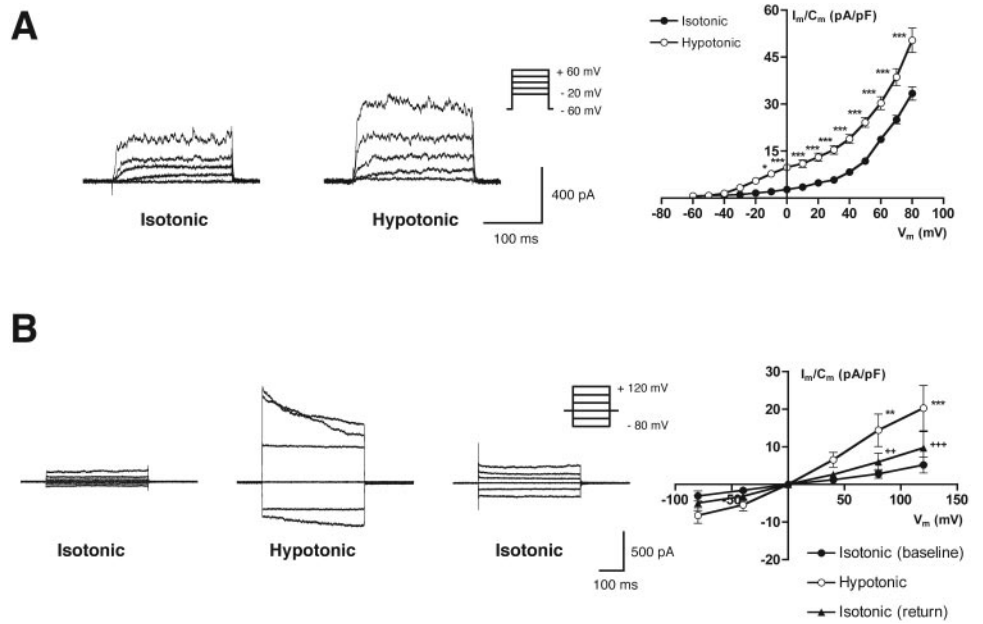
## RESULTS

### Modulation of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> Currents in the TM by Cell Swelling

It has been reported that hypotonicity triggers an RVD<sup>19</sup> in TM cells and that it also decreases outflow facility in perfused anterior segments.<sup>2,3</sup> In the present study, we further examined the effects of hypotonic stimuli on whole-cell currents mediated by the BK<sub>Ca</sub><sup>6</sup> and the possible activation of Cl<sub>swell</sub> in TM cells. As shown in Figure 1A, whole-cell currents were first recorded in isotonic physiological solution (control) and afterward bath solution was replaced by hypotonic medium. Cells were clamped at -60 mV, and depolarizing pulses to +80 mV were applied in 10-mV steps to evoke outward BK<sub>Ca</sub> currents. In hypotonic medium, the total outward K<sup>+</sup> current increased significantly (ANOVA; *P* < 0.001) in 13 of 15 whole-cell experiments (87% of the cells). Bonferroni posttests showed significant differences between the isotonic and hypotonic groups, at -10 mV (*P* < 0.05) and from 0 to +80 mV (*P* < 0.001). Two of 15 cells did not show significant changes. Figure 1A shows a typical recording and the current-voltage (I-V) relationship in isotonic and hypotonic conditions. In agreement with previous data,<sup>6,19</sup> hypotonic solution did not modify [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; thus, it is not likely that the BK<sub>Ca</sub> current increase was due to an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

In a different set of experiments, cells were voltage clamped at 0 mV, and whole-cell currents were elicited by using specific solutions to record Cl<sup>-</sup> currents (see the Methods section). Under isotonic conditions, TM cells possessed a small current of -3.0 ± 1.3 pA/pF (mean ± SEM) at an applied potential of -80 mV and 2.8 ± 1.2 pA/pF at +80 mV (Fig. 1B). When isotonic medium was replaced by a hypotonic one, Cl<sub>swell</sub> currents were activated within 4 minutes and reached a maximum between 10 and 12 minutes (-8.2 ± 2.1 pA/pF at -80 mV and 14.4 ± 4.3 pA/pF at +80 mV; mean ± SEM). Accounting all the cells recorded in the whole study, Cl<sub>swell</sub> current activation was seen in 140 (85%) of 164 cells. In the experimental group shown in Figure 1B, cells in isotonic medium (*n* = 5) were first exposed to hypotonic medium and, on maximum Cl<sub>swell</sub> current activation, hypotonic medium was replaced, returning to isotonic medium. Statistical comparison of the I-V curves in isotonic and hypotonic conditions showed significant differences for the whole voltage range (-80 to +120 mV; ANOVA, *P* < 0.001). Bonferroni posttests showed significant differences between the isotonic and hypotonic groups, at +80 mV (*P* < 0.01) and +120 mV (*P* < 0.001; Fig. 1B). When returning to isotonic medium, Cl<sub>swell</sub> currents decreased, and significant differences between isotonic and hypotonic conditions were also recorded at +80 mV (*P* < 0.01) and +120 mV (*P* < 0.001). All recordings were obtained with ATP and GTP in the intracellular solution. In a group of recordings (*n* = 5) where these compounds were omitted, no Cl<sub>swell</sub>

**FIGURE 1.** Hypotonic medium increased  $K^+$  and  $Cl^-$  currents. **(A)** *Left:* representative experiment showing whole-cell  $BK_{Ca}$  currents in a TM cell in isotonic and hypotonic media.  $V_h = -60$  mV. *Right:* current-voltage curve showing outward  $BK_{Ca}$  currents of TM cells in the whole-cell configuration ( $n = 13$ ). Currents are expressed as current densities (pA/pF). Data are for isotonic (301 mOsm/kg) and hypotonic (213 mOsm/kg) media.  $BK_{Ca}$  current increased significantly (ANOVA,  $P < 0.001$ ). \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  hypotonic versus isotonic medium (Bonferroni posttest). Outward currents were blocked by IBTX (data not shown). **(B)** *Left:* representative experiment showing whole-cell  $Cl_{swell}$  in a TM cell in isotonic, then hypotonic, and returning to isotonic media.  $V_h = 0$  mV. *Right:* Current-voltage curve showing outward  $Cl_{swell}$  currents of TM cells in the whole-cell configuration ( $n = 5$ ). Data are shown for isotonic medium baseline, hypotonic medium, and isotonic medium return to baseline.  $Cl_{swell}$  current increased significantly (ANOVA,  $P < 0.001$ ). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  hypotonic versus isotonic medium (Bonferroni posttest). ++ $P < 0.01$ , +++ $P < 0.001$  return to isotonic baseline versus hypotonic.



current activation was seen in hypotonic medium (data not shown). This result is in agreement with previous data in other cell types showing the ATP dependency of  $Cl_{swell}$  current activation.<sup>31</sup>

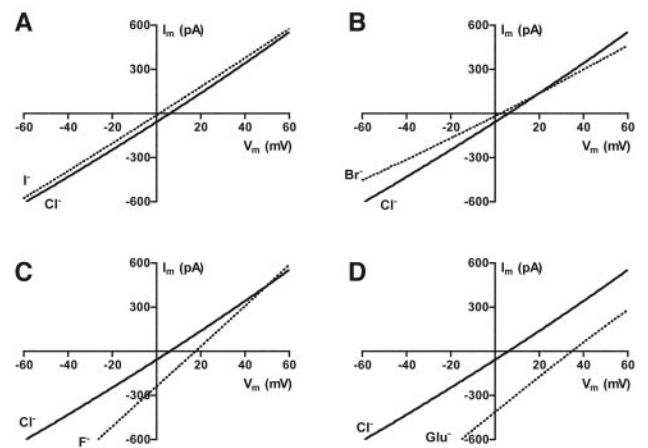
As shown in the recordings displayed in Fig. 1B,  $Cl_{swell}$  currents are typically characterized by an outward rectification and a time-dependent decay at depolarizing voltages. To characterize  $Cl_{swell}$  currents further, we replaced  $Cl^-$  for different anions to establish the channel anion permeability sequence. Figures 2A-D show mean voltage ramps for each anion after  $Cl^-$  replacement in the hypotonic solution (SEM was omitted for clarity). Calculation of reversal potential ( $V_{rev}$ ) and relative anion permeabilities ( $P_x/P_{Cl}$ ; Fig. 2, table) showed an anion permeability sequence  $I^- > Br^- > Cl^- > F^- > gluconate^-$ , which is in agreement with previous data for this channel.<sup>32-34</sup>

Pharmacological characterization of  $Cl_{swell}$  currents is shown in Figure 3. After activation of  $Cl_{swell}$  currents in hypo-

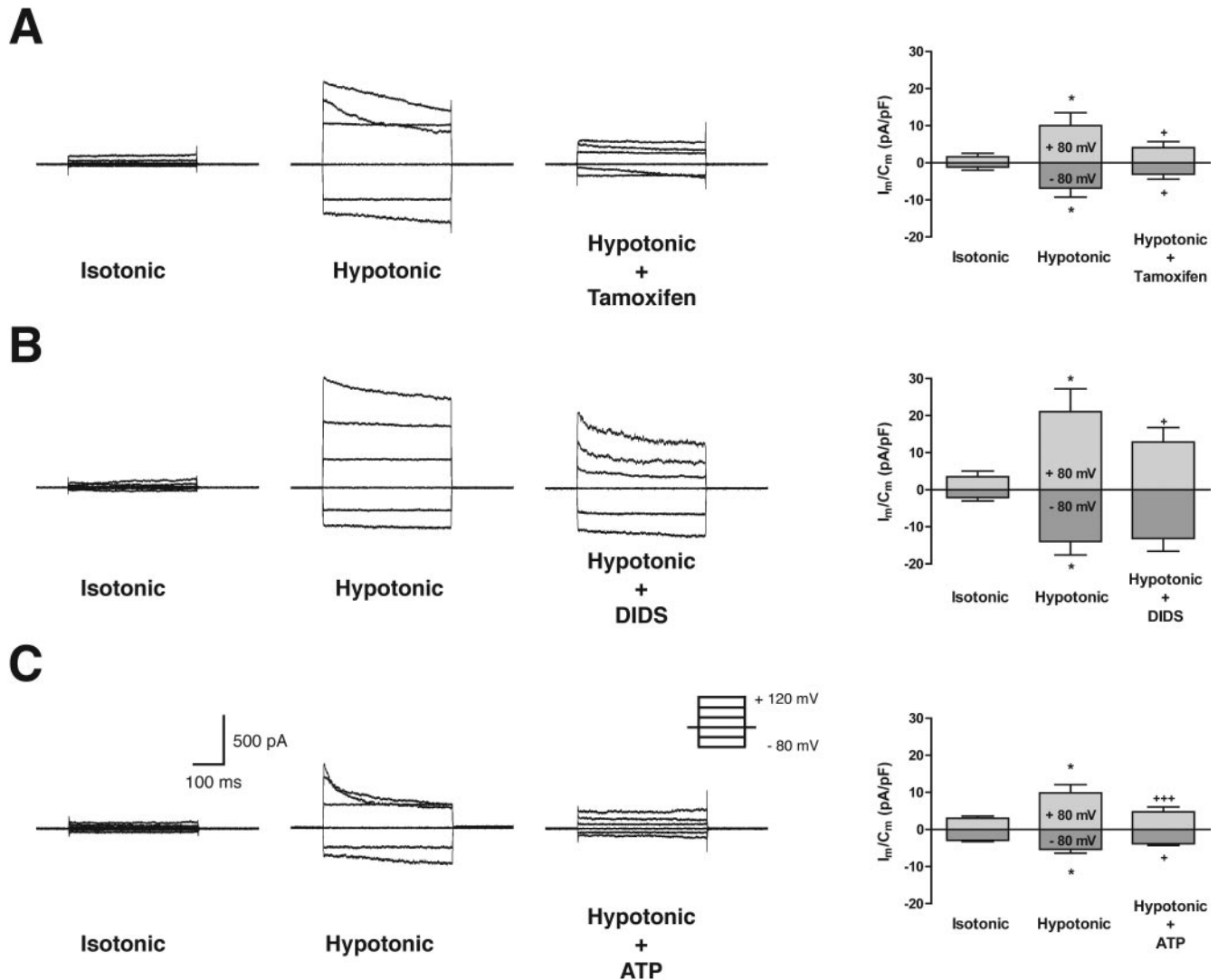
tonic solution,  $Cl^-$  channel blockers were added to the solution, and their effects at depolarized and hyperpolarized potentials were evaluated. Tamoxifen (100  $\mu M$ ;  $n = 5$ ), a known selective  $Cl_{swell}$  blocker, decreased outward and inward  $Cl_{swell}$  currents in a voltage-independent manner along the entire I-V relationship (ANOVA  $P < 0.001$ , hypotonic versus hypotonic+tamoxifen). As shown in Figure 3A, tamoxifen blocked  $Cl_{swell}$  currents both at hyperpolarized (55% at  $-80$  mV;  $t$ -test,  $P < 0.05$  vs. hypotonic) and depolarized potentials (60% at  $+80$  mV;  $t$ -test,  $P < 0.05$ ). Next, we tested the effect of DIDS, a nonselective  $Cl^-$  channel blocker. By contrast, addition of DIDS (100  $\mu M$ ;  $n = 6$  cells) to the hypotonic medium significantly blocked only the outward currents (ANOVA, I-V relationship hypotonic+DIDS versus hypotonic,  $P < 0.001$ ). DIDS decreased outward current by 40% (at  $+80$  mV;  $t$ -test,  $P < 0.05$ ), but did not affect inward current (6% at  $-80$  mV;  $t$ -test, NS). Blocking effects of both tamoxifen and

Effects of $Cl^-$ ion replacement on reversal potentials of $Cl_{swell}$ currents			
Anion (x)	$V_{rev}$ (mV)	$P_x / P_{Cl}$	n
$I^-$	$1.3 \pm 1.2$	1.36	6
$Br^-$	$2.6 \pm 1.7$	1.31	7
$Cl^-$	$6.3 \pm 1.0$	1.0	9
$F^-$	$17.8 \pm 1.0$	0.71	5
Gluconate $^-$	$34.7 \pm 2.1$	0.37	6

$V_{rev}$  values were obtained from I-V plots as indicated in Methods. Relative anion permeabilities ( $P_x / P_{Cl}$ ) were calculated using the Goldman-Hodgkin-Katz equation.



**FIGURE 2.** Effect of  $Cl^-$  ion replacement on reversal potentials of  $Cl_{swell}$ . *Left:* reversal potential (mean  $\pm$  SEM), relative permeability, and number of experiments for each anion. *Right:* mean recordings in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique for (solid lines)  $Cl^-$  and (dotted lines)  $I^-$  (A),  $Br^-$  (B),  $F^-$  (C), and gluconate (D). SEM was omitted for clarity. Voltage ramps were recorded after activation of  $Cl_{swell}$  current in hypotonic medium.  $Cl^-$  was replaced by each anion.



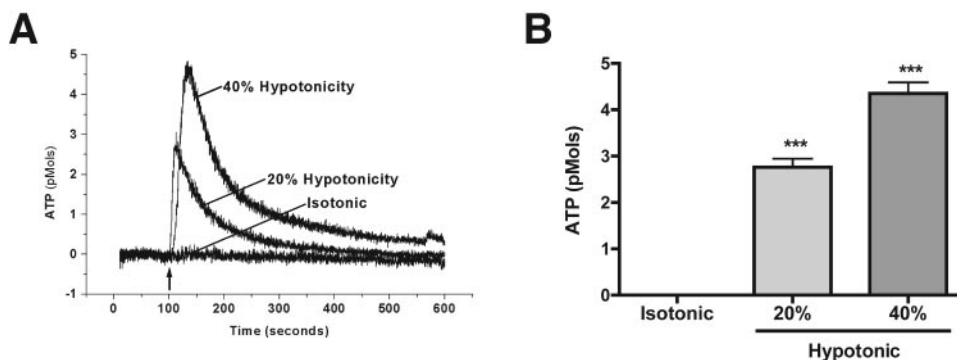
**FIGURE 3.**  $Cl_{swell}$  pharmacology.  $V_h = 0$  mV in all three experiments. (A) *Left*: representative experiment showing whole-cell  $Cl_{swell}$  in a TM cell in isotonic, hypotonic, and hypotonic+tamoxifen (100  $\mu$ M) media. Tamoxifen decreased outward and inward currents. *Right*: mean  $\pm$  SEM outward (at +80 mV) and inward (at -80 mV) current densities (pA/pF) recorded in five TM cells. (B) *Left*: representative experiment showing whole-cell  $Cl_{swell}$  in a TM cell in isotonic, hypotonic, and hypotonic+DIDS (100  $\mu$ M) media. DIDS decreased outward but not inward currents. *Right*: Current densities are as in (A) and were recorded in six TM cells. (C) *Left*: representative experiment showing whole-cell  $Cl_{swell}$  currents in a TM cell in isotonic, hypotonic, and hypotonic+extracellular ATP (1 mM) media. ATP decreased outward and inward currents. *Right*: Current densities are as in (A) and were recorded in six TM cells. Note that some  $Cl_{swell}$  currents inactivated at strong depolarized potentials (hypotonic in A), but the common pattern was an increasingly rapid inactivation as the depolarization increased (hypotonic in B and C). Significant differences were recorded between isotonic and hypotonic medium (\* $P < 0.05$ ; *t*-test) and between hypotonic medium and hypotonic+blocker ( $^+P < 0.05$  and  $^{+++}P < 0.001$ ; *t*-test).

DIDS are characteristic of  $Cl_{swell}$  currents, as described previously.<sup>35</sup> These results are in agreement with electrophysiological characterization and further corroborate that the currents recorded are mediated by  $Cl_{swell}$  channels. To characterize the currents further, we tested the effect of extracellularly applied ATP (1 mM), which has also been reported to block  $Cl_{swell}$  currents.<sup>32</sup> Extracellular ATP blocked  $Cl_{swell}$  currents in a voltage-dependent manner along the entire I-V curve (ANOVA,  $P < 0.001$ ;  $n = 6$ ; Fig. 3C). Extracellular ATP blocked  $Cl_{swell}$  currents both at hyperpolarized (28% at -80 mV; *t*-test,  $P < 0.05$  vs. hypotonic) and depolarized potentials (52% at +80 mV; *t*-test,  $P < 0.01$ ).

#### Cell Swelling's Effects on ATP Release in TM Cells

It has been reported that ATP can be released to function as an autocrine/paracrine signal in several cell types after osmotic

challenge or in response to drug stimulation.<sup>25,36</sup> In TM cells grown in 35-mm culture dishes, DMEM was replaced by an isotonic physiological solution (see the Methods section), and cells were allowed to rest for 30 minutes to minimize a possible ATP release due to medium exchange. Stimulation of TM cells with isotonic medium did not elicit a significant release of ATP into the extracellular solution ( $0.004 \pm 0.0006$  picomoles or  $0.001 \pm 0.002$  nM; mean  $\pm$  SEM;  $n = 3$ ; Figs. 4A, 4B). When medium hypotonicity was reduced by 20%,  $2.76 \pm 0.18$  picomoles of ATP was released ( $1.15 \pm 0.07$  nM; *t*-test  $P < 0.001$  vs. isotonic;  $n = 5$ ). After reaching a peak, ATP release decreased exponentially to recover baseline levels within 400 to 500 seconds after stimulation. When medium hypotonicity was reduced by 40%,  $4.35 \pm 0.23$  picomoles of ATP was released, showing the same kinetics ( $1.56 \pm 0.08$  nM; *t*-test  $P < 0.001$  vs. isotonic;  $n = 4$ ).



**FIGURE 4.** ATP release from TM cells. TM cells grown to confluence in 35-mm culture dishes were stimulated (*arrow*) with isotonic medium or with medium in which hypotonicity was reduced by 20% or 40%. Released ATP was measured by a luciferin-luciferase-detection method. **(A)** Representative recording of ATP release from TM cells after stimulation with isotonic and 20% and 40% hypotonic media, successively. **(B)** ATP release in isotonic ( $n = 3$ ; mean  $\pm$  SEM), 20% hypotonic ( $n = 5$ ), and 40% hypotonic ( $n = 4$ ) media. Significant differences were found between isotonic and hypotonic stimulations ( $^{***}P < 0.001$ ; *t*-test).

**Effect of ATP on Purinergic P2Y<sub>2</sub> Receptors in TM Cells**

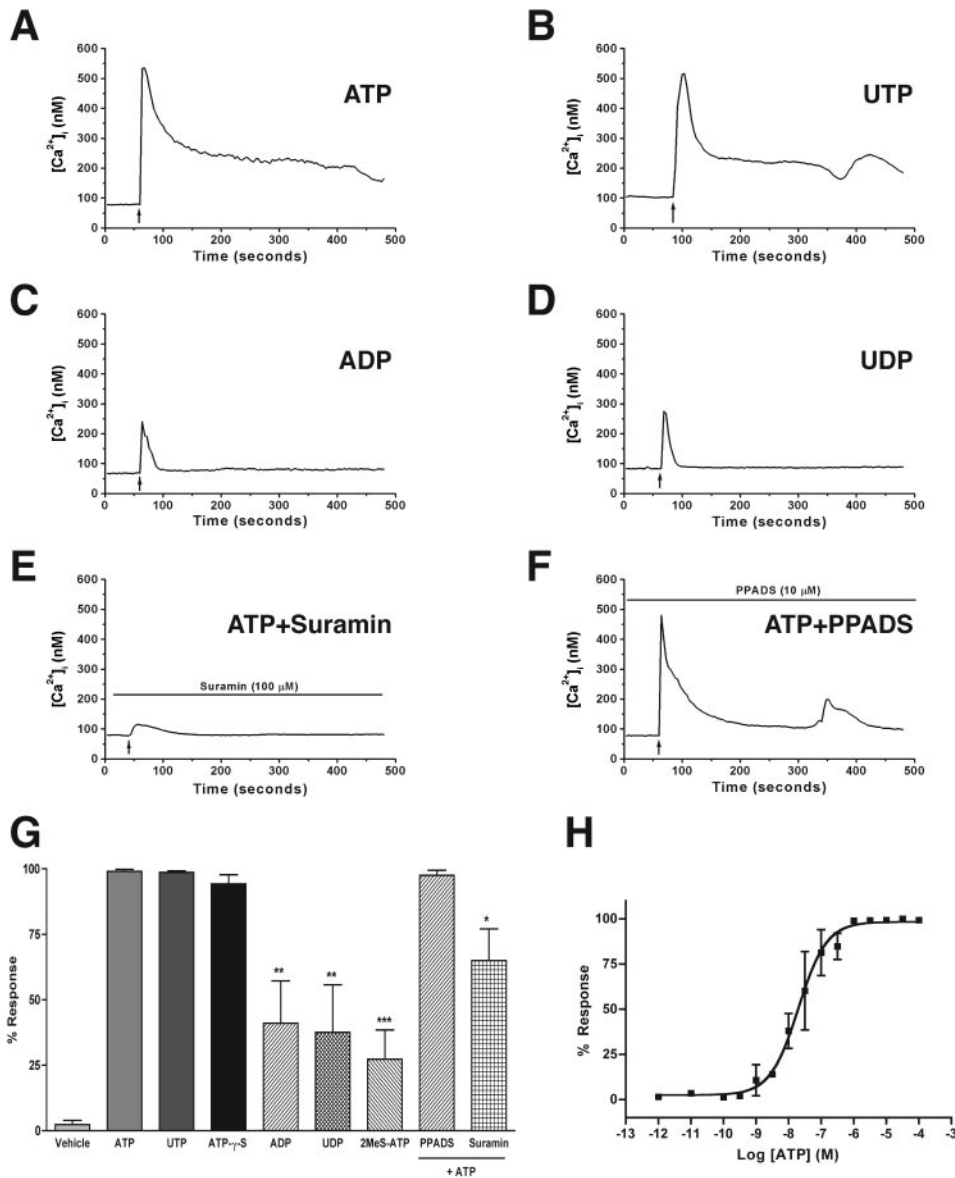
The fact that TM cells release ATP (and maybe other nucleotides) in response to certain stimuli suggests that these same cells may express purinergic receptors to permit a physiological function of this nucleotide in the outflow pathway. Therefore, we tested this hypothesis by stimulating TM cells with different nucleotides while recording intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Resting  $[Ca^{2+}]_i$  in TM cells was found to be between 58 and 89 nM. In the control group, only 3% of the

cells increased  $[Ca^{2+}]_i$  after drug vehicle application (Table 1). In contrast, ATP induced significant increases in  $[Ca^{2+}]_i$  in 99% of TM cells between  $10^{-6}$  and  $10^{-4}$  M (Table 1; Fig. 5). At lower concentrations, the percentage of response varied between 2% and 70% of the cells ( $10^{-10}$ - $10^{-7}$  M; Table 1), therefore ATP stimulation followed a sigmoidal dose-response curve with an  $EC_{50}$  of  $2.64 \times 10^{-8}$  M (Fig. 5H). Figure 5A shows a typical profile of  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization induced by ATP.  $[Ca^{2+}]_i$  increased rapidly to reach a peak and then decayed slowly to resting levels.  $[Ca^{2+}]_i$  peaks followed a dose-re-

**TABLE 1.** Effects of Purinergic Agonists and Antagonists on  $[Ca^{2+}]_i$  Levels in Cultured BTM Cells

Drug	Responder/Analyzed Cells (n)	Responder Cells (%)	Basal $[Ca^{2+}]_i$ (nM)	Peak $[Ca^{2+}]_i$ (nM)
Control (Vehicle)	7/275	3	64 $\pm$ 5	169 $\pm$ 19
ATP dose-response relationship				
10 <sup>-10</sup> M	2/122	2	76 $\pm$ 6	225 $\pm$ 51
10 <sup>-9</sup> M	11/96*	11	68 $\pm$ 8	128 $\pm$ 12
10 <sup>-8</sup> M	109/304*	36	84 $\pm$ 8	234 $\pm$ 7†
10 <sup>-7</sup> M	97/139*	70	87 $\pm$ 12	311 $\pm$ 11††
10 <sup>-6</sup> M	311/315*	99	64 $\pm$ 5	513 $\pm$ 12†††
10 <sup>-5</sup> M	128/129*	99	62 $\pm$ 9	567 $\pm$ 16†††
10 <sup>-4</sup> M	82/83*	99	79 $\pm$ 9	587 $\pm$ 17†††
Purinergic agonists and antagonists				
UTP 1 $\mu$ M	516/522	99	71 $\pm$ 3	414 $\pm$ 8§§
ADP 1 $\mu$ M	145/427‡‡	34	71 $\pm$ 5	339 $\pm$ 11§§
UDP 1 $\mu$ M	108/324‡‡	33	85 $\pm$ 5	314 $\pm$ 14§§
ATP- $\gamma$ S 1 $\mu$ M	414/438‡	95	72 $\pm$ 5	371 $\pm$ 7§§
2-MeS-ATP 1 $\mu$ M	29/106‡‡	27	63 $\pm$ 37	422 $\pm$ 40§
PPADS 10 $\mu$ M + ATP 1 $\mu$ M	320/332	96	64 $\pm$ 6	387 $\pm$ 10§§
Suramin 100 $\mu$ M + ATP 1 $\mu$ M	311/453‡‡	69	89 $\pm$ 11	386 $\pm$ 10§§
Intracellular mechanisms				
ATP 1 $\mu$ M (0 Ca <sup>2+</sup> )	456/464	98	81 $\pm$ 6	464 $\pm$ 8§§
ATP- $\gamma$ S 1 $\mu$ M (0 Ca <sup>2+</sup> )	113/116	97	70 $\pm$ 7	376 $\pm$ 18
Thapsigargin 1 $\mu$ M + ATP 1 $\mu$ M	6/233‡‡	3	151 $\pm$ 10	331 $\pm$ 47§
U73122 1 $\mu$ M + ATP 1 $\mu$ M	185/419‡‡	44	103 $\pm$ 14	324 $\pm$ 10§§
CPA 1 $\mu$ M + ATP 1 $\mu$ M	86/292‡‡	29	89 $\pm$ 15	338 $\pm$ 10§§
Ryanodine 1 $\mu$ M + ATP 1 $\mu$ M	171/176	97	52 $\pm$ 2	371 $\pm$ 14§§

$[Ca^{2+}]_i$  values are mean  $\pm$  SEM.  $[Ca^{2+}]_i$  peaks were considered significant when they were at least two times basal levels and means were calculated only in the responder cells. Comparisons between the proportion of responder cells in the control group and the ATP-treated groups (\*) were made using the Fisher exact test. Comparisons between the average  $[Ca^{2+}]_i$  peak elicited by BTM cells in the control group and in ATP-treated groups (†) were made using Student's unpaired *t*-test. \*  $P < 0.001$  by Fisher exact test. †  $P < 0.05$ , ††  $P < 0.01$  and †††  $P < 0.001$  by Student's unpaired *t*-test. Comparisons between the proportion of responder cells in the ATP 1  $\mu$ M-treated group and the other groups (‡) were made using the Fisher exact test. Comparisons between the average  $[Ca^{2+}]_i$  peak elicited by BTMs cells in the ATP 1  $\mu$ M-treated group and the other groups (§) were made using Student's unpaired *t*-test. ‡  $P < 0.01$ , ‡‡  $P < 0.001$  by the Fisher exact test. §  $P < 0.05$ , §§  $P < 0.001$  by Student's unpaired *t*-test.



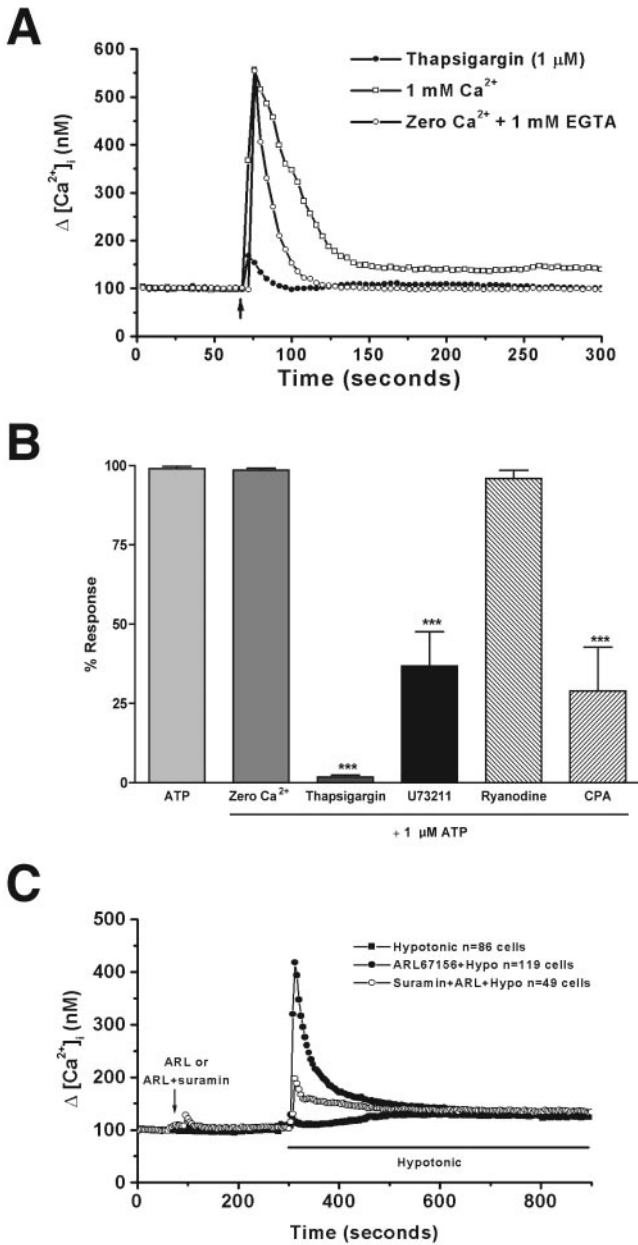
**FIGURE 5.**  $[Ca^{2+}]_i$  mobilizations induced by purinergic agonists in TM cells. Representative experiments of TM cells stimulated (arrow) with ATP (A), UTP (B), ADP (C), and UDP (D) at 1  $\mu$ M. The blocking effects of purinergic antagonists were tested in TM cells preincubated with suramin (100  $\mu$ M; E) or PPADS (10  $\mu$ M; F) and stimulated with ATP (1  $\mu$ M). (G) The percentage of cells (mean  $\pm$  SEM) responding to purinergic agonists. All compounds were tested at 1  $\mu$ M except suramin (100  $\mu$ M) and PPADS (10  $\mu$ M). (H) The ATP dose-response curve for  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization in TM cells (percentage of cells responding to ATP application). Significant differences were shown between the ADP, UDP, 2-MeS-ATP, and suramin+ATP groups versus the ATP group (\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001;  $t$ -test).

sponse curve with a maximum increase of  $587 \pm 17$  nM at  $10^{-4}$  M. To characterize further the receptors involved in the ATP response, we stimulated TM cells with different purinergic agonists and determined the response profile. UTP (1  $\mu$ M) like ATP at the same concentration, induced  $[Ca^{2+}]_i$  mobilizations in 99% of the cells (Table 1, Figs. 5B, 5G). Nevertheless, the diphosphate nucleotides (ADP and UDP; 1  $\mu$ M) increased  $[Ca^{2+}]_i$  in only 34% and 33% of the cells, respectively (Fig. 5C, 5D, 5G; Table 1;  $P$  < 0.01 vs. ATP). Also,  $[Ca^{2+}]_i$  peaks were smaller than the ones elicited by ATP (1  $\mu$ M). ATP- $\gamma$ -S (1  $\mu$ M), a nonhydrolyzable analogue, showed the same results as ATP. 2-MeS-ATP (1  $\mu$ M), an agonist for P2Y<sub>1</sub> and P2X receptors evoked  $[Ca^{2+}]_i$  mobilizations in 27% of TM cells ( $P$  < 0.001 vs. ATP; Fig. 5G, Table 1). Finally, we tested ATP application in the presence of well-known purinergic receptor antagonists (Table 1; Figs. 5E-G). In the presence of 100  $\mu$ M suramin, the percentage of response to ATP application decreased to 69% ( $P$  < 0.05 vs. ATP alone) while PPADS did not modify the percentage of responding cells to ATP when present in the bath solution. These results show a response profile to the different nucleotides as ATP $\approx$ UTP > ATP- $\gamma$ -S >> ADP $\approx$ UDP which suggests the presence of a P2Y<sub>2</sub> purinergic receptor. Moreover, as

described previously,<sup>37</sup> P2Y<sub>2</sub> receptors are partially inhibited by suramin but not by PPADS, which argues in favor of the presence of those receptors. Also, the effect of 2-MeS-ATP suggests the presence of P2Y<sub>1</sub> receptors.

We further examined the intracellular mechanisms involved in the ATP-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase in TM cells. In nominally  $Ca^{2+}$ -free solution (+1 mM EGTA), both ATP and ATP- $\gamma$ -S (1  $\mu$ M), stimulated the same percentage of cells as ATP in the normal buffer solution (Table 1). No differences were seen on intracellular  $Ca^{2+}$  peak amplitude compared with ATP in the presence of calcium. Nevertheless, recovery phase to resting  $[Ca^{2+}]_i$  was shorter than with ATP in normal buffer solution (Fig. 6A). An ATP-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase was prevented by preincubation of cells with thapsigargin ( $P$  < 0.001; Table 1, Figs. 6A, 6B). A significant decrease in the percentage of cells that had increased  $[Ca^{2+}]_i$  after ATP exposure was seen in the presence of U73122, an inhibitor of phospholipase C,<sup>38</sup> ( $P$  < 0.001) and CPA, a  $Ca^{2+}$ -ATPase inhibitor,<sup>39</sup> ( $P$  < 0.001), but not after preincubation with ryanodine.

As previously stated, hypotonic stimuli did not modify  $[Ca^{2+}]_i$ , which is inconsistent with release of ATP. To explore this possibility, we measured  $[Ca^{2+}]_i$  after a hypotonic stimuli.



**FIGURE 6.** Intracellular mechanisms involved in ATP signaling. (A) Representative experiments showing the effect of ATP 1 μM (arrow) in a TM cell incubated in physiologic solution (1 mM Ca<sup>2+</sup>), in the absence of external calcium, or with thapsigargin (1 μM). [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increased to a peak and then recovered to baseline. In the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>, the recovery phase was shortened. Intracellular Ca<sup>2+</sup> store depletion blocked the increase of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. (B) Percentage of cells (mean ± SEM) responding to ATP (1 μM) in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> or after preincubation with thapsigargin (1 μM), U73211 (1 μM), ryanodine (1 μM), or CPA (1 μM). Significant differences were shown between the thapsigargin, U73211, and CPA groups versus the ATP group (\*\*\*) *P* < 0.001. (C) Effects of hypotonic shock on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Shown are data for hypotonic shock (206 mOsm/kg) alone, hypotonic+ARL67156 (inhibitor of nucleotidases; 100 μM), and hypotonic+ARL67156+suramin (100 μM). Mean Ca<sup>2+</sup> peaks are shown. SEM was omitted for clarity.

Hypotonic solution alone (hypo 40%) did not increase [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (129 ± 3 nM; *n* = 86 cells; Fig. 6C) in TM cells, but when the experiments were performed in the presence of an inhibitor of the nucleotidases (ARL67156; 100 μM), application of hypotonic solution elicited peaks (418 ± 97 nM; *n* = 119 cells)

similar to the ones obtained with ATP (Fig. 6C). Ca<sup>2+</sup> peaks elicited by hypotonic stimuli in the presence of ARL67156 were blocked by suramin (100 μM).

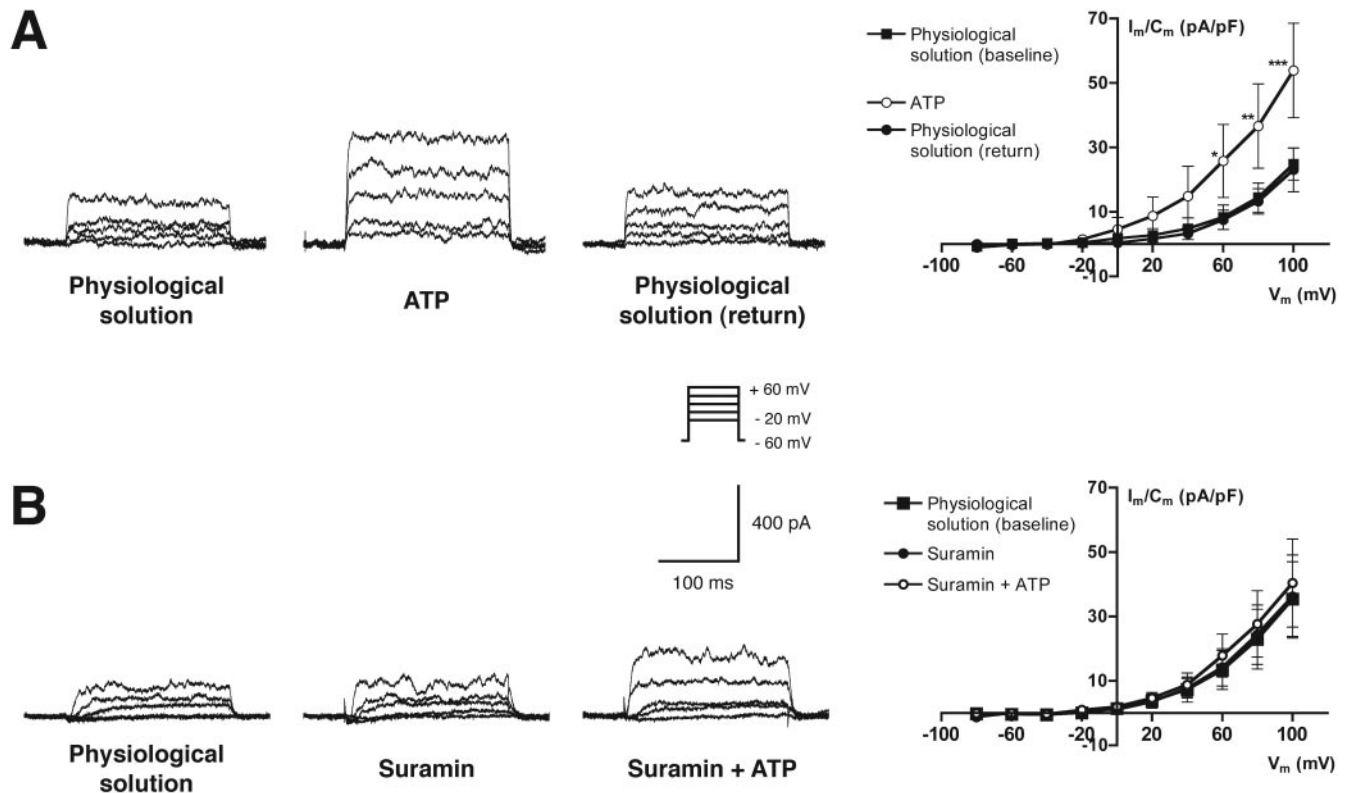
### ATP Increases BK<sub>Ca</sub> Current

One of the possible ATP functions after activation of purinergic receptors, in particular, would be to increase K<sup>+</sup> efflux from the cell thus contributing to cell volume recovery. We performed experiments to test this hypothesis using the whole-cell perforated patch technique, which prevents dialysis of intracellular content. After achieving this configuration, we clamped TM cells at -60 mV and BK<sub>Ca</sub> currents were recorded in resting conditions with a physiological solution in the bath (*n* = 6; Fig. 7A). Superfusion of ATP at 10 μM significantly increased BK<sub>Ca</sub> currents along the I-V relationship (ANOVA *P* < 0.001 vs. baseline physiological solution) in seven (78%) of nine cells tested. Bonferroni posttests showed significant differences at +60 (*P* < 0.05), +80 (*P* < 0.01), and +100 (*P* < 0.001) mV versus the baseline recording. After drug washout, BK<sub>Ca</sub> currents returned to baseline values, as can be seen in the recording and I-V plot displayed in Figure 7A. Next, we performed experiments in the presence of suramin (100 μM; *n* = 5; Fig. 7B) to test the receptor-mediated effect of ATP. After recording BK<sub>Ca</sub> currents in physiological solution (baseline) and in the presence of suramin (no effect was seen in the presence of suramin alone), we applied ATP at the same concentration as that used in the previous experiment. In the presence of the blocker, ATP induced a slight nonsignificant increase in BK<sub>Ca</sub> currents (Fig. 7B). These results confirm that the effects on BK<sub>Ca</sub> currents are mediated through activation of specific purinergic receptors present in TM cells.

### Participation of RVD Mechanisms in Outflow Facility Modulation

It has been reported that hypotonic medium decreases outflow facility.<sup>2,3</sup> In the current study, we perfused eye anterior segments (*n* = 6) for 90 minutes, to establish baseline outflow facility and therefore isotonic perfusion medium (301 ± 1 mOsm/kg) was replaced with a hypotonic one (244 ± 2 mOsm/kg) and maintained during 360 minutes (Fig. 8A). This moderate hypotonic shock decreased outflow facility significantly at 15 minutes (20%, *P* < 0.001; Fig. 8), and then it recovered gradually to baseline levels (3% over baseline outflow facility, *t*-test, NS). The results obtained permitted us to hypothesize that outflow facility is closely linked to TM cell volume and that RVD mechanisms may contribute to recovery of outflow facility after hypotonic shock or other insults that may affect cell volume. We tested this hypothesis by adding drugs known to block or activate selectively the ionic channels that participate in RVD mechanisms. Anterior segments (*n* = 6) perfused in the presence of 100 μM tamoxifen showed a more pronounced decrease in outflow facility (25%, *P* < 0.001) after 15 minutes in hypotonic medium compared with the perfusions with hypotonic medium alone (Figs. 8A, 8B). More interesting, they did not recover baseline outflow facility even after 360 minutes (12% below baseline values; *P* < 0.001 vs. hypotonic medium). Similar results were obtained when hypotonic medium was supplemented with IBTX (10 nM). When both drugs (IBTX and tamoxifen) were added together (*n* = 6), not only was the initial decrease in outflow facility more pronounced than in the previous groups (34%, *P* < 0.001), but the recovery phase was the slowest. After 360 minutes, outflow facility was still 17% below baseline (*P* < 0.001). On the contrary, perfusion with hypotonic medium plus a BK<sub>Ca</sub> channel opener (NS1619; 30 μM, *n* = 6) showed opposite results. The initial decrease in outflow facility was smaller than in hypotonic medium alone (14%, *P* < 0.001) and recovery to





**FIGURE 7.** ATP increased BK<sub>Ca</sub> currents.  $V_h = -60$  mV in both experiments. **(A)** *Left:* representative experiment showing whole-cell BK<sub>Ca</sub> currents in a TM cell in resting conditions (physiological solution), in the presence of ATP (10  $\mu$ M), and after washing the drug (return). *Right:* current/voltage curve showing outward BK<sub>Ca</sub> currents of TM cells in the whole-cell configuration ( $n = 6$ ). Currents are expressed as current densities (pA/pF). Shown are data for resting conditions (physiological solution), ATP (10  $\mu$ M), and return to physiological solution. BK<sub>Ca</sub> current increased significantly (ANOVA,  $P < 0.001$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  for ATP versus physiological solution (Bonferroni posttest). **(B)** *Left:* representative experiment showing whole-cell BK<sub>Ca</sub> currents in a TM cell in resting conditions (physiological solution), in the presence of suramin (100  $\mu$ M), and after addition of ATP (10  $\mu$ M). *Right:* current-voltage curve showing outward BK<sub>Ca</sub> currents of TM cells in the whole-cell configuration ( $n = 5$ ). Currents are expressed as current densities (pA/pF). Data are shown for resting conditions (physiological solution), suramin, and suramin+ATP. Suramin blocked the ATP-induced increase in BK<sub>Ca</sub> current.

baseline was faster than in the absence of the drug. In fact, outflow facility achieved baseline within  $\approx 45$  minutes after hypotonic shock (Figs. 8A, 8B).

## DISCUSSION

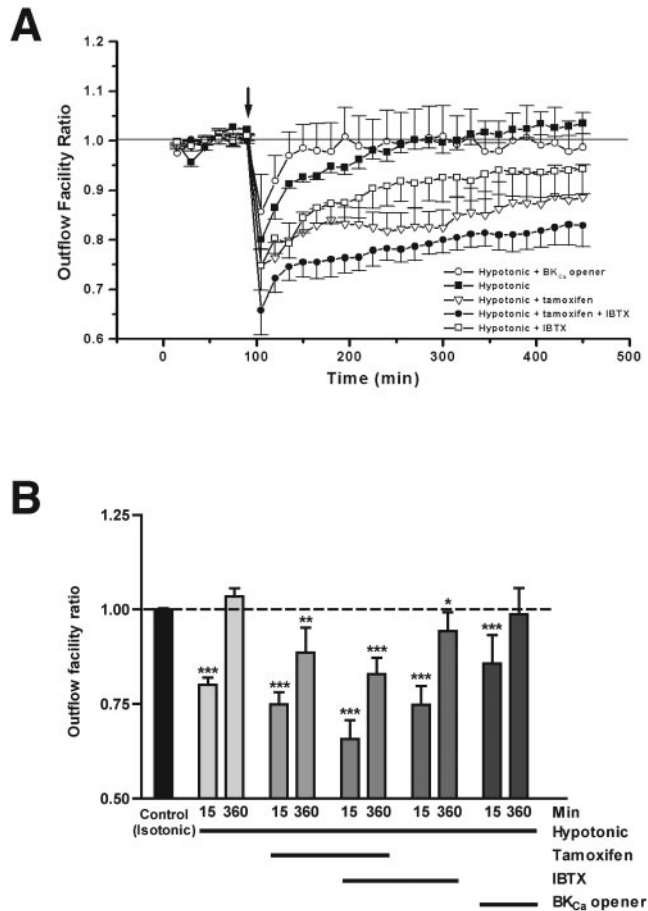
In this study, cellular mechanisms involved in TM cell volume regulation were essential in determining AH outflow facility. We put together data from the cellular level with measurements of AH evacuation showing that modulation of certain channels or receptors may have a great influence on outflow facility.

Different factors have been involved in modulating outflow resistance through the TM (see the introduction).<sup>40</sup> Several studies<sup>2,3,17,19</sup> have focused on the changes in TM cell volume, since previous data from our laboratory<sup>3</sup> and others<sup>2,3,19</sup> have shown that osmolality changes in the perfusion medium evoke swelling or shrinkage of TM cells that modify outflow facility. Also, it has been reported that TM cells trigger an RVD mechanism in response to osmotic insults that may be involved in outflow facility modulation.<sup>19</sup> In fact, several different membrane proteins that are thought to participate in cell volume regulation have been identified in TM cells, such as the BK<sub>Ca</sub> channel,<sup>6,26</sup> a Cl<sup>-</sup><sub>swell</sub> channel,<sup>19</sup> an Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> symport,<sup>17</sup> an Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport,<sup>41</sup> a K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> symport,<sup>19</sup> and a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger.<sup>19</sup> Moreover, other mechanisms such as ATP release

from nerve terminals or due to cell swelling may also be involved in cell volume regulation.<sup>23,25</sup>

AH appears to be slightly more hypertonic than plasma,<sup>42,43</sup> and it is likely that changes in AH tonicity influence TM cell volume, although they have not been described to date. More important may be drug-induced changes in TM cell volume (e.g., norepinephrine and adenosine agonists).<sup>17,40,44</sup> O'Donnell et al.<sup>17</sup> showed that bumetanide, ethacrynic acid, 8Br-cAMP, and 8Br-cGMP among others, decreases volume in cultured TM cells through inhibition of the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> symport. In contrast, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) increases cell volume. Bumetanide also increases outflow facility in human and calf eyes.<sup>2</sup> Moreover, it has been reported recently that adenosine receptor agonists cause cell shrinkage in TM cells, probably because of Ca<sup>2+</sup> influx and Cl<sup>-</sup> efflux.<sup>40</sup> In fact, the adenosine agonist cyclohexyladenosine (CHA) has been reported to increase outflow facility in rabbit eyes,<sup>45</sup> but it is unknown whether this effect is due to changes in cell volume in the TM. All these results seem to agree that TM cell shrinkage increases outflow facility, whereas cell swelling decreases it, as previously reported by changing perfusate osmolality.<sup>2,3</sup>

Our results show cell swelling activates two ionic conductances: a BK<sub>Ca</sub> and a Cl<sub>swell</sub>. As described in several cell types, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> effluxes are accompanied by water to restore normal cell volume (RVD).<sup>23,25</sup> In particular, BK<sub>Ca</sub> currents had an approximately threefold increase over the resting values in



**FIGURE 8.** Influence of RVD mechanisms on modulation of outflow facility. (A) Outflow facility ratio (normalized with baseline outflow facility) is plotted against time. Anterior segments were perfused with control medium (DMEM) for 90 minutes (baseline), and then perfusion medium was replaced (arrow) by hypotonic DMEM with or without drugs, and the solution was maintained until the end of the experiment. Data are shown for hypotonic ( $n = 6$ ), hypotonic+tamoxifen ( $100 \mu\text{M}$ ,  $n = 6$ ), hypotonic+tamoxifen+IBTX ( $10 \text{ nM}$ ,  $n = 6$ ), hypotonic+BK<sub>Ca</sub> opener (NS1619,  $30 \mu\text{M}$ ,  $n = 6$ ), and hypotonic+IBTX ( $10 \text{ nM}$ ,  $n = 6$ ). The initial decrease in outflow facility was reversed in the presence of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channel blockers. Also, recovery phase to baseline was impaired in the presence of the blockers. On the contrary, the BK<sub>Ca</sub> channel opener decreased the initial decline in outflow facility in hypotonic medium and shortened the recovery phase. (B) Mean  $\pm$  SEM outflow facility ratios measured after 15 minutes in the hypotonic medium (or hypotonic medium+drugs) and after 360 minutes of perfusion in hypotonic medium. Time after 15 minutes is representative of the initial decrease in outflow facility due to hypotonic medium. Measures after 360 minutes in hypotonic medium are representative of the recovery phase. Significant differences ( $t$ -tests) are shown between each group and the control group (baseline in isotonic medium): \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

isotonic medium. Cell swelling activated Cl<sub>swell</sub> as soon as 4 minutes after bath exchange to hypotonic medium and reached a maximum between 10 and 12 minutes. Cl<sub>swell</sub> currents decreased when returning to isotonic medium (Fig. 1B) showing that their activation is a reversible process. Also, the effects of well-known blockers (tamoxifen and DIDS) of Cl<sub>swell</sub> currents and their ionic selectivity are in agreement with previous reports in TM cells<sup>19</sup> and other cell types.<sup>35</sup> Special mention should be made to the effects of extracellular ATP on Cl<sub>swell</sub> currents. After activation by hypotonicity, addition of ATP to the recording bath partially blocked Cl<sub>swell</sub> currents

(Fig. 3C). This effect has also been previously described,<sup>46,47</sup> but its physiological relevance is unknown. We have also found, as previously reported (Cui M, et al. *IOVS* 2001;42:ARVO Abstract 743),<sup>40</sup> that hypotonic stimuli trigger the release of ATP from TM cells. ATP, through activation of purinergic receptors, increased BK<sub>Ca</sub> currents (Fig. 7), perhaps contributing to the RVD. Nevertheless, the increase of ATP concentration in the extracellular environment may be part of a physiological mechanism to prevent excessive activation of Cl<sub>swell</sub> currents, since the blocking effect is only at high concentrations (in the millimolar range) but not at lower concentrations (micromolar) where the effect is to stimulate BK<sub>Ca</sub> currents. It should be mentioned that in the absence of hypotonic stimulus, ATP (in micromolar concentrations) activates Cl<sub>swell</sub> currents in TM cells (data not shown) as seen in other studies.<sup>48</sup> We should note that ATP can be released due to mechanical stimulation in TM cells (Cui M, et al. *IOVS* 2001;42:ARVO Abstract 743)<sup>36</sup> or can reach the TM after being released in the AH by different ocular tissues and nerves (Fleiszig SMJ, et al. *IOVS* 2001;42:ARVO Abstract 3146).<sup>49,50</sup> Also, we cannot exclude that ATP can be liberated on cell stimulation with several agonists, as seen in other cell types.<sup>36</sup> Therefore, it can be hypothesized that ATP acts in an auto-crine/paracrine manner in the TM, regulating outflow facility by volume changes in TM cells. Moreover, Fleischhauer et al.<sup>40</sup> have recently shown that released ATP may be a source of adenosine and that adenosine agonists reduce TM cell volume.

Results obtained in the present study coincide with a profile for a P2Y<sub>2</sub> receptor. The presence of this receptor has been suggested (Cui M, et al. *IOVS* 2001;42:ARVO Abstract 743), and its activation leads to stimulation of phospholipase C, release of calcium from intracellular stores (IP<sub>3</sub>-sensitive), and sustained influx of extracellular Ca<sup>2+</sup> (Fig. 6). The characteristics of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mobilization triggered by ATP and UTP are similar to the ones induced by other drugs such as bradykinin,<sup>4</sup> carbachol,<sup>51</sup> or adenosine agonists.<sup>40</sup>

As previously mentioned, ATP stimulation of TM cells increased BK<sub>Ca</sub> currents. This effect was partially blocked in the presence of suramin, implying a receptor-mediated mechanism. It is possible that BK<sub>Ca</sub>s were stimulated directly due to the increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, but it is also possible that purinergic receptor stimulation triggers an intracellular cascade of second messengers to activate BK<sub>Ca</sub>s, probably through PKC. These two possibilities, which remain to be tested, are not exclusive, and both may be involved in the same final effect on BK<sub>Ca</sub>s. Of note, ATP released by hypotonic stimuli did not increase [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in TM cells, probably due to a rapid degradation of this nucleotide by nucleotidases. Experiments performed with an inhibitor of nucleotidases in the hypotonic solution showed Ca<sup>2+</sup> peaks with characteristics similar to the ones elicited by ATP. This fact suggests that in cultured cells ATP is rapidly cleaved but in vivo locally released ATP may be sufficient to stimulate purinergic receptors and activate BK<sub>Ca</sub> currents. Further investigation should be conducted to describe the transduction pathway. In this study, BK<sub>Ca</sub>s were involved in ATP signaling and volume regulation, but they have also been shown to mediate the effects of purinergic agonists,<sup>40</sup> nitric oxide,<sup>26</sup> tyrosine kinase,<sup>52</sup> and flufenamic acid<sup>53</sup> and to detect membrane stretching.<sup>6</sup> Therefore, BK<sub>Ca</sub>s play a central role in many processes in TM cells, probably regulating the contractile state and cellular volume. Taken together, these effects would finally regulate the AH outflow through the TM.

Hypotonic solutions decrease outflow facility<sup>2,3</sup> and after an initial decline (Fig. 8), this parameter recovers to achieve baseline levels within  $\approx 2$  hours, probably due to an RVD mechanism in TM cells, as shown by Mitchell et al.<sup>19</sup> Outflow facility did not recover in the presence of tamoxifen, a Cl<sub>swell</sub> blocker, and/or IBTX, a BK<sub>Ca</sub> blocker. The initial decrease in

outflow facility after 15 minutes in hypotonic medium is even greater in the presence of  $\text{Cl}^-$  and  $\text{K}^+$  blockers (Figs. 8A, 8B) suggesting that RVD quickly activates to recover cell volume, which shows a direct correlation with outflow facility values. The opposite occurs when using NS1619, a  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  activator, the initial decrease in outflow facility is smaller and the time to recover baseline values is shorter. Therefore, activators of  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ s may exert a protective effect against osmotic insults or drugs that modify cellular volume.<sup>40</sup> It may also be possible that activators of  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ s like nitric oxide or cGMP may be endogenously released to modulate outflow facility, although further investigations are necessary to test this hypothesis. Finally, specific activators of  $\text{Cl}_{\text{swell}}$  (unknown to date with the exception of ATP at low concentrations<sup>48</sup>) would also be interesting molecules to modulate outflow facility. Because TM function can be modulated by changes in cell volume, selective drugs targeting cell volume regulatory mechanisms would increase outflow facility without damaging either the cells or the extracellular matrix. The present results and others<sup>17,19,20,40,44,53</sup> support this idea.

In summary, our findings show that cellular mechanisms that regulate cell volume in TM cells play an important role in outflow facility regulation. In particular,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$  channel activation is directly involved in the recovery of baseline outflow facility after hypotonic shock. Therefore, cell volume regulation appears to be part of the homeostatic mechanisms involved in the regulation of the outflow pathway, actively contributing to TM function.

### Acknowledgments

The authors thank Pablo Perez de la Ossa for advice and assistance in the LDH determinations.

### References

1. Wiederholt M, Stumpff F. The trabecular meshwork and aqueous humor reabsorption. In: Civan MM, ed. *The Eye's Aqueous Humor: From Secretion to Glaucoma*. New York: Academic Press; 1998:163-201.
2. Al-Aswad LA, Gong H, Lee D, et al. Effects of Na-K-2Cl cotransport regulators on outflow facility in calf and human eyes in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:1695-1701.
3. Gual A, Llobet A, Gilbert R, et al. Effects of time of storage, albumin, and osmolality changes on outflow facility (C) of bovine anterior segment in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:2165-2171.
4. Llobet A, Gual A, Pales J, Barraquer R, Tobias E, Nicolas JM. Bradykinin decreases outflow facility in perfused anterior segments and induces shape changes in passaged BTM cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:113-125.
5. Wiederholt M, Thieme H, Stumpff F. The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Prog Retin Eye Res*. 2000;19:271-295.
6. Gasull X, Ferrer E, Llobet A, et al. Cell membrane stretch modulates the high-conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel in bovine trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:706-714.
7. Tian B, Geiger B, Epstein DL, Kaufman PL. Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:619-623.
8. Johnson M, Erickson KA. Mechanisms and routes of aqueous humor drainage. In: Albert DM, Jakobiec FA, eds. *Principles and Practice of Ophthalmology*. Philadelphia: WB Saunders; 2000:2577-2795.
9. Lütjen-Drecoll E, Rohen JW. Morphology of aqueous outflow pathways in normal and glaucomatous eyes. In: Ritch R, Shields MB, Krupin T, eds. *The Glaucomas*. St. Louis: Mosby; 1996:89-123.
10. Johnson M, Chan D, Read AT, Christensen C, Sit A, Ethier CR. The pore density in the inner wall endothelium of Schlemm's canal of glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:2950-2955.
11. Johnson M, Shapiro A, Ethier CR, Kamm RD. Modulation of outflow resistance by the pores of the inner wall endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33:1670-1675.
12. Borrás T. Gene expression in the trabecular meshwork and the influence of intraocular pressure. *Prog Retin Eye Res*. 2003;22:435-463.
13. Gonzalez P, Epstein DL, Borrás T. Genes upregulated in the human trabecular meshwork in response to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:352-361.
14. Vittitow JL, Garg R, Rowlette LL, Epstein DL, O'Brien ET, Borrás T. Gene transfer of dominant-negative RhoA increases outflow facility in perfused human anterior segment cultures. *Mol Vis*. 2002;8:32-44.
15. Gills JP, Roberts BC, Epstein DL. Microtubule disruption leads to cellular contraction in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:653-658.
16. Tumminia SJ, Mitton KP, Arora J, Zelenka P, Epstein DL, Russell P. Mechanical stretch alters the actin cytoskeletal network and signal transduction in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:1361-1371.
17. O'Donnell ME, Brandt JD, Curry FR. Na-K-Cl cotransport regulates intracellular volume and monolayer permeability of trabecular meshwork cells. *Am J Physiol*. 1995;268:C1067-C1074.
18. Lütjen-Drecoll E. Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes. *Prog Retin Eye Res*. 1999;18:91-119.
19. Mitchell CH, Fleischhauer JC, Stamer WD, Peterson-Yantorno K, Civan MM. Human trabecular meshwork cell volume regulation. *Am J Physiol*. 2002;283:C315-C326.
20. Gabelt BT, Wiederholt M, Clark AF, Kaufman PL. Anterior segment physiology after bumetanide inhibition of Na-K-Cl cotransport. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:1700-1707.
21. Avila MY, Seidler RW, Stone RA, Civan MM. Inhibitors of NHE-1  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange reduce mouse intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:1897-1902.
22. Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E, Haussinger D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 1998;78:247-306.
23. Okada Y. *Cell Volume Regulation: The Molecular Mechanism and Volume Sensing Machinery*. Amsterdam: Elsevier; 1998.
24. Hoffmann EK, Simonsen LO. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev*. 1989;69:315-382.
25. Okada Y, Maeno E, Shimizu T, Dezaki K, Wang J, Morishima S. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol*. 2001;532:3-16.
26. Stumpff F, Strauss O, Boxberger M, Wiederholt M. Characterization of maxi-K-channels in bovine trabecular meshwork and their activation by cyclic guanosine monophosphate. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:1883-1892.
27. Stamer WD, Seftor RE, Williams SK, Samaha HA, Snyder RW. Isolation and culture of human trabecular meshwork cells by extracellular matrix digestion. *Curr Eye Res*. 1995;14:611-617.
28. Bataller R, Nicolas JM, Gines P, et al. Arginine vasopressin induces contraction and stimulates growth of cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 1997;113:615-624.
29. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260:3440-3450.
30. Vassault A. Lactate dehydrogenase. UV-method with pyruvate and NADH. In: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grabl M, eds. *Methods of Enzymatic Analysis*. Basel, Switzerland: Verlag Chemie; 1981:118-126.
31. Bond TD, Ambikapathy S, Mohammad S, Valverde MA. Osmosensitive  $\text{Cl}^-$  currents and their relevance to regulatory volume decrease in human intestinal T84 cells: outwardly vs. inwardly rectifying currents. *J Physiol*. 1998;511:45-54.
32. von Weikersthal SF, Barrand MA, Hladky SB. Functional and molecular characterization of a volume-sensitive chloride current in rat brain endothelial cells. *J Physiol*. 1999;516:75-84.
33. Schmid A, Blum R, Krause E. Characterization of cell volume-sensitive chloride currents in freshly prepared and cultured pan-

- creatic acinar cells from early postnatal rats. *J Physiol.* 1998;513:453-465.
34. Gosling M, Smith JW, Poyner DR. Characterization of a volume-sensitive chloride current in rat osteoblast-like (ROS 17/2.8) cells. *J Physiol.* 1995;485:671-682.
  35. Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.* 2002;82:503-568.
  36. Joseph SM, Buchakjian MR, Dubyak GR. Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J Biol Chem.* 2003;278:23331-23342.
  37. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998;50:413-492.
  38. Bleasdale JE, Bundy GL, Bunting S, et al. Inhibition of phospholipase C dependent processes by U-73122. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1989;19:590-593.
  39. Seidler NW, Jona I, Vegh M, Martonosi A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1989;264:17816-17823.
  40. Fleischhauer JC, Mitchell CH, Stamer WD, Karl MO, Peterson-Yantorno K, Civan MM. Common actions of adenosine receptor agonists in modulating human trabecular meshwork cell transport. *J Membr Biol.* 2003;193:121-136.
  41. Chu TC, Keith C, Green K. Intracellular pH regulation by a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in cultured bovine trabecular cells. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1992;70:772-779.
  42. Kinsey VE. The chemical composition and the osmotic pressure of the aqueous humor and plasma of the rabbit. *J Gen Physiol.* 1950;34:389-402.
  43. Benham GH, Duke-Elder WS, Hodgson TH. The osmotic pressure of the aqueous humor in the normal and glaucomatous eye. *J Physiol.* 1938;92:355-360.
  44. Putney LK, Vibat CR, O'Donnell ME. Intracellular Cl regulates Na-K-Cl cotransport activity in human trabecular meshwork cells. *Am J Physiol.* 1999;277:C373-C383.
  45. Crosson CE. Intraocular pressure responses to the adenosine agonist cyclohexyladenosine: evidence for a dual mechanism of action. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:1837-1840.
  46. Sabirov RZ, Dutta AK, Okada Y. Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J Gen Physiol.* 2001;118:251-266.
  47. Perez-Samartin AL, Miledi R, Arellano RO. Activation of volume-regulated Cl<sup>-</sup> channels by ACh and ATP in *Xenopus* follicles. *J Physiol.* 2000;525:721-734.
  48. Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, Feighan D, MacVicar BA. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J Neurophysiol.* 2003;89:1870-1877.
  49. Mitchell CH, Carre DA, McGlenn AM, Stone RA, Civan MM. A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:7174-7178.
  50. Maul E, Sears M. ATP is released into the rabbit eye by antidromic stimulation of the trigeminal nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1979;18:256-262.
  51. Tanihara H, Ohuchi T, Yoshimura N, Negishi M, Ito S. Heterogeneous response in calcium signaling by adrenergic and cholinergic stimulation in cultured bovine trabecular cells. *Exp Eye Res.* 1991;52:393-396.
  52. Stumpff F, Que Y, Boxberger M, Strauss O, Wiederholt M. Stimulation of maxi-K channels in trabecular meshwork by tyrosine kinase inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:1404-1417.
  53. Stumpff F, Boxberger M, Thieme H, Strauss O, Wiederholt M. Flufenamic acid enhances current through maxi-K channels in the trabecular meshwork of the eye. *Curr Eye Res.* 2001;22:427-437.

## **Resums dels resultats**

---

## Resums dels resultats que formen part de la present Tesi Doctoral

En humans, l'humor aquós que omple les cambres anterior i posterior del globus ocular es drena majoritàriament a través de la xarxa trabecular i el canal d'Schlemm, que constitueixen la via d'evacuació convencional. L'equilibri entre la formació i l'evacuació de l'humor aquós determina la pressió intraocular (IOP) de tal manera que quan l'evacuació de l'humor aquós resulta impedida, la IOP incrementa sent un dels principals factors de risc per desenvolupar glaucoma (Weinreb and Khaw, 2004). La xarxa trabecular és el teixit que regula de manera activa la resistència que ofereix al pas de l'humor aquós mitjançant diferents mecanismes. Fins ara s'han descrit processos com la contracció i relaxació (Wiederholt et al., 2000), la remodelació de la matriu extracel·lular (Yue, 1996), canvis en l'expressió de gens (Borrás, 2003a), la reorganització del citoesquelet (Wax et al., 2000), la pressió mecànica (Gasull et al., 2003) i el correcte manteniment de la forma i el volum (Gual et al., 1997; Mitchell et al., 2002) de les cèl·lules trabeculars, que podrien actuar de manera coordinada per modular l'evacuació de l'humor aquós.

Prèviament ha estat descrit que la disminució del volum de les cèl·lules trabeculars incrementa l'evacuació per l'augment dels espais intercel·lulars per on es drena l'humor aquós, mentre que l'augment del volum cel·lular disminueix el drenatge del fluid (Gual et al., 1997). També s'ha descrit que les cèl·lules trabeculars presenten un mecanisme de regulació del volum conegut amb el nom de *regulatory volume decrease* (RVD) que s'activa amb l'augment del volum cel·lular (Mitchell et al., 2002). Aquest mecanisme és una propietat universal de les cèl·lules dels vertebrats que permet a les cèl·lules recuperar el seu volum inicial amb l'eflux d'ions  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$  i osmòlits orgànics i la sortida passiva d'aigua (Okada et al., 2001). A les cèl·lules trabeculars les conductàncies implicades en aquest mecanisme estan mitjançades, com a mínim, per l'activació d'un canal de  $\text{Cl}^-$  activat per l'augment de volum i el simport  $\text{K}^+-\text{Cl}^-$  (Mitchell et al., 2002).

## Article 1 (Experimental Eye Research; 80 (2005) 801–813)

En aquest treball s'ha determinat l'expressió dels canals de  $\text{Cl}^-$  dependents de voltatge de la família CLC a les cèl·lules trabeculars. Aquests canals, formen part d'una de les famílies de canals de  $\text{Cl}^-$  més estudiades a nivell molecular (Jentsch et al., 2005) i podrien tenir funcions rellevants a les cèl·lules trabeculars. Amb la tècnica de RT-PCR utilitzant mRNA de cèl·lules trabeculars humanes en cultiu s'ha detectat l'expressió dels canals de CIC-2, CIC-3, CIC-4, CIC-5, CIC-6 i CIC-7. L'expressió del canal CIC-1, típic de múscul esquelètic, no s'ha detectat en aquestes cèl·lules. L'expressió de sis dels set canals d'aquesta família a la xarxa trabecular permet hipotetitzar que podrien ser importants a nivell funcional.

Amb la tècnica de RT-PCR relativa quantitativa i utilitzant rRNA de la subunitat ribosòmica 18S com a control intern, s'han quantificat els nivells d'expressió relativa dels canals. Comparant l'abundància relativa dels diferents canals, el CIC-4 i el CIC-5 són els que menys s'expressen, el CIC-6 i el CIC-7 presenten una expressió similar i intermèdia mentre que el CIC-2 i el CIC-3 presenten la major expressió a les cèl·lules trabeculars.

S'ha suggerit la implicació del canal CIC-2 en mecanismes de regulació del volum cel·lular ja que la seva activitat es modula per l'augment del volum induït per hipotonicitat (Gründer et al., 1992). No obstant, diferents treballs permeten especular que la col·laboració del CIC-2 en la regulació del volum podria dependre del tipus cel·lular. Així, s'ha descrit que el canal CIC-2 podria tenir un paper rellevant en la regulació del volum quan s'expressa de manera heteròloga (Furukawa et al., 1998), i podria estar col·laborant amb altres transportadors en aquest mecanisme a les cèl·lules de glioma humà (Ernest et al., 2005) mentre que no està implicat en regular el volum a les cèl·lules intestinals T<sub>84</sub> (Bond et al., 1998a). D'altra banda, es va suggerir la relació entre el CIC-3 i els corrents de Cl<sup>-</sup> activats per l'augment del volum (ICl<sub>swell</sub>) (Duan et al., 1997), tot i que posteriorment s'ha demostrat que aquest canal no és responsable d'ICl<sub>swell</sub> ni de la regulació del volum cel·lular (Weylandt et al., 2001). A més a més, ha estat descrit que el CIC-3 es localitza a les membranes intracel·lulars d'endosomes, lisosomes i vesícules sinàptiques col·laborant en la seva acidificació (Stobrawa et al., 2001). Aquest canal podria tenir un paper important a les cèl·lules trabeculars que tenen una gran activitat fagocítica i secretora per tal de mantenir la composició de la complexa matriu extracel·lular on es troben insertades. Per tot això, s'han quantificat els canvis en els nivells d'expressió dels canals CIC-2 i CIC-3 en condicions hipotòniques i en condicions relacionades amb la patologia del glaucoma com el tractament amb dexametasona (DEX) i l'aplicació d'elevada pressió intraocular (IOP). Els canvis en els nivells d'expressió dels gens en determinades condicions experimentals permeten especular sobre el seu possible rol funcional en aquestes situacions.

El tractament de les cèl·lules trabeculars humanes en cultiu amb una solució hipotònica del 20% indueix una sobreexpressió significativa de CIC-2 als 15, 30 i 120 minuts. Per tant, l'expressió del canal CIC-2, que en alguns tipus cel·lulars ha estat implicat en regulació del volum, respon a l'increment del volum cel·lular amb un augment en la seva expressió. En canvi, l'expressió de CIC-3, que podria ser important en l'activitat de les vies endosomal i lisosomal de les cèl·lules trabeculars, no augmenta de manera significativa per l'augment del volum induït per hipotonicitat.

El tractament de les cèl·lules trabeculars humanes en cultiu amb DEX durant 1, 4 o 10 dies provoca una disminució de l'expressió del canal CIC-3. Aquest fet suggereix la importància del canal en el correcte funcionament de la xarxa trabecular i la seva possible relació amb la fisiopatologia del glaucoma. El nivell d'expressió del canal CIC-2 no presenta canvis significatius, encara que també té una certa tendència a disminuir la seva expressió.

Els experiments amb segments anteriors oculars perfundits a IOP elevada mostren que la resposta dels canals CIC-2 i CIC-3 als increments de pressió varia depenent de l'individu. La variabilitat interindividual en l'expressió gènica ha estat reduïda utilitzant parelles de segments oculars, de manera que el segment anterior contralateral provinent del mateix individu s'ha utilitzat com a control per comparar-lo amb el segment anterior sotmès a elevada pressió. Així, tot i la variabilitat interindividual, la tendència en els canvis dels nivells d'expressió com a resposta a l'elevada IOP es manté en els sis individus testats. Els experiments revelen una sobreexpressió major de CIC-2 en relació a CIC-3 després d'una hora a alta pressió. L'expressió de CIC-3, en canvi, s'indueix de manera més significativa que el CIC-2 al cap de 4 i 7 dies amb elevada IOP. Els resultats indiquen que ambdós canals podrien respondre als increments de pressió i suggereixen que podrien col·laborar en un mecanisme homeostàtic per regular l'evacuació de l'humor aquós en condicions d'elevada IOP.

#### Article 2 (En preparació)

Els corrents de  $\text{Cl}^-$  modulats per augments de volum cel·lular podrien estar implicats en mecanismes de regulació del volum i per tant ser importants en la modulació de l'evacuació de l'humor aquós. En aquest treball s'han caracteritzat electrofisiològicament corrents de  $\text{Cl}^-$  activats per hiperpolarització i modulats per l'augment del volum a les cel·lules trabeculars amb la tècnica de *patch clamp* en la configuració de *whole-cell*. Els corrents de membrana es registren utilitzant solucions selectives per l'ió clorur ( $\text{Cl}^-$ ) i polsos de voltatge des de -120 fins a +40 mV des d'un potencial de membrana a 0 mV. En aplicar el protocol de polsos hiperpolaritzants s'observa una lleugera activació de corrents que augmenten de manera significativa en aplicar un pols hiperpolaritzant de 30 segons a -120 mV prèviament al protocol de polsos. Aquests corrents activats per un pre-pols hiperpolaritzant llarg presenten una dependència al temps i al voltatge.

El corrent identificat s'activa lentament als potencials hiperpolaritzants mentre que presenta una baixa activitat als potencials despolaritzants. El  $\text{Cd}^{2+}$  extracel·lular inhibeix aquest corrent de manera significativa tant a les cèl·lules trabeculars bovines com humanes. El corrent activat per hiperpolarització i sensible a  $\text{Cd}^{2+}$  presenta una clara rectificació d'entrada. La seva seqüència de permeabilitats aniòniques a les cèl·lules trabeculars bovines és  $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$ . Les característiques biofísiques i farmacològiques d'aquest corrent activat a les cèl·lules trabeculars coincideixen amb el corrent de  $\text{Cl}^-$  generat en expressar de manera heteròloga el canal de  $\text{Cl}^-$  dependent de voltatge CIC-2 en oòcits de *Xenopus* (Gründer et al., 1992; Jordt and Jentsch, 1997; Thiemann et al., 1992). A més a més, corrents amb característiques similars han estat descrits en altres tipus cel·lulars (Bond et al., 1998a; Clark et al., 1998).



L'estudi de la modulació de l'activitat del canal per diferents factors ajuda a identificar el canal responsable del corrent i permet especular sobre el seu possible paper funcional. A les cèl·lules trabeculars, l'amplitud dels corrents augmenta amb l'acidificació extracel·lular i disminueix en condicions bàsiques, indicant que el pH extracel·lular n'és un potent modulador. L'augment d'aquests corrents per l'aplicació de l'anàleg d'AMPc permeable a la membrana plasmàtica, 8-Br-AMPc, suggereix que el corrent es podria modular per PKA. A més a més, el corrent augmenta amb l'aplicació d'una solució externa hipotònica, indicant que l'augment de volum cel·lular també podria estar regulant l'activitat d'aquest canal. Per tant, el corrent identificat a les cèl·lules trabeculars es modula pel pH, l'AMPc i l'augment del volum cel·lular. Corrents amb característiques similars han estat descrits prèviament pel canal CIC-2 en ser expressat de manera heteròloga (Fritsch and Edelman, 1996; Gründer et al., 1992; Jordt and Jentsch, 1997) o caracteritzat en diferents tipus cel·lulars (Bond et al., 1998a; Clark et al., 1998).

Ja que les característiques electrofisiològiques i la seva modulació indiquen que el canal CIC-2 podria ser responsable d'aquests corrents, s'ha determinat la seva expressió molecular així com de la resta de canals de Cl<sup>-</sup> dependents de voltatge de la família CLC en les cèl·lules trabeculars bovines. Amb la tècnica de RT-PCR utilitzant els *primers* específics que han estat dissenyats per a les seqüències dels canals en humans, s'ha detectat l'expressió del canal CIC-2 a més a més dels canals CIC-5, CIC-6 i CIC-7 en cèl·lules trabeculars bovines.

A part de a les cèl·lules trabeculars, el canal CIC-2 s'expressa en tots els tipus cel·lulars que han estat estudiats (Jentsch et al., 2002). L'expressió ubiqua del canal suggereix que podria tenir un rol necessari a totes les cèl·lules. Tot i que les seves funcions exactes resten per identificar, s'ha proposat que podria estar implicat en mecanismes cel·lulars com el transport transepitelial, la regulació de la concentració de Cl<sup>-</sup> intracel·lular, l'estabilització del potencial de membrana així com de la homeòstasi aniònica de les interaccions cel·lulars (Jentsch et al., 2005). L'increment de l'activitat del CIC-2 per l'augment del volum cel·lular quan s'expressa de manera heteròloga en oòcits de *Xenopus* ha suggerit el seu paper en la regulació del volum (Gründer et al., 1992).

Per tal de determinar la implicació del canal CIC-2 expressat a les cèl·lules trabeculars en la regulació de volum, els canvis en el volum intracel·lular d'aigua han estat mesurats amb una tècnica fluorimètrica semiquantitativa amb calceïna. L'aplicació d'una solució hipotònica del 40% augmenta el volum de les cèl·lules trabeculars bovines de manera significativa per una entrada passiva d'aigua a favor de gradient osmòtic. Seguidament, el volum es recupera de forma gradual amb el temps en condicions hipotòniques per l'activació d'un mecanisme de regulació del volum. L'aplicació de Cd<sup>2+</sup> a la solució hipotònica no altera de manera significativa l'augment ni la posterior recuperació de volum cel·lular que es dona en condicions hipotòniques. En canvi, la solució hipotònica en presència de tamoxifen, inhibeix de manera significativa la recuperació del volum cel·lular després del xoc hipotònic. Els resultats indiquen que a les cèl·lules trabeculars el

canal CIC-2 no participa significativament en la recuperació del volum mentre que  $ICl_{swell}$  hi té un paper important.

Finalment, s'ha estudiat la implicació del canal CIC-2 en la modulació de la facilitat d'evacuació després d'un augment del volum cel·lular induït per un xoc hipotònic tal com es descriu per  $ICl_{swell}$  més endavant. La perfusió amb un medi hipotònic del 20% disminueix la facilitat d'evacuació de manera significativa probablement per l'augment del volum de les cèl·lules trabeculars. Seguidament la facilitat d'evacuació es recupera de manera gradual amb el temps fins a arribar als valors inicials, tot i que les condicions hipotòniques persisteixen en el medi de perfusió. Aquesta recuperació de la facilitat suggereix que l'activació del RVD a les cèl·lules trabeculars podria modular la facilitat d'evacuació. Amb aquest sistema de perfusió s'ha mesurat la facilitat d'evacuació en condicions hipotòniques en presència de  $Cd^{2+}$  en comparació amb condicions hipotòniques control. La disminució inicial de la facilitat per l'augment del volum cel·lular és d'igual magnitud en condicions hipotòniques en presència o absència de  $Cd^{2+}$ . A més a més, la recuperació progressiva de la facilitat d'evacuació per la regulació del volum cel·lular és igual en ambdós grups. Aquests resultats podrien corroborar que el CIC-2 no està implicat en el mecanisme de regulació del volum cel·lular a les cèl·lules trabeculars i per tant no modula la recuperació de la facilitat d'evacuació després d'un augment del volum cel·lular.

Article 3 (Investigative Ophthalmology & Visual Science; 45 (2004) 3650-3661)

En aquest treball s'ha identificat i caracteritzat electrofisiològicament corrents de  $Cl^-$  activats per l'augment de volum a les cèl·lules trabeculars que presenten característiques electrofisiològiques diferents als corrents mitjançats pel canal CIC-2. En condicions selectives pel registre de corrents de  $Cl^-$ , s'ha aplicat un protocol de polsos des de -80 a +120 mV mantenint el potencial de membrana a 0 mV. En condicions isotòniques, no s'observa l'activació de corrents voltatge-dependents. Aproximadament als 4 minuts d'aplicar una solució externa hipotònica del 20%, el corrent comença a activar-se i augmenta de manera progressiva amb el temps fins arribar a una màxima activació als 10-12 minuts. El corrent s'activa tant a potencials despolaritzants com hiperpolaritzants tot i que la magnitud del corrent és superior als potencials positius, de tal manera que la relació entre el corrent i el voltatge presenta una moderada rectificació de sortida. El corrent mostra una inactivació dependent del temps als potencials més positius de 80 mV. L'activació per l'augment del volum cel·lular induït per hipotonicitat és reversible ja que el corrent disminueix progressivament en retornar a les condicions isotòniques inicials. El fet de que en absència d'ATP intracel·lular el corrent de  $Cl^-$  no s'activi per l'augment de volum amb el temps necessari per activar-se indica que l'ATP intracel·lular pot ser important per la seva activació. El canal responsable d'aquest corrent és permeable a altres anions i la substitució del  $Cl^-$  per diferents anions a la solució externa varia el seu potencial de reversió. Així, s'ha obtingut la següent seqüència de permeabilitats relatives pel corrent:  $I^{\text{Br}^-} > Cl^- > F^- > \text{gluconat}$ . Les característiques biofísiques

d'aquests corrents coincideixen amb les dels corrents de  $\text{Cl}^-$  activats per augment de volum o  $\text{ICl}_{\text{swell}}$  (de *swelling-activated chloride current*) descrits prèviament en diferents tipus cel·lulars (Bond et al., 1998a; Nilius et al., 1994).

La caracterització electrofisiològica s'ha completat determinant la seva sensibilitat a diferents bloquejants per tal de caracteritzar el corrent de manera farmacològica. El corrent activat als potencials despolaritzants i hiperpolaritzants es troba afectat de diferent manera pel tamoxifen, el DIDS i l'ATP extracel·lular. El tamoxifen és un bloquejant conegut d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  i inhibeix el corrent de  $\text{Cl}^-$  activat a les cèl·lules trabeculars a tots els voltatges estudiats. En canvi el DIDS, un bloquejant de corrents de  $\text{Cl}^-$  no selectiu d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  bloqueja el corrent de manera voltatge-dependent sent molt més efectiu amb el corrent activat als potencials despolaritzants. L'ATP extracel·lular aplicat a una concentració en el rang mil·limolar bloqueja el corrent a tots els potencials però de manera lleugerament més efectiva als potencials positius. La caracterització farmacològica d'aquest corrent confirma que es tracta del corrent de  $\text{Cl}^-$  activat per l'augment de volum cel·lular conegut amb el nom d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$ . Tot i que aquest corrent ha estat descrit en altres tipus cel·lulars no es coneix la identitat molecular del canal responsable. Les propietats biofísiques i farmacològiques permeten identificar els corrents a més a més de conèixer els mecanismes que modulen la seva activitat funcional. Cal tenir en compte que aquest canal podria ser rellevant en la regulació del volum cel·lular i per tant en la modulació de l'evacuació de l'humor aquós.

La perfusió de segments anteriors oculars a pressió constant permet mesurar la facilitat d'evacuació de l'humor aquós i en aquest estudi s'ha utilitzat per avaluar el paper dels canals iònics que podrien estar implicats en la regulació del volum de les cèl·lules trabeculars. S'ha proposat que el corrent de  $\text{Cl}^-$  activat per l'augment del volum cel·lular ( $\text{ICl}_{\text{swell}}$ ) i el canal de  $\text{K}^+$  d'alta conductància dependent de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) podrien col·laborar en mecanismes de regulació de volum en diferents tipus cel·lulars. Per això, els segments anteriors oculars s'han perfundit en condicions hipotòniques i absència o presència dels bloquejants d'aquests corrents per determinar la seva contribució en la modulació de l'evacuació de l'humor aquós mitjançant la regulació del volum cel·lular.

Per comprovar aquesta hipòtesi s'ha aplicat la solució hipotònica en presència de bloquejants dels canals de  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$  per separat i de manera conjunta que podrien estar implicats en la regulació del volum cel·lular. En perfundir amb la solució hipotònica amb tamoxifen la caiguda inicial de la facilitat d'evacuació resulta superior que en absència de la droga, segurament per un major augment del volum de les cèl·lules trabeculars. A més a més, en presència de tamoxifen a la solució hipotònica la facilitat es recupera més lentament que en condicions hipotòniques control sense arribar a recuperar els valors inicials. De manera similar al tamoxifen, amb la iberiotoxina, bloquejant específic del canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , també incrementa la caiguda inicial i s'endarrereix la recuperació de la facilitat d'evacuació en condicions hipotòniques.

Pel contrari, quan s'aplica l'activador del canal  $BK_{Ca}$ , el NS1619, es redueix la caiguda inicial de la facilitat d'evacuació i es potencia la seva recuperació en condicions hipotòniques. Aquests resultats suggereixen que el volum de les cèl·lules trabeculars determina el flux d'evacuació a través de la xarxa trabecular i que els canals iònics implicats en la regulació del volum són determinants per mantenir una correcta evacuació. Aquesta hipòtesi es podria corroborar en aplicar tamoxifen i iberiotoxina de manera conjunta en condicions hipotòniques ja que es dona la màxima caiguda inicial i la recuperació més dificultada de la facilitat d'evacuació. Per tant, l'evacuació de l'humor aquós es pot modular amb l'activació dels canals responsables d' $ICl_{swell}$  i els canals  $BK_{Ca}$  possiblement a través de mecanismes de regulació del volum de les cèl·lules trabeculars.

# Discussió

---

## DISCUSSIÓ

L'evacuació de l'humor aquós és un procés determinant per mantenir la IOP dins uns marges fisiològics i en aquest mecanisme el teixit trabecular juga un paper molt important. Tot i que tradicionalment es considerava a la xarxa trabecular una estructura passiva en el drenatge de l'humor aquós i en el manteniment de la IOP, actualment està acceptat que aquest teixit regula de manera activa el pas de humor aquós a través seu, i per tant el flux d'evacuació (Wiederholt, 1998). Nombrosos treballs han demostrat que diferents tipus d'alteracions a la xarxa trabecular tenen una relació directa amb la fisiopatologia del glaucoma (Agapova et al., 2003; Caballero and Borrás, 2001; Putney et al., 1999; Rezaie et al., 2002; Stone et al., 1997; Weinreb and Khaw, 2004). Fins ara han estat descrits alguns mecanismes involucrats en la regulació de l'evacuació com la contractilitat de la xarxa trabecular (Lepple-Wienhues et al., 1991a), els canvis morfològics per la reorganització del citoesquelet (Wax et al., 2000), la tensió mecànica (Gasull et al., 2003), interaccions amb la matriu extracel·lular (Yue, 1996), canvis en l'expressió gènica (Borrás, 2003a) i en el volum de les cèl·lules trabeculars (Mitchell et al., 2002). S'ha postulat que el volum de les cèl·lules trabeculars estaria involucrat en l'evacuació de l'humor aquós (Gual et al., 1997; Putney et al., 1999) de manera que la regulació de volum d'aquestes cèl·lules pot determinar la IOP.

Expressió dels canals de Cl<sup>-</sup> dependents de voltatge de la família CLC a les cèl·lules trabeculars humanes i bovines

Ja que alguns canals de Cl<sup>-</sup> han estat involucrats en la regulació del volum cel·lular i en processos intracel·lulars relacionats amb l'acidificació d'endosomes i lisosomes (Jentsch et al., 2005) i que aquests factors podrien determinar la funció trabecular, un dels objectius d'aquest treball ha estat determinar quins canals de Cl<sup>-</sup> s'expressen a les cèl·lules trabeculars. La família CLC de canals de Cl<sup>-</sup> dependents de voltatge ha estat àmpliament estudiada a nivell molecular (Jentsch et al., 2002). Amb *primers* específics dissenyats per les seqüències dels canals humans i la tècnica de RT-PCR s'ha detectat l'expressió dels canals CIC-2, CIC-3, CIC-4, CIC-5, CIC-6 i CIC-7 en cèl·lules trabeculars humanes (Comes et al., 2005b). Ja que no s'han identificat les seqüències dels canals CLC bovins, l'expressió dels canals en cèl·lules trabeculars bovines també s'ha determinat amb els *primers* que han estat dissenyats per a seqüències humanes. A les cèl·lules trabeculars bovines s'ha detectat l'expressió dels canals CIC-2, CIC-5, i CIC-7 utilitzant les mateixes condicions d'amplificació que en cèl·lules humanes mentre que per detectar el mRNA del CIC-6 s'han hagut d'utilitzar condicions més permissives (Comes et al., 2005a). Aquests resultats indiquen que els gens que codifiquen per aquests canals tenen seqüències similars en cèl·lules humanes i bovines. Recentment, altres autors també han detectat l'expressió de CIC-2 i CIC-5 i de P-gp en cèl·lules trabeculars bovines (Srinivas et al., 2004).

El fet de no detectar mRNA dels canals CIC-3 i CIC-4 no descarta que aquests s'expressin a les cèl·lules trabeculars bovines en condicions normals ja que han estat amplificats amb *primers* específics de seqüències humanes. L'expressió de CIC-3 i CFTR tampoc no ha estat detectada a l'altre treball on utilitzen *primers* diferents però igualment dissenyats per a seqüències humanes (Srinivas et al., 2004). Aquests resultats permeten especular sobre la existència de diferències en les seqüències d'alguns canals de Cl<sup>-</sup> dependents de voltatge entre les espècies humanes i bovines.

En canvi, a les cèl·lules trabeculars bovines i humanes no s'ha detectat el mRNA del canal CIC-1 que s'expressa en abundància i de manera específica a les cèl·lules de múscul esquelètic (Steinmeyer et al., 1991). Cal tenir compte que l'expressió d'algunes proteïnes es pot veure alterada en cèl·lules en cultiu i s'ha descrit que les línies cel·lulars de múscul esquelètic expressen baixos nivells de CIC-1 (Bardouille et al., 1996). L'expressió de CIC-1 al teixit trabecular s'ha testat per la presència al múscul esquelètic d'altres gens rellevants de la xarxa trabecular com TIGR (Ortego et al., 1997) i per les propietats contràctils descrites a les cèl·lules trabeculars (Wiederholt et al., 2000). D'altra banda, l'absència de CIC-1 podria ser un fet esperable perquè les propietats contràctils de les cèl·lules trabeculars són típiques de múscul llis que tampoc no presenta aquest canal. La presència de CIC-1 s'ha confirmat com a control amb el mRNA provinent de cèl·lules humanes de múscul esquelètic i el *primer* dissenyat pel canal CIC-1.

L'amplificació dels gens *CLCN* amb un gen que actua de control intern quan ambdós es troben en nivells d'expressió intermedis permeten quantificar la seva abundància relativa (Lo et al., 2003; Vittitow and Borrás, 2002). Encara que cada gen s'ha amplificat amb reaccions independents, les comparacions aporten informació sobre els seus nivells d'expressió relatius i permeten especular sobre la seva possible importància funcional en el teixit trabecular. El canal CIC-2, que s'expressa de manera ubiqua (Thiemann et al., 1992), presenta elevats nivells d'expressió a les cèl·lules de la xarxa trabecular humana. El canal CIC-3, que és present a les membranes intracel·lulars de diversos teixits (Stobrawa et al., 2001), també presenta una elevada expressió a les cèl·lules trabeculars. Així i tot, la presència d'elevats nivells de mRNA de CIC-2 i CIC-3 a les cèl·lules trabeculars no significa que hi hagi elevats nivells d'aquestes proteïnes. Cal tenir en compte que la síntesi proteica depèn de factors com l'estabilització del mRNA, l'eficiència de la traducció i el correcte plegament de les proteïnes. Per tant, elevats nivells d'expressió de mRNA no garanteixen alts nivells de proteïna però poden indicar la necessitat d'aquesta en un teixit o la seva importància funcional.

Canvis en els nivells d'expressió dels canals CIC-2 i CIC-3 en condicions relacionades amb la patologia del glaucoma

Ja que CIC-2 i CIC-3 estan altament expressats a les cèl·lules trabeculars humanes, hem determinat els canvis en els seus nivells d'expressió en diferents condicions experimentals. Els canvis d'expressió dels canals permeten especular sobre les seves possibles funcions o sobre quin rol poden tenir en determinades condicions (Borrás et al., 2002b; Lo et al., 2003; Vittitow and Borrás, 2002). Tot i que en alguns treballs s'ha proposat la implicació dels canals CIC-2 en la regulació del volum cel·lular (Furukawa et al., 1998; Roman et al., 2001; Xiong et al., 1999), aquest fet segueix sent motiu de controvèrsia ja que en altres tipus cel·lulars s'ha demostrat que no hi està implicat (Bond et al., 1998a; Nehrke et al., 2002). D'altra banda, està àmpliament demostrat que el CIC-3 es localitza a les vesícules sinàptiques i al compartiment endosomal i lisosomal (Stobrawa et al., 2001) on és responsable de l'acidificació d'aquestes vesícules intracel·lulars (Li et al., 2002). Tot i que s'ha descrit que els corrents de CIC-3 presenten característiques electrofisiològiques similars a les dels corrents de  $Cl^-$  activats per augments de volum ( $ICl_{swell}$ ) (Duan et al., 1997), ambdós corrents presenten algunes diferències (Li et al., 2000). L'expressió de les dues versions del canal CIC-3 en cèl·lules HEK293 no altera  $ICl_{swell}$  ni el mecanisme *regulatory volume decrease* (RVD), fet que demostra el CIC-3 que no és responsable del corrent  $Cl_{swell}$  ni de la regulació del volum cel·lular (Weylandt et al., 2001). A les cèl·lules trabeculars, el canal CIC-3 podria estar regulant el trànsit intracel·lular i els mecanismes de fagocitosi i secreció, responsables de la composició i de la remodelació de la matriu extracel·lular (Bradley et al., 1998). Ja que alteracions de la composició de la matriu extracel·lular poden alterar el drenatge de l'humor aquós, una correcta funció vesicular pot ser determinant per la fisiologia del teixit a l'hora de mantenir la IOP dins d'uns marges fisiològics.

Tenint en compte aquests fets, s'han estudiat els canvis en els nivells d'expressió dels gens que codifiquen pels canals CIC-2 i CIC-3 en condicions hipotòniques i per tant d'augment del volum cel·lular. Així, en tractar les cèl·lules humanes en cultiu amb una hipotonicitat del 20%, els nivells d'expressió del CIC-2 augmenten de manera progressiva al cap de 15 i 30 minuts. Per tant, a més a més d'incrementar la seva activitat (Clark et al., 1998), el CIC-2 també augmenta els nivells d'expressió en condicions hipotòniques. Tot i que l'expressió inicial dels canals és diferent a les cèl·lules provinents dels dos individus tractats, la tendència a l'augment de la seva expressió es manté en ambdós casos. L'augment de l'expressió amb l'estímul hipotònic no involucra el canal en el mecanisme de regulació del volum cel·lular però demostra la seva capacitat de respondre en aquestes condicions. En alguns tipus cel·lulars s'ha proposat la possibilitat de que el CIC-2 col·laborés en el RVD (Roman et al., 2001; Xiong et al., 1999) mentre que en altres s'ha demostrat amb mesures de volum cel·lular (Bond et al., 1998a) i en ratolins *knockout* (Nehrke et al., 2002) que el canal no hi està implicat. D'altra banda, l'expressió de CIC-3 no s'altera de manera significativa amb hipotonicitat en cap dels dos individus testats i per tant sembla no respondre a l'augment del volum cel·lular.



Els experiments realitzats perfundint segments anteriors oculars humans a flux constant ofereixen un model ideal per estudiar el teixit trabecular exposat a un flux i una IOP similars a les de l'ull humà en condicions fisiològiques. Aquest sistema de cultiu d'òrgans manté l'arquitectura original de la xarxa trabecular demostrant que les cèl·lules del teixit queden exposades a la lesió mecànica de manera similar a com ho estan *in vivo*. El sistema de perfusió permet controlar el flux de medi que entra a l'interior de la cambra anterior que és igual a la facilitat d'evacuació i mesurar la IOP resultant. Amb aquest sistema de perfusió es pot aplicar un flux determinat per tal de sotmetre el teixit a una elevada IOP. A més a més, cada segment anterior ocular amb elevada IOP és comparat amb el segment contralateral provinent del mateix individu que es manté a una IOP fisiològica perquè els resultats obtinguts no es trobin afectats per les variacions genètiques (Borrás, 2003a).

La resposta de l'expressió dels gens *CLCN2* i *CLCN3* a l'elevada IOP resulta diferent en els sis individus estudiats de manera que en tres parells de segments oculars l'expressió incrementa lleugerament mentre que en els altres tres parells augmenta significativament. No obstant, en els dos grups de respostes a l'elevada IOP, els gens que codifiquen pels canals CIC-2 i CIC-3 mantenen el mateix patró de resposta d'expressió relativa amb el temps. Per tant, la resposta a l'elevada IOP en els nivells d'expressió d'ambdós gens resulta individu-dependent però es manté "coordinada" en tots els individus estudiats. Ha estat demostrat prèviament, que el *background* genètic influencia la resposta a la hipertensió, tant en l'augment de la IOP per l'ús d'esteroides (Johnson, 1997) com en la disminució de la IOP per efecte de determinats fàrmacs (Camras and Hedman, 2003). Tot i que caldria estudiar més individus per corroborar aquesta hipòtesi, els resultats obtinguts on tres individus responen lleument i tres individus responen de manera significativa a l'elevada IOP fa pensar que podria existir un mecanisme de resposta individual a la pressió per part d'aquests canals. En aquests experiments les variacions per l'edat o el gènere s'han evitat pel fet de fer servir parelles de segments anteriors oculars provinents del mateix individu. Les variacions genètiques individuals, però, podrien explicar tant les diferències detectades en l'expressió inicial com en la resposta dels gens *CLCN2* i *CLCN3* a l'elevada IOP.

A les cèl·lules trabeculars humanes, l'expressió de *CLCN2* incrementa més que la de *CLCN3* després d'una hora amb alta IOP, fet que podria formar part d'un mecanisme de resposta a aquestes condicions d'estrès. Altres treballs demostren que l'elevada IOP durant un període curt (6 hores) indueix l'expressió de diversos gens involucrats en la permeabilitat vascular, la secreció, el transport, la remodelació de la matriu extracel·lular i la reorganització del citoesquelet a la xarxa trabecular. Ja que els productes d'aquests gens poden ser rellevants en la fisiologia de la xarxa trabecular regulant l'evacuació de l'humor aquós, els resultats indiquen que podrien col·laborar en un mecanisme homeostàtic de resposta a l'elevada IOP al teixit trabecular similar al que regula la permeabilitat dels vasos sanguinis (Gonzalez et al., 2000). De fet, s'ha

demostrat que a l'augmentar la IOP en el sistema de cultiu d'òrgans, aquest paràmetre es recupera amb el temps de forma gradual fins que retorna a valors normals per un augment de la facilitat d'evacuació. En el mateix treball, es detecten increments en els nivells de la gelatinasa B i de la metal·loproteïnasa MT1 amb l'elevada IOP. Aquest resultat suggereix que els gens responsables de la remodelació de la matriu extracel·lular podrien col·laborar a restaurar els valors normals de la IOP (Bradley et al., 2001).

La presència d'un mecanisme homeostàtic de resposta a l'elevada IOP s'ha demostrat posteriorment en detectar un increment de la facilitat d'evacuació en sotmetre els segments anteriors oculars a elevada IOP entre 1 i 4 dies (Borrás et al., 2002b). Els mateixos autors han comparat els perfils d'expressió gènica en condicions d'elevada IOP i pressió normal durant aquest període homeostàtic amb la hibridació de *microarrays*. Dels 40 gens més sobreexpressats durant aquest període d'alta IOP, la majoria estan implicats en el transport intracel·lular i la transducció de senyals. Ja que el mecanisme homeostàtic està regulat per senyals intracel·lulars és lògic que la majoria dels gens induïts formin part d'aquesta categoria funcional (Vittitow and Borrás, 2004). Dels gens que redueixen la seva expressió durant el període homeostàtic, el major grup funcional codifica per proteïnes involucrades en la transcripció i la traducció. Per la importància d'aquests gens resulta difícil una explicació òbvia per aquest fet, tot i que s'ha especulat que la cèl·lula podria estar disminuint l'activitat metabòlica per tal d'augmentar l'expressió de gens necessaris en aquestes condicions d'estrès (Vittitow and Borrás, 2004).

En diferents treballs s'ha demostrat que l'expressió dels gens que han estat relacionats amb el glaucoma incrementen de manera progressiva en estar sotmesos a una IOP elevada. El gen de l'optineurina (OPTN) s'indueix un 8,2% (Vittitow and Borrás, 2002) i el de la miocilina (MYOC) un 11% després de 6 hores d'elevada IOP (Borrás et al., 2002b). La inducció de l'OPTN arriba a un màxim de 32.9% als 4 dies dins del període homeostàtic i per això s'ha proposat que podria tenir una funció neuroprotectora (Vittitow and Borrás, 2002). En canvi, la MYOC pot augmentar fins a un 55.6% a cap de 7 dies d'elevada IOP quan ja no hi ha la resposta homeostàtica que incrementi l'evacuació, de tal manera que la inducció podria formar part d'una resposta anòmala a l'estrès més que d'un mecanisme homeostàtic (Borrás et al., 2002b).

A les cèl·lules trabeculars humanes, el gen que codifica pel canal CIC-3 se sobreexpressa més que el CIC-2 en segments anteriors sotmesos a elevada IOP durant 4 i 7 dies i per tant respon més en condicions d'estrès relacionades amb el glaucoma. En un treball previ s'han descrit canvis en l'expressió del gen *CLCN3* per elevada pressió en un model d'hipertensió cardíaca. Curiosament, l'expressió d'aquest canal disminueix en períodes curts d'alta pressió i augmenta al mantenir una pressió elevada de manera perllongada que, a més a més, reverteix si es redueix la pressió sanguínia (Hiramatsu et al., 2002). Altres autors han descrit la sobreexpressió de *CLCN3* en el cor i el pulmó de rates hipertenses i suggereixen que es tractaria d'un mecanisme de resposta adaptatiu a la

inflamació de l'artèria pulmonar (Dai et al., 2005). Per tant, els resultats obtinguts en cèl·lules trabeculars podrien corroborar la sobreexpressió de CIC-3 en condicions d'estrès mecànic descrit prèviament.

Les cèl·lules trabeculars tenen una gran activitat metabòlica i importants funcions secretores i fagocítiques per poder mantenir una correcta composició de la matriu extracel·lular (Bradley et al., 1998). Així, i tenint en compte que el canal CIC-3 es troba a les vies endosomal i lisosomal regulant l'acidificació i la maduració de les vesícules (Stobrawa et al., 2001), la sobreexpressió de CIC-3 en condicions d'elevada IOP perllongada podria potenciar el tràfic intracel·lular per tal de facilitar l'evacuació remodelant la composició de la matriu extracel·lular.

A més a més de l'alta pressió, els canvis en l'expressió de *CLCN2* i *CLCN3* s'han estudiat en presència d'una altra condició relacionada amb el glaucoma com és el tractament amb dexametasona (DEX). La DEX és un esteroide que va ser àmpliament utilitzat per tractar la inflamació en determinades alteracions oculars. Posteriorment es va detectar que la DEX causa un increment de la IOP i el desenvolupament de glaucoma en un 30-40% dels pacients tractats (Johnson, 1997). Actualment i ja que el glaucoma induït per esteroides mimetitza molts dels aspectes del POAG, el tractament amb DEX resulta un bon model per a l'estudi d'aquesta patologia (Lo et al., 2003).

El tractament amb DEX a les cèl·lules trabeculars humanes en cultiu provoca una disminució significativa de l'expressió del gen que codifica pel canal CIC-3. Ja que aquest canal es troba a la membrana de les vesícules de la via endocítica (Li et al., 2002; Stobrawa et al., 2001), la manca d'activitat podria estar implicada en l'alteració de l'endocitosi i la secreció que manté una correcta composició i remodelació de la matriu extracel·lular.

Fins ara han s'ha descrit amb *microarrays* i RT-PCR que diversos gens modifiquen la seva expressió amb el tractament amb DEX. La DEX induïx l'expressió de proteïnes de la matriu extracel·lular com la laminina, diverses integrines (Dickerson et al., 1998) i la fibronectina (Steely et al., 1992). Altres autors han demostrat que els gens que augmenten l'expressió de manera més significativa codifiquen per glicoproteïnes secretables que en sobreexpressar-se podrien acumular-se afectant la composició de la matriu extracel·lular i l'evacuació de l'humor aquós (Lo et al., 2003). Aquests resultats permeten especular que el glaucoma induït per esteroides podria ser causat per la deposició d'aquestes proteïnes, que es podria veure facilitada per la disminució de l'expressió de CIC-3 a les membranes intracel·lulars. No obstant, no és coneix el mecanisme mitjançant el qual els canvis en l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes secretables podria causar glaucoma i per això no es descarta la presència de mecanismes protectors activats a la xarxa trabecular per DEX.

El tractament amb DEX també incrementa l'expressió de gens lligats al glaucoma a les cèl·lules trabeculars humanes. Ja que les mutacions descrites al gen de la MYOC codifiquen per proteïnes truncades que no se secreten i que la

seva sobreexpressió per DEX és específica del teixit trabecular s'ha suggerit que la inducció podria formar part d'un mecanisme de protecció per regular la IOP (Lo et al., 2003). El gen de l'OPTN se sobreexpressa amb DEX i TNF-B (Vittitow and Borrás, 2002), factor que s'indueix en el nervi òptic d'individus amb glaucoma (Yuan and Neufeld, 2000). Aquests resultats han permès especular sobre un possible rol neuroprotector de l'OPTN (Vittitow and Borrás, 2002) i s'ha proposat que les formes mutades del gen podrien causar una neuropatia òptica (Rezaie et al., 2002).

El tractament amb DEX sobreexpressa diferents gens que actuen a la matriu extracel·lular i podrien explicar l'aparició de glaucoma induït per esteroides. Però el canal CIC-3 disminueix la seva expressió amb la DEX de tal manera que podria alterar la funció secretora i la composició de la matriu a les cèl·lules trabeculars. L'elastina, una proteïna de la matriu extracel·lular, també disminueix l'expressió per DEX a les cèl·lules trabeculars comparant la seva expressió amb la dels astròcits (Lo et al., 2003).

#### Caracterització electrofisiològica dels corrents del canal CIC-2

A partir de la detecció de l'expressió del CIC-2 a les cèl·lules trabeculars i la seva alteració en determinades condicions, s'ha realitzat la caracterització electrofisiològica dels corrents de Cl<sup>-</sup> possiblement mitjançats per aquest canal. Polsos hiperpolaritzants activen corrents d'entrada que augmenten de manera significativa amb un llarg pre-pols hiperpolaritzant a -120 mV de 30 segons a les cèl·lules trabeculars bovines i humanes. Ja que aquest canal es troba tancat als voltatges fisiològics i s'activa per hiperpolarització a partir de voltatges no fisiològics, s'ha proposat que podria existir un altre tipus de mecanisme d'activació *in vivo* (Valverde, 1999). El corrent presenta un component ràpid que apareix de manera immediata a l'inici del pols hiperpolaritzant i un component que s'activa lentament amb la hiperpolarització, tal com ha estat descrit en nombrosos treballs (Jentsch et al., 2002). En cèl·lules HEK-293 que expressen CIC-2, els corrents resultants mostren una cinètica d'activació amb dos components que es poden ajustar a una doble exponencial (Cid et al., 2000).

El corrent activat per hiperpolarització a les cèl·lules trabeculars es bloqueja de manera molt efectiva amb l'aplicació de Cd<sup>2+</sup> extracel·lular inhibint els corrents d'entrada. Aquest resultat coincideix amb els descrits pels corrents activats per hiperpolarització mitjançats pel canal CIC-2, on cations divalents com el Cd<sup>2+</sup> i el Zn<sup>2+</sup> són potents bloquejants tot i no ser específics d'aquest canal (Clark et al., 1998). Tant en cèl·lules trabeculars bovines com humanes, la magnitud del corrent que queda després de l'aplicació de 300  $\mu$ M de Cd<sup>2+</sup> és igual a la magnitud del corrent activat abans d'aplicar el llarg pols hiperpolaritzant. Així, el Cd<sup>2+</sup> a aquesta concentració inhibeix gairebé per complet el corrent activat pel llarg hiperpolaritzant. A més a més, a les cèl·lules trabeculars humanes i bovines aquest bloqueig per Cd<sup>2+</sup> és reversible ja que després de rentar el Cd<sup>2+</sup> es recupera gairebé per complet. En el plexe coroïdal de rata s'ha descrit que

aplicant  $300 \geq M$  de  $Cd^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  el corrent activat per hiperpolarització es bloqueja quasi totalment (Kajita et al., 2000b). La inhibició del corrent del CIC-2 per cations divalents és una característica pròpia dels canals de la mateixa branca filogenètica i homòlegs CIC-0 i CIC-1. Tot i que s'han identificat diferents residus de CIC-1 que en ser mutats redueixen la inhibició per  $Zn^{2+}$ , es desconeix el mecanisme exacte d'aquest bloqueig (Kurz et al., 1999).

La substracció realitzada entre el corrent abans i després de l'aplicació del  $Cd^{2+}$  mostra que el corrent sensible al bloquejant presenta rectificació d'entrada a les cèl·lules trabeculars bovines i humanes. Tal com s'ha descrit en diferents tipus cel·lulars aquesta és una característica típica del corrent del CIC-2 (Bond et al., 1998a; Carew and Thorn, 1996; Clark et al., 1998). Per tant, els corrents sensibles al  $Cd^{2+}$  extrets de la substracció correspondrien als corrents mitjançats pel canal CIC-2. Aquests corrents tenen característiques similars a les cèl·lules trabeculars d'ambdues espècies i la densitat de corrent resulta significativament superior a les cèl·lules bovines, tot i que caldrien més experiments per poder afirmar que les cèl·lules trabeculars humanes tenen menys corrent que les bovines. Cal tenir en compte que les cèl·lules humanes provenen d'individus d'edat avançada i que algunes cèl·lules poden tenir característiques diferents en cultiu que *in vivo*. De fet, s'ha descrit que els nivells d'expressió d'algunes proteïnes de membrana com els canals iònics o els receptors es poden veure alterats amb el temps en cultiu (Chow, 2005) tot i que les cèl·lules trabeculars s'han utilitzat com a màxim fins al 4art *pas* del cultiu.

En vertebrats, els canals de  $Cl^-$  de la família CLC poden permear  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $I^-$  i  $SCN^-$ , en alguns casos fins i tot millor que el  $Cl^-$ . Aquests canals, però, reben el nom de canals de  $Cl^-$  ja que aquest és l'anió més abundant a l'organisme (Jentsch et al., 2002). El corrent activat per hiperpolarització a les cèl·lules trabeculars bovines també permea altres anions i té una selectivitat aniònica determinada a partir dels potencials de reversió de  $Cl^- > Br^- > I^- > F^-$  tal com ha estat descrit pels corrents del CIC-2 en diferents tipus cel·lulars (Jentsch et al., 2002). Altres autors han descrit corrents de  $Cl^-$  activats per hiperpolarització amb selectivitats aniòniques diferents. A les cèl·lules ciliades respiratòries de rata el corrent activat per hiperpolarització presenta una selectivitat aniònica de  $Br^- \geq I^- > Cl^- > gluconat = aspartat$  (Tarran et al., 2000). En canvi, cèl·lules epitelials porcines del plexe coroïdal presenten corrents de  $Cl^-$  rectificadors d'entrada típics del CIC-2 però amb selectivitat aniònica de  $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$  (Kajita et al., 2000a). Els autors d'aquests treballs atribueixen aquestes diferències a les característiques del canal al teixit, ja que aquestes poden dependre del tipus cel·lular on s'expressa cada gen (Jordt and Jentsch, 1997; Park et al., 1998). Modificacions post-traduccionals i altres processos poden generar variacions dels canals que presentin característiques funcionals diferents. De fet, s'han descrit formes del canal CIC-2 amb característiques diferents per *splicing* alternatiu (Cid et al., 2000) o *exon-skipping* (Chu et al., 1996). D'aquesta manera, la forma CIC-2S s'expressa al pulmó de rata (Chu and Zeitlin, 1997) i les formes CIC-2B i CIC-2B s'expressen a l'estómac i al cor de conill, respectivament (Furukawa et al., 1995).

Es coneix que la permeabilitat del canal depèn de factors com l'afinitat d'unió dels ions amb els residus que formen el porus, la mida de l'ió i la capa d'hidratació que l'envolta que és superior en els ions petits. Així, si el lloc d'unió del canal amb l'ió és feble, tindrà més afinitat per ions grans ja que l'energia que es requereix per treure la capa d'hidratació és inferior. Els experiments de mutagènesi i estructurals en bacteris han permès identificar diferents residus carregats positivament crítics per la interacció del  $\text{Cl}^-$  amb el porus del canal. No obstant, el mecanisme exacte que explica la permeabilitat dels canals de la família CLC en vertebrats resta per identificar (Chen, 2005).

El corrent activat per hiperpolarització augmenta de manera significativa a pH àcid extracel·lular mentre que disminueix amb pH bàsic a les cèl·lules trabeculars bovines, tal com ha estat descrit pel canal CIC-2 (Clark et al., 1998). La sensibilitat al pH és màxima dins del rang fisiològic de pH i l'acidificació obre el CIC-2 a potencials de repòs d'entre -50 i -90 mV (Jordt and Jentsch, 1997). També ha estat descrit que els corrents activats per hiperpolarització es troben a la màxima activació dins del rang de pHs entre 5.4 i 9 mentre que a pHs àcids iguals o inferiors a 5 s'inhibeixen de manera irreversible en les cèl·lules ciliades respiratòries de ratolí (Tarran et al., 2000). En un altre treball es corrobora que a les cèl·lules acinars de ratolí el corrent s'inhibeix tant a pH extracel·lular àcid com bàsic mentre que pHs neutres faciliten l'obertura del canal que es troba al màxim d'activació a valors de pH propers a 6.5 (Arreola et al., 2002)

S'ha descrit que el pH extracel·lular té un efecte bimodal sobre els corrents de  $\text{Cl}^-$  rectificadors d'entrada perquè la inhibició per pH bàsic extracel·lular és independent de l'estat conformacional del canal mentre que la inhibició per pHs extremadament àcids es dona quan el canal es troba en estat tancat. Aquests resultats suggereixen la presència de dos llocs d'unió a  $\text{H}^+$  independents al canal on un dels quals podria no estar disponible quan aquest es troba obert (Arreola et al., 2002). Mutants amb delecions a l'extrem amino-terminal indiquen que el mecanisme d'obertura no seria per sensibilitat del porus al pH, sinó per un mecanisme comú utilitzat per la hiperpolarització i l'augment del volum (Gründer et al., 1992). El pH àcid modula la dependència del voltatge del canal amb un canvi cap a potencials positius que permet un increment del corrent al potencial de membrana de repòs (Jordt and Jentsch, 1997). La regulació del canal CIC-2 pel pH extracel·lular pot tenir importants conseqüències fisiològiques i ser rellevant en cèl·lules acinars de les glàndules salivals (Arreola et al., 2002) o en cèl·lules epitelials del còlon (Catalan et al., 2004), que es poden trobar sotmeses a canvis de pH. El desplaçament de la dependència de voltatge pel pH permet que el CIC-2 es pugui activar a potencials de repòs i ha permès suggerir la seva importància en condicions patològiques com la hipòxia (Jordt and Jentsch, 1997).

L'augment significatiu dels corrents activats per hiperpolarització en aplicar 8-Br-AMPC a les cèl·lules trabeculars bovines, suggereix que l'AMPC pot modular l'activitat del canal a través de la via de PKA, tal com s'ha descrit pel CIC-2 humà recombinant expressat en línies cel·lulars HEK-293 (Tewari et al., 2000). Però l'increment en la magnitud de corrent per 8-Br-AMPC a les cèl·lules trabeculars

mostra una variabilitat que es podria explicar per les condicions experimentals utilitzades. Encara que el 8-Br-AMPC és un anàleg permeable a la membrana podria ser que la configuració de *whole-cell* amb la dialització del contingut cel·lular que comporta no facilités els registres. Tenint en compte tot això, els experiments semblen indicar que la fosforilació per PKA podria regular aquests corrents a les cèl·lules trabeculars bovines tot i que caldrien altres experiments per confirmar aquest fet.

Experiments de mutagènesi han permès identificar la presència de dos residus responsables de l'activació per PKA i per pH àcid dependent de PKA a l'extrem carboxi-terminal del canal CIC-2 en humans. El fet de que la modulació del canal per pH depengui de l'activació per PKA podria tenir rellevància funcional (Cuppoletti et al., 2004). Però en expressar el gen del CIC-2 humà en oòcits de *Xenopus* i augmentar els nivells d'AMPC no es detecta cap efecte en els seus corrents (Jordt and Jentsch, 1997). També s'han detectat residus responsables de l'activació per PKA en cèl·lules gàstriques de conill que podrien ser importants a nivell fisiològic (Malinowska et al., 1995). Les cèl·lules HEK-293 que expressen aquest canal recombinant presenten un corrent que s'activa per PKA dependent d'AMPC (Tewari et al., 2000). No obstant, la selectivitat iònica d'aquest canal és  $I^- > Cl^-$  i difereix de la selectivitat típica del CIC-2 ( $Cl^- > I^-$ ) detectada per altres autors en expressar el canal en oòcits (Thiemann et al., 1992). En un altre treball s'ha descrit que el CIC-2 de conill expressat en oòcits de *Xenopus* mostra un corrent insensible a la  $[AMPC]_i$  (Furukawa et al., 1998).

Per tant, no hi ha evidències convincents sobre la regulació per fosforilació quan el CIC-2 s'expressa de manera heteròloga tot i que s'han descrit casos on els corrents endògens podrien estar-ne afectats (Chesnoy-Marchais and Fritsch, 1994; Noulin et al., 1996). Aquests resultats suggereixen que aquest mecanisme podria requerir proteïnes associades (Jentsch et al., 2002). D'altra banda cal dir que fins ara no s'ha identificat la presència de cap regió del canal responsable de la fosforilació dependent de PKA en cèl·lules bovines.

Els experiments realitzats demostren que els corrents de  $Cl^-$  activats per hiperpolarització a les cèl·lules trabeculars augmenten de manera significativa amb l'augment de volum cel·lular induït amb un estímul hipotònic quan han estat prèviament activades amb un pols hiperpolaritzant de 30 segons. En canvi, el corrent de menys magnitud activat a les cèl·lules trabeculars bovines abans del pre-pols no augmenta per hipotonicitat tal com s'ha demostrat prèviament en cèl·lules intestinals  $T_{84}$  (Bond et al., 1998a). El mecanisme a través del qual el CIC-2 es modula per l'augment del volum cel·lular es desconeix, però els experiments de mutagènesi han mostrat que a l'extrem amino-terminal del canal podrien trobar-se els residus responsables de la regulació per canvis en el volum cel·lular (Jordt and Jentsch, 1997). S'ha proposat que la interacció entre l'extrem amino-terminal del canal i el citoesquelet d'actina podria col·laborar en la modulació per canvis de volum (Ahmed et al., 2000). Malgrat la modulació del CIC-2 per hipotonicitat, les seves característiques electrofisiològiques són clarament diferents a les del corrent  $Cl^-_{swell}$  que s'ha implicat al RVD. El corrent

del CIC-2, a diferència d' $ICl_{swell}$ , presenta rectificació d'entrada, una selectivitat de  $Cl^- > I^-$  i insensibilitat al DIDS (Jentsch et al., 2002). La modulació per hipotonicitat del corrent del CIC-2 ha permès especular sobre la seva implicació en la regulació del volum cel·lular (Gründer et al., 1992). A més a més, l'expressió ubiqua del canal suggereix que podria tenir funcions generalitzades i necessàries a totes les cèl·lules (Valverde, 1999).

#### Caracterització electrofisiològica del corrent de $Cl^-$ activat per l'augment de volum cel·lular ( $ICl_{swell}$ )

A les cèl·lules trabeculars bovines hem detectat corrents de  $Cl^-$  activats per canvis de volum amb característiques electrofisiològiques típiques d' $ICl_{swell}$  (Soto et al. 2004). En aquestes cèl·lules gairebé no es detecten corrents de  $Cl^-$  en condicions isotòniques tal com passa en altres tipus cel·lulars (Sorota, 1992) mentre que s'ha descrit que en altres es detecta una activitat basal (Duan et al., 1995). A les cèl·lules trabeculars bovines, l'aplicació d'una solució hipotònica extracel·lular activa corrents que augmenten de manera progressiva amb el temps fins a un màxim d'activació aproximadament als 12 minuts. El mecanisme a través del qual l'augment de volum induït per hipotonicitat activa els corrents es desconeix però el temps entre l'augment de volum i l'activació dels corrents podria indicar que no es tracta d'un mecanisme d'activació directe i que hi podrien estar implicats segons missatgers (Jentsch et al., 2002). No obstant, s'han proposat diversos mecanismes que podrien estar implicats en l'activació dels corrents de  $Cl^-$  sensibles a augments de volum com alteracions en la organització del citoesquelet, la dilució del contingut cel·lular, la reducció de la força iònica, l'acció de proteïnes tirosina quinasa o canvis en el pH o en el potencial de membrana (Lang et al., 1998). Aquest corrent s'activa tant a potencials despolaritzants com hiperpolaritzants tot i que presenta una lleugera rectificació de sortida. El corrent de sortida presenta una inactivació dependent del temps als potencials més positius de 80 mV típica d' $ICl_{swell}$  (von Weikersthal et al., 1999). A més a més, l'activació del corrent per l'augment de volum cel·lular és reversible ja que el retorn a les condicions isotòniques inhibeix el corrent de manera progressiva. La seqüència de selectivitats aniòniques és de  $I^- > Br^- > Cl^- > F^- > gluconat^-$  tal com ha estat descrit en altres cèl·lules en el corrent  $ICl_{swell}$  (Gosling et al., 1995). Les característiques electrofisiològiques d'aquest corrent activat per l'augment del volum de les cèl·lules trabeculars bovines, coincideix amb les d' $ICl_{swell}$  descrit en molts tipus cel·lulars (Jentsch et al., 2002).

Tal i com s'ha comentat anteriorment, l'activació d' $ICl_{swell}$  requereix la presència d'ATP intracel·lular (Diaz et al., 1993) encara que no depèn de la seva hidròlisi ja que pot ser substituïda per anàlegs no hidrolitzables. No obstant, l'activació d' $ICl_{swell}$  és independent de la presència d'ATP i GTP intracel·lular en osteoblasts de rata (Gosling et al., 1995). S'ha proposat que l'ATP intracel·lular podria prevenir la pèrdua d'osmòlits orgànics intracel·lulars importants a nivell metabòlic (Jackson et al., 1994). Ja que en algunes cèl·lules l'increment del volum induït per hipotonicitat augmenta els nivells del  $Ca^{2+}$  intracel·lular lliure,



AMPC i inositol fosfats (Baquet et al., 1991) algun d'aquests segons missatgers podria estar involucrat en l'activació dels corrents de  $\text{Cl}^-$  sensibles al volum. No obstant, s'ha descrit que l'activació d'aquests corrents és independent de  $\text{Ca}^{2+}$ , AMPC, PKC i tirosina quinasa intracel·lular en osteoblasts de rata (Gosling et al., 1995). Els diferents treballs suggereixen que la modulació d'aquest corrent podria donar-se per diferents mecanismes activats de manera paral·lela i que podrien variar depenent del tipus cel·lular.

El corrent activat a les cèl·lules trabeculars bovines s'inhibeix pel tamoxifen de manera voltatge-independent bloquejant tant el corrent activat a potencials hiperpolaritzants com despolaritzants. La inhibició d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  per aquest bloquejant ha estat descrit prèviament en altres tipus cel·lulars (Bond et al., 1998a). Ja que el tamoxifen no bloqueja cap altre corrent de  $\text{Cl}^-$  (Valverde et al., 1993) s'ha considerat selectiu d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$ , tot i que originàriament va ser sintetitzat com a antagonista dels receptors d'estrogen i ha estat utilitzat pel tractament d'alguns tipus de càncer pel seu efecte antiestrogen (Jentsch et al., 2002). A les cèl·lules trabeculars bovines, el bloquejant no selectiu, DIDS, inhibeix  $\text{ICl}_{\text{swell}}$  de manera més efectiva a potencials despolaritzants que hiperpolaritzants. A més a més de bloquejar de manera dependent del voltatge, el DIDS facilita la inactivació del corrent de sortida. Alguns autors exposen la hipòtesi de que el DIDS bloquejaria de manera reversible el canal obert i al tenir carrega negativa entraria més fàcilment quan el potencial de membrana està més despolaritzat (Gosling et al., 1995). Ha estat demostrat en nombrosos treballs que el bloqueig per tamoxifen i DIDS és una característica típica d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  (Jentsch et al., 2002).

L'aplicació d'ATP extracel·lular a una elevada concentració (1mM) inhibeix  $\text{ICl}_{\text{swell}}$  a les cèl·lules trabeculars bovines amb un efecte més pronunciat al corrent de sortida que d'entrada d'acord amb el que s'ha descrit en altres treballs realitzats amb cèl·lules endotelials de cervell de rata (von Weikersthal et al., 1999) i epitelials bovines (Wang et al., 2000). L'estimulació hipotònica provoca en cèl·lules trabeculars bovines l'alliberació d'ATP que, a través de l'activació de receptors purinèrgics, activaria amb l'increment de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  els corrents de  $\text{K}^+$  del canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (Soto et al., 2004). Tot i que no es descarta la possibilitat de que altres mecanismes com canvis en el citoesquelet d'actina induïts per l'augment del volum estiguin implicats en l'activació del canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  tal com ha estat descrit en cèl·lules HEK 293 (Jorgensen et al., 2003), l'increment de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  podria ser el responsable de l'activació del  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  per l'augment del volum de les cèl·lules trabeculars (Gasull et al., 2003). En els eritròcits, l'ATP extracel·lular estimula la recuperació del volum cel·lular a través de l'augment de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  i l'activació del  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (Light et al., 1999). La inhibició d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  per ATP extracel·lular podria tenir una important rellevància fisiològica. L'increment de la concentració d'ATP a nivell extracel·lular podria formar part d'un mecanisme fisiològic per controlar l'activació d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  ja que aquest corrent s'inhibeix només a partir d'altres [ATP]. A més a més, l'aplicació d'ATP extracel·lular en un rang micromolar activa  $\text{ICl}_{\text{swell}}$  en astròcits en condicions isotòniques (Darby et al., 2003). Aquests resultats indiquen que l'ATP extracel·lular a més a més d'activar el  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  a través de receptors purinèrgics i l'augment de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  podria modular el RVD regulant

l'activitat d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  de manera autocrina/paracrina. No obstant, caldria estudiar amb profunditat la relació entre l'estimulació dels receptors purinèrgics i l'activació d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  a les cèl·lules trabeculars tal com s'ha descrit en cèl·lules epitelials de rata on els corrents de  $\text{Cl}^-$  activats per hipotonicitat s'inhibeixen bloquejant els receptors purinèrgics amb suramina o disminuint la  $[\text{ATP}]_e$  amb apirasa (Roman et al., 1999).

A l'ull, l'ATP s'allibera a l'humor aquós per les cèl·lules trabeculars quan augmenten el seu volum, per estímuls de tipus mecànic o de diversos agonistes (Joseph et al., 2003) i pot ser alliberat per altres teixits com l'epiteli pigmentat de la retina (Mitchell et al., 1998) o nervis oculars (Maul and Sears, 1979). Cal tenir en compte que l'ATP alliberat pot ser una font d'adenosina i altres nucleòtids i que els agonistes dels receptors d'adenosina redueixen el volum de les cèl·lules trabeculars (Fleischhauer et al., 2003; Soto et al., 2005).

#### Implicació dels diferents corrents de $\text{Cl}^-$ en la regulació del volum de les cèl·lules trabeculars

En el present estudi, els canvis en el volum cel·lular d'aigua s'han mesurat a partir de les variacions en la intensitat de la fluorescència de la calceïna per canvis en la seva concentració intracel·lular. Aquesta és una tècnica fluorescent potent per a mesurar canvis en el volum cel·lular ja que presenta un basal estable i una bona relació entre el senyal i el soroll (Crowe et al., 1995). A més a més, la fluorescència de la calceïna no està afectada per canvis de pH, de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  o de la  $[\text{Mg}^{2+}]_i$  que es poden donar dins d'un rang fisiològic. Aquesta tècnica permet estudiar el comportament osmòtic de les cèl·lules individualment i mesurar canvis de volum cel·lular de fins un 5%. La pèrdua del fluoròfor per efecte del *leak* i el *photobleaching* provoca una deriva en la fluorescència al llarg de l'experiment que ha estat corregida ajustant-la a una equació exponencial simple. La tècnica permet determinar la fracció de fluorescència insensible a la osmolaritat o *background* que correspon a la fluorescència atrapada als compartiments intracel·lulars i que es considera constant. Un cop corregit el *background*, quan la relació entre lleugers canvis de pressió osmòtica ( $\pm 13\%$ ) i fluorescència és lineal, es possible mesurar els canvis de volum cel·lular a partir dels canvis en la fluorescència (Crowe et al., 1995).

El comportament osmòtic de les cèl·lules trabeculars humanes en cultiu es va descriure per primera vegada amb la disminució del seu volum amb solucions hipertòniques (O'Donnell et al., 1995). En els nostres experiments, les cèl·lules trabeculars bovines mostren un comportament osmòtic perfecte quan es troben en contacte amb solucions lleugerament anisomòtiques ja que el volum varia de manera proporcional als canvis osmòtics. Així, amb disminucions i increments d'osmolaritat d'un 13%, el volum de les cèl·lules augmenta i disminueix sense que aparentment s'activi un mecanisme de regulació de volum. Les cèl·lules epitelials T<sub>84</sub>, en canvi, activen un mecanisme de recuperació del volum amb

canvis d'osmolaritat del 10% (Bond et al., 1998a). Aquest fet indica que la potència del mecanisme RVD pot variar depenent del tipus cel·lular.

Les solucions hipotòniques del 40% activen una recuperació del volum a les cèl·lules trabeculars bovines després de l'increment ràpid de volum per l'entrada passiva d'aigua. Aquest mecanisme permet a les cèl·lules trabeculars recuperar un 21% del seu volum en 25 minuts de condicions hipotòniques. En comparació amb els mecanismes descrits en altres tipus cel·lulars, la regulació del volum de les cèl·lules trabeculars no és molt potent. No obstant, a l'hora de comparar-los cal tenir en compte que els graus d'osmolaritat i els períodes de temps varien lleugerament en els diferents treballs. Els astròcits recuperen un 56% del volum amb una hipotonicitat del 50% al cap de 30 minuts (Parkerson and Sontheimer, 2003) mentre que les cèl·lules epitelials T<sub>84</sub> (Bond et al., 1998a) i de glioma (Ernest et al., 2005) recuperen un 100% del seu volum aproximadament als 15 minuts de ser sotmeses a hipotonicitats del 30 i 50%, respectivament. Les cèl·lules epitelials de l'intestí estan sotmeses a grans canvis osmòtics quan es produeix la reabsorció intestinal i les de glioma a profunds canvis de volum en situacions d'isquèmia que acompanyen aquests tipus de càncer. En canvi, la magnitud del RVD a les cèl·lules trabeculars permet especular que no es tracta de cèl·lules altament especialitzades en regular el seu volum en front a grans canvis del mateix possiblement perquè no es troben habitualment en situacions que provoquin grans alteracions del seu volum. No obstant, les cèl·lules trabeculars podrien utilitzar aquest mecanisme en front a canvis de volum més moderats (fisiològics). Una altra explicació podria ser la presència d'una població heterogènea en el teixit trabecular. En cèl·lules trabeculars bovines en cultiu s'ha descrit l'existència d'un tipus cel·lular amb aparença endotelial i d'un altre amb aparença fusiforme i propietats contràctils (Coroneo et al., 1991). La possibilitat de que només les cèl·lules de tipus endotelial presentin la capacitat de regular el volum explicaria que el RVD activat en aquest teixit fos de magnitud inferior que en altres teixits. De totes maneres, s'ha demostrat que el mecanisme de RVD regula el volum cel·lular a les cèl·lules trabeculars humanes (Mitchell et al., 2002) i bovines i que aquest mecanisme pot col·laborar regulant l'evacuació de l'humor aquós tal com es mostra en aquest treball (Soto et al, 2004).

Recentment, s'ha descrit el mecanisme de regulació del volum a les cèl·lules trabeculars bovines amb el colorant fluorescent MQAE i el principi del *quenching* de tal manera que increments de fluorescència determinen augments de volum (Srinivas et al., 2004). Aquest estudi descriu una recuperació del volum de potència similar al mecanisme descrit en els nostres experiments. Amb la presència de gramidicina que forma canals catiónics permeables a Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup> s'ha demostrat que a les cèl·lules trabeculars bovines, amb una robusta conductància aniónica, el RVD està limitat per la conductància de K<sup>+</sup>. Així, en condicions hipotòniques i elevades [Na<sup>+</sup>]<sub>e</sub> es dona un increment de volum per una entrada de Na<sup>+</sup> a l'interior cel·lular, mentre que amb baixes [Na<sup>+</sup>]<sub>e</sub> el volum disminueix per l'eflux de K<sup>+</sup>. Aquests autors suggereixen que a les cèl·lules trabeculars bovines el RVD podria estar limitat per la conductància catiónica necessària per l'eflux de

$K^+$  i per tant podrien restaurar les concentracions iòniques amb dificultat en situacions d'augment del volum cel·lular (Srinivas et al., 2004).

D'altra banda, amb calceïna i mesures morfomètriques s'ha descrit el RVD a les cèl·lules trabeculars humanes (Mitchell et al., 2002). Aquestes cèl·lules presenten una recuperació del volum de magnitud similar a les cèl·lules bovines recuperant aproximadament un 10% del volum en 25 minuts en ser sotmeses a una hipotonicitat del 47% (Mitchell et al., 2002). La recuperació de volum es retarda parcialment amb compostos com el TEA i  $Ba^{2+}$  (que bloquegen canals de  $K^+$ ), el NPPB (bloquejant de canals de  $Cl^-$ ) o el DIOA (bloquejant del cotransportador  $K^+-Cl^-$ ) demostrant la participació d'aquestes proteïnes en el mecanisme de RVD a les cèl·lules trabeculars humanes. En el mateix treball, el registre d'un corrent de  $Cl^-$  sensible a NPPB suggereix que aquesta seria la conductància aniònica implicada en el RVD (Mitchell et al., 2002).

Fins ara, però, no s'han identificat quins canals de  $Cl^-$  i  $K^+$  són responsables de la regulació del volum de les cèl·lules trabeculars. Els experiments de fluorescència amb calceïna utilitzant bloquejants dels diferents canals permeten identificar els canals que poden estar implicats en el RVD, tot i que no determina el grau de participació de cadascun. En condicions hipotòniques i  $Cd^{2+}$  (per bloquejar el CIC-2) mostren que les cèl·lules trabeculars bovines presenten una recuperació de volum d'un 26%, similar al descrit en condicions hipotòniques (21%). La recuperació del volum lleugerament més ràpida en presència de  $Cd^{2+}$  que en condicions hipotòniques es podria explicar perquè el  $Cd^{2+}$  no és un bloquejant específic del CIC-2 i podria estar tenint algun altre efecte sobre el teixit. Però ja que no hi ha diferències significatives entre ambdós grups i que el  $Cd^{2+}$  bloqueja de manera efectiva els corrents mitjançats pel CIC-2 en aquestes cèl·lules, els resultats indiquen que aquest canal no estaria implicat en el RVD. En canvi, la recuperació del volum cel·lular és només del 3% al cap de 25 minuts d'aplicar la solució hipotònica amb tamoxifen. Per tant, el bloqueig d' $ICl_{swell}$  inhibeix gairebé per complet el mecanisme de RVD a les cèl·lules trabeculars.

Aquests resultats coincideixen amb d'altres on s'han utilitzat bloquejants dels canals de  $Cl^-$  en diferents tipus cel·lulars. En cèl·lules intestinals  $T_{84}$ , l'aplicació de bloquejants d' $ICl_{swell}$  com el tamoxifen, DIDS o DDKSK inhibeixen de manera efectiva el RVD. En canvi, aquest mecanisme no s'altera pel  $Cd^{2+}$  que bloqueja completament el CIC-2 (Bond et al., 1998a). Aquests resultats indiquen que en aquestes cèl·lules l'eflux de  $Cl^-$  implicat en el RVD està mitjançat per l' $ICl_{swell}$  i no per CIC-2. Les cèl·lules  $T_{84}$  també regulen el volum després de petits increments de volum induïts per lleugeres hipotonicitats (10%) i aquest mecanisme tampoc no s'altera amb el  $Cd^{2+}$ . Per tant, la regulació del volum d'aquestes cèl·lules és independent de l'activitat del canal CIC-2 (Bond et al., 1998a). A més a més, les cèl·lules acinars dels ratolins *knockout* pel *CLCN2* recuperen el volum en condicions hipotòniques amb la mateixa eficiència que les cèl·lules normals (Nehrke et al., 2002). Els ratolins *knockout* no mostren alteracions en cap de les funcions atribuïdes prèviament al canal CIC-2 (Bösl et al., 2001). Els ratolins presenten degeneració dels fotoreceptors de la retina i de les cèl·lules germinals

masculines que indiquen un possible rol del canal CIC-2 en el manteniment de l'homeòstasi iònica a les interaccions cel·lulars (Bösl et al., 2001; Nehrke et al., 2002), tal com s'ha descrit en el seu canal ortòleg de *C. elegans*, CLH-3 (Strange, 2002).

En un treball recent es mostra que l'aplicació de DIDS o NPPB retarda el RVD en cèl·lules de glioma mentre que el  $\text{Cd}^{2+}$  no té cap efecte (Ernest et al., 2005). No obstant, en aplicar el  $\text{Cd}^{2+}$  amb cadascun dels compostos anteriors el RVD es bloqueja de manera molt més significativa que en aplicar-los sols. Així, en el RVD activat a les cèl·lules de glioma podrien estar implicades dues conductàncies, una sensible al  $\text{Cd}^{2+}$  que podria estar mitjançada pel canal CIC-2 i una insensible que podria tractar-se d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$ . A més a més, furosemida i DIOA retarden el RVD quan s'apliquen per separat mentre que DIOA en presència de NPPB i  $\text{Cd}^{2+}$  el bloqueja per complet. L'alentiment del RVD amb bloquejants del  $\text{K}^+-\text{Cl}^-$  i l'augment de temperatura permet especular que la contribució relativa al RVD dels cotransportadors seria d'un 30-40% i la dels canals iònics d'un 60-70% a les cèl·lules de glioma humà. No obstant, a causa de la manca de farmacologia específica de molts d'aquests canals, caldrien tècniques com l'ús d'*antisenses* o de *siRNA* per determinar la seva contribució relativa al RVD amb exactitud (Ernest et al., 2005). En astròcits corticals, el RVD és insensible a la furosemida i bumetanida però s'inhibeix amb NPPB, àcid niflúmic o DIDS. Igual que en cèl·lules de glioma, el bloqueig més potent amb l'aplicació conjunta de cada un d'aquests compostos amb  $\text{Cd}^{2+}$ , demostra que en astròcits el RVD estaria mitjançat per més d'un canal de  $\text{Cl}^-$  (Parkerson and Sontheimer, 2003).

D'altra banda, en injectar el mRNA de CLCN2 en oòcits de *Xenopus* hi ha un menor augment de volum en condicions hipotòniques possiblement per una major capacitat de recuperar el volum. Aquest treball suggereix la implicació de CIC-2 en la regulació del volum, tot i que no es mesura el mecanisme de RVD directament (Furukawa et al., 1998). En expressar heteròlogament el CIC-2 en cèl·lules Sf9 el RVD s'accelera indicant que aquest canal podria estar implicat la regulació de volum. Aquest mecanisme de RVD resulta sensible al NPPB i no al DIDS coincidint amb la farmacologia del canal CIC-2 (Xiong et al., 1999). Cal tenir en compte que en aquests dos darrers treballs el CIC-2 s'expressa en sistemes heteròlegs on la seva modulació podria resultar alterada. En cèl·lules HTC que expressen el CIC-2 de manera endògena, però, l'aplicació d'anticossos contra la regió amino-terminal fa perdre la sensibilitat del canal al voltatge i retarda el RVD (Roman et al., 2001). Per tot això, els diferents estudis publicats fins a l'actualitat mostren que el canal CIC-2 no sembla la principal conductància responsable del mecanisme RVD, però la seva implicació en la regulació del volum podria dependre del tipus cel·lular.

Amb medi hipotònic i concentracions de tamoxifen superiors a 5 mM, les cèl·lules trabeculars rebenten en menys de 25 minuts. Aquest fet suggereix que la cèl·lula, incapaç de regular el seu volum per la inhibició d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$ , moriria per excés de pressió osmòtica al seu interior. El tamoxifen a concentracions inferiors (5 mM) bloqueja gairebé per complet el RVD a les cèl·lules trabeculars, tot i que

no significa que sigui la única conductància responsable d'aquest mecanisme. Hi ha la possibilitat de que el bloqueig d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  estigui impedit el RVD tot i que la sortida de  $\text{K}^+$  no es trobi inhibida ja que per activar el mecanisme regulador del volum calen les dues conductàncies que mantenen el gradient electroquímic. Això explicaria perquè el bloqueig d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  amb tamoxifen inhibeix de manera tan significativa el mecanisme de RVD a les cèl·lules trabeculars tal com s'ha observat bloquejant els canals de  $\text{Cl}^-$  (Mercado et al., 2004) i els canals de  $\text{K}^+$  en cèl·lules epitelials humanes (Fernández-Fernández et al., 2002). Els nostres resultats demostren que l' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  és responsable del RVD mentre que el  $\text{ClC-2}$  no hi participa. Així, a les cèl·lules trabeculars el canal  $\text{ClC-2}$  no té la funció de regular el volum tal com s'havia suggerit per la seva modulació per l'augment del volum cel·lular. Per tant, aquestes cèl·lules expressen dos canals de  $\text{Cl}^-$  amb característiques electrofisiològiques i funcionals diferents igual que en molts altres tipus cel·lulars (Arreola et al., 1996; Bond et al., 1998a). Els resultats descrits fins l'actualitat indiquen que la implicació dels diferents cotransportadors i canals en el RVD pot dependre del tipus cel·lular.

Cal mencionar que en els experiments realitzats amb cèl·lules trabeculars en condicions hipotòniques (amb o sense  $\text{Cd}^{2+}$ ), en retornar a la solució isotònica el volum disminueix per sota dels valors inicials (basals). Aquest és un fet esperat ja que en retornar a una solució isotònica a partir d'una hipotònica, la solució isotònica resulta hipertònica per a les cèl·lules que es desinflen. Això no es dona en els experiments en condicions hipotòniques i tamoxifen, és a dir, quan les cèl·lules no recuperen el volum. Ja que la disminució de volum en tornar a les condicions isotòniques és similar a l'augment inicial per hipotonicitat és lògic que el volum retorni per sota dels valors basals amb la isotonicitat quan les cèl·lules han recuperat part del seu volum. No es descarta la possibilitat de que els mecanismes que estan recuperant el volum no s'inactivin de manera instantània en retornar a la solució isotònica i continuïn disminuint el volum cel·lular durant un temps breu. Després d'un pic per sota el basal en condicions isotòniques, el volum es recupera fins a valors inicials segurament per l'activació del mecanisme *regulatory volume increase* com s'ha descrit prèviament (Altamirano et al., 1998).

També s'ha descrit que el volum de les cèl·lules trabeculars bovines es modula en condicions isotòniques per l'antiport  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  acoblat al  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  en presència d'elevada  $[\text{HCO}_3^-]_e$  mentre que l'activitat de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  podria predominar en condicions de baixes  $[\text{HCO}_3^-]_e$  (Mitchell et al., 2002). Tant en condicions isotòniques com hipotòniques el volum disminueix en augmentar la  $[\text{AMPc}]_i$ , possiblement per un augment en l'activitat de la conductància de  $\text{K}^+$  (Srinivas et al., 2004) o la inhibició del  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  (O'Donnell et al., 1995).

El  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  regula el volum i la permeabilitat de les cèl·lules trabeculars de tal manera que defectes en aquest cotransportador podrien estar relacionats amb la patologia del glaucoma (O'Donnell et al., 1995). Ja que en condicions isotòniques la inhibició del  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  amb bumetanida incrementa la facilitat d'evacuació i que s'activa en condicions hipertòniques, s'ha suggerit que aquest cotransportador és important en el manteniment del volum cel·lular i en la seva

regulació amb el mecanisme de RVI (Al-Aswad et al., 1999). L'expressió proteica i l'activitat del  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  es troben reduïdes en cèl·lules trabeculars humanes provinents d'individus amb glaucoma. Tot i que l'activitat reduïda d'aquest cotransportador disminuiria el volum de les cèl·lules trabeculars glaucomatoses, el volum d'aquestes és més gran que el de les cèl·lules normals (Putney et al., 1999). Aquest fet demostra que aquest cotransportador no és la única proteïna responsable del manteniment del volum de les cèl·lules trabeculars. El volum de les cèl·lules glaucomatoses podria estar incrementat per una alteració en la funció d'algun altre transportador o canal responsable de l'eflux d'ions. L'alteració d'alguna d'aquestes proteïnes explicaria l'acumulació de  $\text{Cl}^-$  o  $\text{K}^+$  a l'interior de la cèl·lula amb el consegüent augment de volum i la disminució de l'activitat de  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  (Putney et al., 1999). Cal tenir en compte que el volum d'aquestes cèl·lules podria estar incrementat per altres raons, ja que en teixits trabeculars tractats amb DEX s'ha descrit a més a més de la pèrdua de cèl·lules trabeculars que també es dona en individus amb POAG, una activació de les cèl·lules que no moren (Clark et al., 1995). Tot i la reducció de l'activitat del  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  de les cèl·lules glaucomatoses, segueix sent sensible a l'activitat de la bumetanida, de tal manera que aquest cotransportador encara és responsable del volum de les cèl·lules glaucomatoses. Aquest fet indica que el  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  podria ser una diana farmacològica pel tractament del glaucoma. Finalment, l'activitat d'aquest cotransportador en individus d'edat avançada (Putney et al., 1999) i la seva expressió proteica amb el tractament amb DEX superior a 5 dies (Putney et al., 1997) estan reduïdes, fet que permet suggerir una relació entre el volum de les cèl·lules trabeculars alterat i l'augment de la IOP que es dona en alguns casos amb l'edat i amb el tractament d'esteroides.

#### Implicació dels canals de $\text{Cl}^-$ i de $\text{K}^+$ en la regulació de la facilitat d'evacuació

Diferents treballs demostren la relació que existeix entre la osmolaritat i la facilitat d'evacuació de l'humor aquós. Així, solucions hipertòniques augmenten la facilitat d'evacuació segurament per una disminució del volum de les cèl·lules trabeculars. Les solucions hipotòniques disminueixen la facilitat d'evacuació probablement per l'augment del volum cel·lular (Al-Aswad et al., 1999; Gual et al., 1997; Putney et al., 1999). Un cop demostrat que la facilitat d'evacuació es pot modular amb el volum de les cèl·lules trabeculars, l'objectiu final ha estat determinar la implicació dels canals de  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$  que podrien estar involucrats en la regulació del volum cel·lular en la modulació de la facilitat d'evacuació.

La facilitat d'evacuació s'ha mesurat amb la perfusió de segments anteriors oculars a pressió constant. Amb aquest sistema, es poden mesurar els canvis en la facilitat d'evacuació en perfundir amb medis de diverses osmolaritats o en presència de diferents compostos mentre la pressió es manté a un valor constant determinat. Els experiments perfundint solucions hipotòniques en presència de bloquejants dels canals de  $\text{Cl}^-$  i  $\text{K}^+$  permeten determinar quins canals poden modular la facilitat d'evacuació mitjançant la regulació del volum cel·lular.

Els experiments realitzats en condicions hipotòniques mostren que la facilitat d'evacuació disminueix significativament amb la disminució de l'osmolaritat del medi, segurament per un augment del volum de les cèl·lules trabeculars. En aquestes condicions els valors de facilitat es recuperen de manera progressiva de manera que al cap de 25 minuts s'han recuperat en un 8.8%. En aplicar la solució hipotònica amb  $\text{Cd}^{2+}$  la caiguda inicial de la facilitat d'evacuació és igual a la del grup control. A més a més, la recuperació de l'evacuació als 25 minuts és de 11.3% no mostrant diferències significatives amb el grup control. Aquests resultats indiquen que el mecanisme de RVD no resulta alterat amb la inhibició del canal  $\text{ClC-2}$ . En canvi, en aplicar la solució hipotònica en presència de tamoxifen la caiguda inicial de la facilitat d'evacuació és superior que en el grup control als 15 minuts. El retard en la recuperació de l'evacuació es detecta al primer punt mesurat als 15 minuts quan els canals responsables del RVD ja es troben activats per l'augment del volum i per tant el bloqueig del RVD amb tamoxifen ja resulta evident. La recuperació de la facilitat d'evacuació és només del 1.3% al cap de 25 minuts en presència de tamoxifen. Igualment, en bloquejar el canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  amb iberiotoxina la caiguda inicial i la recuperació de l'evacuació resulta similar que en bloquejar  $\text{ICl}_{\text{swell}}$  amb tamoxifen. En canvi, en aplicar l'activador del  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , NS1619, s'escurça la caiguda inicial i es facilita la recuperació de l'evacuació en condicions hipotòniques. Finalment, l'aplicació d'iberiotoxina i de tamoxifen de manera conjunta en condicions hipotòniques provoquen la major caiguda inicial de la facilitat d'evacuació i la seva recuperació resulta bloquejada quasi totalment. Aquests resultats demostren que en la recuperació del volum de les cèl·lules trabeculars hi estarien implicats l' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  i el  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ . Per això, activadors d'aquests corrents podrien facilitar l'evacuació de l'humor aquós a través de disminucions en el volum de les cèl·lules trabeculars.

Aquests resultats es poden correlacionar amb els de les mesures del volum cel·lular. No obstant, cal tenir en compte que els estímuls hipotònics en ambdós tipus d'experiments són de diferent magnitud, ja que en les mesures de volum cel·lular la recuperació del volum resulta més evident i es mesura amb més fiabilitat aplicant una hipotonicitat més severa (40%) que la usada en les mesures de facilitat d'evacuació (20%). Cal tenir en compte que la facilitat d'evacuació en condicions hipotòniques es recupera més lentament i assoleix els valors basals inicials aproximadament a les 2 hores. Els resultats obtinguts mostren que la recuperació de la facilitat d'evacuació és més lenta que la del volum de les cèl·lules trabeculars. Aquest fet es podria explicar perquè la recuperació en la facilitat no resulta evident fins que una gran part de les cèl·lules que formen la malla trabecular han recuperat el seu volum. El fet de que el teixit tingui una estructura en forma de xarxa podria fer que no totes les cèl·lules que el formen estiguin igual de accessibles i per tant responguin igual en aplicar la solució hipotònica. Pel que fa als fàrmacs, l'efecte del tamoxifen en el teixit trabecular sencer aplicat en el medi de perfusió podria tenir menys efecte que en actuar directament sobre cèl·lules individuals. Això explicaria perquè el tamoxifen aplicat en cèl·lules aïllades per mesurar el volum a la mateixa concentració que a la perfusió té un efecte en el bloqueig d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  molt més evident.



Tenint en compte tot això, la recuperació del volum cel·lular mesurada en condicions hipotòniques és lleugerament inferior a la mesurada amb la solució hipotònica en presència de  $\text{Cd}^{2+}$ . Aquest mateix fet s'aprecia en la recuperació de la facilitat d'evacuació segurament per la varietat d'efectes que pot tenir el  $\text{Cd}^{2+}$  a les cèl·lules. No obstant, en cap de les dues mesures no hi ha diferències significatives entre ambdós grups. En condicions hipotòniques i tamoxifen les cèl·lules no recuperen gairebé gens el seu volum en els primers 30 minuts de manera similar al que passa amb la facilitat d'evacuació. Aquests resultats demostren que el teixit trabecular pot modular la facilitat d'evacuació a través d'un mecanisme de regulació del volum cel·lular on la conductància aniònica seria  $\text{ICl}_{\text{swell}}$  però no mitjançada pel canal CIC-2.

### Consideracions finals

Fins ara, s'han descrit diferents mecanismes que poden modular la facilitat d'evacuació per la via convencional entre els quals destaca la regulació del volum de les cèl·lules trabeculars. Darrerament, diferents estudis han demostrat la importància del manteniment del volum cel·lular per a la correcta evacuació de l'humor aquós a través del teixit trabecular. S'ha demostrat que el medi hipotònic, que augmenta el volum de les cèl·lules trabeculars, disminueix la facilitat d'evacuació, mentre que el medi hipertònic, que disminueix el volum cel·lular, la incrementa (Al-Aswad et al., 1999; Gual et al., 1997). Les cèl·lules trabeculars humanes posseeixen una potent activitat del cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  que regula la permeabilitat i el volum d'aquestes cèl·lules, ja que el bloqueig del cotransportador amb àcid etacrínic o bumetanida redueix el volum de les cèl·lules trabeculars i augmenta la facilitat d'evacuació (O'Donnell et al., 1995). A més a més, l'expressió proteica i l'activitat del  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$  es troben reduïdes en cèl·lules trabeculars glaucomatoses, el volum de les quals és més gran que en cèl·lules normals (Putney et al., 1999).

També s'ha descrit la participació de receptors d'adenosina (Fleischhauer et al., 2003) o receptors purinèrgics (Soto et al., 2004) presents a les cèl·lules trabeculars en la regulació del volum cel·lular. El missatger intracel·lular AMPc disminueix el volum de les cèl·lules trabeculars tant en condicions isotòniques com hipotòniques (Srinivas et al., 2004), fet que explica l'augment de la facilitat d'evacuació causat per substàncies que incrementen els nivells d'AMPc (Gilabert et al., 1997). D'altra banda, a les cèl·lules trabeculars humanes s'ha descrit l'activació del mecanisme de regulació del volum RVD que estaria activat en part per canals de  $\text{K}^+$ , canals de  $\text{Cl}^-$  activats per augments de volum i el simport  $\text{K}^+\text{-Cl}^-$  (Mitchell et al., 2002). A les cèl·lules trabeculars bovines s'ha demostrat la presència d'una conductància aniònica regulada pel volum (Srinivas et al., 2004). Finalment, en el present treball es mostra que l'activació d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  i no del canal CIC-2 seria responsable de la regulació del volum de les cèl·lules trabeculars (Comes et al., 2005a). Els resultats d'aquest treball permeten concloure que la regulació del volum cel·lular pot modular la facilitat d'evacuació de l'humor aquós a través d' $\text{ICl}_{\text{swell}}$  i del canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (Soto et al., 2004).

Tenint en compte que la regulació del volum de les cèl·lules trabeculars és important en la modulació de la facilitat d'evacuació i que la seva alteració podria afectar la IOP, caldria estudiar aquests mecanismes en determinades situacions experimentals per determinar la seva rellevància en la patologia del glaucoma. Identificar els canals de  $\text{Cl}^-$  responsables de modular la facilitat d'evacuació a través de la regulació del volum cel·lular és important per conèixer amb més profunditat aquest mecanisme recentment descrit a les cèl·lules trabeculars. La caracterització dels canals implicats en la regulació del volum d'aquestes cèl·lules permetria proposar noves dianes fàrmològiques pel tractament del glaucoma.

# **Conclusions**

---

## CONCLUSIONS

En aquest treball s'ha identificat l'expressió de diferents canals de  $\text{Cl}^-$  dependents de voltatge de la família  $\text{ClC}$  i s'han detectat els canvis en els nivells d'expressió dels canals  $\text{ClC-2}$  i  $\text{ClC-3}$  en condicions relacionades amb el glaucoma. També s'ha descrit la presència funcional de dos corrents de  $\text{Cl}^-$  amb característiques típiques dels corrents de  $\text{Cl}^-$  activats per l'augment del volum cel·lular ( $\text{ICl}_{\text{swell}}$ ) i del canal  $\text{ClC-2}$ . Finalment, s'ha determinat el seu paper en la regulació del volum cel·lular i en la modulació de la facilitat d'evacuació. Seguidament es presenten les conclusions del treball:

1. Les cèl·lules trabeculars humanes expressen els canals de  $\text{Cl}^-$  dependents de voltatge  $\text{ClC-2}$ ,  $\text{ClC-3}$ ,  $\text{ClC-4}$ ,  $\text{ClC-5}$ ,  $\text{ClC-6}$  i  $\text{ClC-7}$  mentre que en les cèl·lules trabeculars bovines no s'han detectat els canals  $\text{ClC-3}$  i  $\text{ClC-4}$ .
2. L'expressió dels canals  $\text{ClC-2}$  i  $\text{ClC-3}$  es modifica en condicions que simulen la patologia del glaucoma com l'elevada IOP o el tractament amb esteroides antiinflamatoris.
3. Les cèl·lules trabeculars expressen de manera funcional el canal  $\text{ClC-2}$ , que pot ser modulats per diferents estímuls com el pH extracel·lular, l'AMPc o l'augment del volum cel·lular.
4. A les cèl·lules trabeculars s'activen corrents de  $\text{Cl}^-$  activats per l'augment del volum cel·lular ( $\text{ICl}_{\text{swell}}$ ) que presenten característiques electrofisiològiques i farmacològiques similars als descrits en altres tipus cel·lulars.
5. L'augment del volum de les cèl·lules trabeculars activa un mecanisme de regulació del volum en el que participen corrents  $\text{Cl}_{\text{swell}}$ , mentre que el canal  $\text{ClC-2}$  no hi contribueix significativament.
6. Els corrents  $\text{Cl}_{\text{swell}}$  i el canal  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  són determinants en la recuperació de la facilitat d'evacuació després d'un augment del volum cel·lular, mentre que el canal  $\text{ClC-2}$  no hi participa de manera significativa.

El volum de les cèl·lules trabeculars i els seus mecanismes de regulació són factors importants que determinen l'evacuació de l'humor aquós a través de la xarxa trabecular. Modificacions en aquests paràmetres poden alterar la funcionalitat del teixit i conduir a situacions patològiques.

## **Referències**

---

## REFERÈNCIES

Agapova, O. A., Kaufman, P. L., Lucarelli, M. J., Gabelt, B. T., and Hernández, M. R. (2003). Differential expression of matrix metalloproteinases in monkey eyes with experimental glaucoma or optic nerve transection. *Brain Res* 967, 132-143.

Ahmed, N., Ramjeesingh, M., Wong, S., Varga, A., Garami, E., and Bear, C. E. (2000). Chloride channel activity of ClC-2 is modified by the actin cytoskeleton. *Biochem J* 352 Pt 3, 789-794.

Al-Aswad, L. A., Gong, H., Lee, D., O'Donnell, M. E., Brandt, J. D., Ryan, W. J., Schroeder, A., and Erickson, K. A. (1999). Effects of Na-K-2Cl cotransport regulators on outflow facility in calf and human eyes in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1695-1701.

Altamirano, J., Brodwick, M. S., and Alvarez-Leefmans, F. J. (1998). Regulatory volume decrease and intracellular  $Ca^{2+}$  in murine neuroblastoma cells studied with fluorescent probes. *J Gen Physiol* 112, 145-160.

Alvarado, J., Murphy, C., and Juster, R. (1984). Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 91, 564-579.

Alvarado, J., Murphy, C., Polansky, J., and Juster, R. (1981). Age-related changes in trabecular meshwork cellularity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21, 714-727.

Anthony, T. L., Pierce, K. L., Stamer, W. D., and Regan, J. W. (1998). Prostaglandin F2 alpha receptors in the human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 315-321.

Arai, A., Kodama, I., and Toyama, J. (1996). Roles of  $Cl^-$  channels and  $Ca^{2+}$  mobilization in stretch-induced increase of SA node pacemaker activity. *Am J Physiol* 270, H1726-H1735.

Arreola, J., Begenisich, T., and Melvin, J. E. (2002). Conformation-dependent regulation of inward rectifier chloride channel gating by extracellular protons. *J Physiol* 541, 103-112.

Arreola, J., Park, K., Melvin, J. E., and Begenisich, T. (1996). Three distinct chloride channels control anion movements in rat parotid acinar cells. *J Physiol* 490 ( Pt 2), 351-362.

Auzanneau, C., Thoreau, V., Kitzis, A., and Becq, F. (2003). A Novel voltage-dependent chloride current activated by extracellular acidic pH in cultured rat Sertoli cells. *J Biol Chem* 278, 19230-19236.

Bali, M., Lipecka, J., Edelman, A., and Fritsch, J. (2001). Regulation of ClC-2 chloride channels in T84 cells by TGF- $\alpha$ . *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C1588-1598.

Banderali, U., and Roy, G. (1992). Anion channels for amino acids in MDCK cells. *Am J Physiol* 263, C1200-1207.

Baquet, A., Miejer, A. J., and Hue, L. (1991). Hepatocyte swelling increases inositol 1,4,5-triphosphate, calcium and cyclic AMP but antagonizes phosphorylase activation by Ca<sup>2+</sup>-dependent hormones. *FEBS Lett* 278, 103-106.

Bàràny, E. H. (1962). The mode of action of pilocarpine on outflow resistance in the eye of a primate. *Invest Ophthalmol* 1, 712-727.

Bardouille, C., Vullhorst, D., and Jockusch, H. (1996). Expression of chloride channel 1 mRNA in cultured myogenic cells: a marker of myotube maturation. *FEBS Lett* 396, 177-180.

Belmonte, C., Garcia-Hirschfeld, J., and Gallar, J. (1997). Neurobiology of ocular pain. *Prog Retin Eye Res* 16, 117.

Berman, E. R. (1991). Aqueous, iris-ciliary body, and trabeculum. In *Biochemistry of the eye* ed. Blakemore, C. Plenum press, New York., 151-200.

Bill, A. (1968). Capillary permeability to and extravascular dynamics of myoglobin, albumin and gammaglobulin in the uvea. *Acta Physiol Scand* 73, 204-212.

Birkenhäger, R., Otto, E., Schürmann, M., Vollmer, M., Ruf, E., Maier-Lutz, I., Beekmann, F., Fekete, A., Omran, H., Feldmann, D. (2001). Mutation of *BSND* causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat Genet* 29, 310-314.

Blaisdell, C. J., Pellettieri, J. P., Loughlin, C. E., Chu, S., and Zeitlin, P. L. (1999). Keratinocyte growth factor stimulates CLC-2 expression in primary fetal rat distal lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 842-847.

Bond, T. D., Ambikapathy, S., Mohammad, S., and Valverde, M. A. (1998a). Osmosensitive Cl<sup>-</sup> currents and their relevance to regulatory volume decrease in human intestinal T84 cells: outwardly vs. inwardly rectifying currents. *J Physiol* 511 ( Pt 1), 45-54.

Bond, T. D., Higgins, C. F., and Valverde, M. A. (1998b). P-glycoprotein and swelling-activated chloride channels. *Methods Enzymol* 292, 359-370.

Bond, T. D., Valverde, M. A., and Higgins, C. F. (1998c). Protein kinase C phosphorylation disengages human and mouse-1a P-glycoproteins from influencing the rate of activation of swelling-activated chloride currents. *J Physiol* 508, 333-340.

Borrás, T. (2003a). Gene expression in the trabecular meshwork and the influence of intraocular pressure. *Prog Retin Eye Res* 22, 435-463.

Borrás, T. (2003b). Recent developments in ocular gene therapy. *Exp Eye Res* 76, 643-652.

Borrás, T., Brandt, C. R., Nickells, R., and Ritch, R. (2002a). Gene therapy for glaucoma: treating a multifaceted, chronic disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2513-2518.

Borrás, T., Rowlette, L. L., Erzurum, S. C., and Epstein, D. L. (1999). Adenoviral reporter gene transfer to the human trabecular meshwork does not alter aqueous humor outflow. Relevance for potential gene therapy of glaucoma. *Gene Ther* 6, 515-524.

Borrás, T., Rowlette, L. L., Tamm, E. R., Gottanka, J., and Epstein, D. L. (2002b). Effects of elevated intraocular pressure on outflow facility and TIGR/MYOC expression in perfused human anterior segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 33-40.

Borsani, G., Rugarli, E. I., Tagliatela, M., Wong, C., and Ballabio, A. (1995). Characterization of a human and murine gene (CLCN3) sharing similarities to voltage-gated chloride channels and to a yeast integral membrane protein. *Genomics* 27, 131-141.

Bösl, M. R., Stein, V., Hubner, C., Zdebik, A. A., Jordt, S. E., Mukhopadhyay, A. K., Davidoff, M. S., Holstein, A. F., and Jentsch, T. J. (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon ClC-2 Cl<sup>-</sup> channel disruption. *Embo J* 20, 1289-1299.



- Bradley, J. M., Anderssohn, A. M., Colvis, C. M., Parshley, D. E., Zhu, X. H., Ruddat, M. S., Samples, J. R., and Acott, T. S. (2000). Mediation of laser trabeculoplasty-induced matrix metalloproteinase expression by IL-1B and TNFB. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 422-430.
- Bradley, J. M., Kelley, M. J., Zhu, X., Anderssohn, A. M., Alexander, J. P., and Acott, T. S. (2001). Effects of mechanical stretching on trabecular matrix metalloproteinases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1505-1513.
- Bradley, J. M., Vranka, J., Colvis, C. M., Conger, D. M., Alexander, J. P., Fisk, A. S., Samples, J. R., and Acott, T. S. (1998). Effect of matrix metalloproteinases activity on outflow in perfused human organ culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 2649-2658.
- Brubaker, R. (1975). The effect of intraocular pressure on conventional outflow resistance in the enucleated human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 14, 286-292.
- Burstein, N., Fischbarg, J., Liebovich, L., and Cole, D. (1984). Electric potential, resistance, and fluid secretion across isolated ciliary body. *Exp Eye Res* 39, 771-779.
- Caballero, M., and Borrás, T. (2001). Inefficient processing of an olfactomedin-deficient myocilin mutant: potential physiological relevance to glaucoma. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 662-670.
- Camras, C. B., and Hedman, K. (2003). Rate of response to latanoprost or timolol in patients with ocular hypertension or glaucoma. *J Glaucoma* 12, 466-469.
- Cannon, C., Basavappa, S., and Strange, K. (1998). Intracellular ionic strength regulates the volume sensitivity of a swelling-activated anion channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 275, C416-C422.
- Caprioli, J. (2003). The ciliary epithelia and aqueous humor. In *Alder's Physiology of the eye* 8th ed. Moses RA, Hart WM, editores. Mosby, St. Louis, Missouri: 7., 204.
- Carew, M. A., and Thorn, P. (1996). Identification of ClC-2-like chloride currents in pig pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch* 433, 84-90.
- Carton, I., Trouet, D., Hermans, D., Barth, H., Aktories, K., Droogmans, G., Jorgensen, N. K., Hoffmann, E. K., Nilius, B., and Eggermont, J. (2002). RhoA exerts a permissive effect on volume-regulated anion channels in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C115-125.

Catalan, M., Niemeyer, M. I., Cid, L. P., and Sepulveda, F. V. (2004). Basolateral CIC-2 chloride channels in surface colon epithelium: regulation by a direct effect of intracellular chloride. *Gastroenterology* 126, 1104-1114.

Chen, T. (2005). Structure and function of CLC channels. *Annu Rev Physiol* 67, 809-839.

Chesnoy-Marchais, D., and Fritsch, J. (1994). Activation of hyperpolarization and atypical osmosensitivity of a Cl<sup>-</sup> current in rat osteoblastic cells. *J Membr Biol* 140, 173-188.

Chou, C. Y., Shen, M. R., Hsu, K. S., Huang, H. Y., and Lin, H. C. (1998). Involvement of PKC-B in regulatory volume decrease responses and activation of volume-sensitive chloride channels in human cervical cancer HT-3 cells. *J Physiol* 512, 435-448.

Chou, C. Y., Shen, M. R., and Wu, S. N. (1995). Volume-sensitive chloride channels associated with human cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 55, 6077-6083.

Chu, S., Murray, C. B., Liu, M. M., and Zeitlin, P. L. (1996). A short CIC-2 mRNA transcript is produced by exon skipping. *Nucleic Acids Res* 24, 3453-3457.

Chu, S., and Zeitlin, P. L. (1997). Alternative mRNA splice variants of the rat CIC-2 chloride channel gene are expressed in lung: genomic sequence and organization of CIC-2. *Nucleic Acids Res* 25, 4153-4159.

Chu, T. C., Keith, C., and Green, K. (1992). Intracellular pH regulation by a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in cultured bovine trabecular meshwork cells. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 70, 772-779.

Cid, L. P., Niemeyer, M. I., Ramirez, A., and Sepulveda, F. V. (2000). Splice variants of a CIC-2 chloride channel with differing functional characteristics. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C1198-1210.

Clark, A. F. (1995). Steroids, ocular hypertension, and glaucoma. *J Glaucoma* 4, 354-369.

Clark, A. F., Wilson, K., de Kater, A. W., Allingham, R. R., and McCartney, M. D. (1995). Dexamethasone-induced ocular hypertension in perfusion-cultured human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 478-489.

Clark, S., Jordt, S. E., Jentsch, T. J., and Mathie, A. (1998). Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J Physiol* 506 ( Pt 3), 665-678.

Cole, D. (1972). Electrolyte composition of anterior and posterior aqueous humor in the sheep. *Ophthalmic Res* 4, 1-12.

Cole, D. (1984). Ocular fluids. In *The eye* ed. H, D. Academic Press, Inc, Orlando, Florida.

Coleman, A. (1999). Glaucoma. *The Lancet* 354, 1803-1810.

Comes, N., Borrás, T., Morales, M., Gual, A., and Gasull, X. (2005a). Identification and electrophysiological characterization of ClC-2 chloride channels in trabecular meshwork cells: modulation by pH and cell swelling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, E-Abstract 1354.

Comes, N., Gasull, X., Gual, A., and Borrás, T. (2005b). Differential expression of the human chloride channel genes in the trabecular meshwork under stress conditions. *Exp Eye Res* 80, 801-813.

Conley, S. M., Bruhn, R. L., Morgan, P. V., and Stamer, D. W. (2004). Selenium's effects on MMP-2 and TIMP-1 secretion by human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 473-479.

Cooper, R., Constable, I., and Davidson, L. (1984). Aqueous humor catecholamines. *Curr Eye Res* 3, 809.

Coroneo, M. T., Korbmacher, C., Flugel, C., Stiemer, B., Lütjen-Drecoll, E., and Wiederholt, M. (1991). Electrical and morphological evidence for heterogeneous populations of cultured bovine trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 52, 375-388.

Counillon, L., Touret, N., Bidet, M., Peterson-Yantorno, K., Coca-Prados, M., Stuart-Tilley, A., Wilhelm, S., Alper, S. L., and Civan, M. M. (2000). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> antiporters of bovine pigmented ciliary epithelial cells. *Pflugers Arch* 440, 667-678.

Crepel, V., Panenka, W., Kelly, M. E., and MacVicar, B. A. (1998). Mitogen-activated protein and tyrosine kinases in the activation of astrocyte volume-activated chloride current. *J Neurosci* 18, 1196-1206.

Crider, J. Y. (2001). Functional pharmacological evidence for EP<sub>2</sub> and EP<sub>4</sub> prostanoid receptors in immortalized human trabecular meshwork and non-pigmented ciliary epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 17, 35-46.

Crosson, C. E., Yates, P. W., Bhat, A. N., Mukhin, Y. V., and Husain, S. (2004). Evidence for multiple P2Y receptors in trabecular meshwork cells. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 484-489.

Crowe, W. E., Altamirano, J., Huerto, L., and Alvarez-Leefmans, F. J. (1995). Volume changes in single N1E-115 neuroblastoma cells measured with a fluorescent probe. *Neuroscience* 69, 283-296.

Cuppoletti, J., Tewari, K. P., Sherry, A. M., Ferrante, C. J., and Malinowska, D. H. (2004). Sites of protein kinase A activation of the human CIC-2 Cl<sup>-</sup> channel. *J Biol Chem* 279, 21849-21856.

Cuppoletti, J., Tewari, K. P., Sherry, A. M., Kupert, E. Y., and Malinowska, D. H. (2001). CIC-2 Cl<sup>-</sup> channels in human lung epithelia: activation by arachidonic acid, amidation, and acid-activated omeprazole. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C46-54.

d'Anglemont de Tassigny, A., Souktani, R., Ghaleh, B., Henry, P., and Berdeaux, A. (2003). Structure and pharmacology of swelling-sensitive chloride channels, I<sub>(Cl,swell)</sub>. *Fundam Clin Pharmacol* 17, 539-553.

Dai, Y., Bongalon, S., Hatton, W. J., Hume, J. R., and Yamboliev, I. (2005). CIC-3 chloride channel is upregulated by hypertrophy and inflammation in rat and canine pulmonary artery. *British Journal of Pharmacology* 145, 5-14.

Darby, M., Kuzmiski, J. B., Panenka, W., Feighan, D., and MacVicar, B. A. (2003). ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J Neurophysiol* 89, 1870-1877.

Davson, H. (1990). The aqueous humor and the intraocular pressure. In *Physiology of the eye* ed. H, D. The Macmillan press Ltd, London.

de Kater, A. W., Spurr-Michaud, S. J., and Gipson, I. K. (1990). Localization of smooth muscle myosin-containing cells in the aqueous outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 347-353.

Decher, N., Lang, H. J., Nilius, B., Bruggemann, A., Busch, A. E., and Steinmeyer, K. (2001). DCPIB is a novel selective blocker of I<sub>(Cl,swell)</sub> and prevents swelling-induced shortening of guinea-pig atrial action potential duration. *Br J Pharmacol* 134, 1467-1479.

- Diaz, M., Valverde, M. A., Higgins, C. F., Rucareanu, C., and Sepulveda, F. V. (1993). Volume-activated chloride channels in HeLa cells are blocked by verapamil and dideoxyforskolin. *Pflugers Arch* 422, 347-353.
- Dickens, C. J., and Hoskins, J. H. D. (1996). Epidemiology and pathophysiology of congenital glaucoma. In Ritch, R, Shields, B M and Krupin, T (ed), *The Glaucomas*, Mosby, St Louis, ed 2, 729-738.
- Dickerson, J. E., Steely, H. T., English-Wright, S. L., and Clark, A. F. (1998). The effect of dexamethasone on integrin and laminin expression in cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 66, 731-738.
- Do, C. W., Lu, W., Mitchell, C. H., and Civan, M. M. (2005). Inhibition of swelling-activated Cl<sup>-</sup> currents by functional anti-CIC-3 antibody in native bovine non-pigmented ciliary epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 948-955.
- Doroshenko, P. (1999). High intracellular chloride delays the activation of the volume-sensitive chloride conductance in mouse L-fibroblasts. *J Physiol* 514 ( Pt 2), 437-446.
- Doroshenko, P., and Neher, E. (1992). Volume-sensitive chloride conductance in bovine chromaffin cell membrane. *J Physiol* 449, 197-218.
- Doroshenko, P., Penner, R., and Neher, E. (1991). Novel chloride conductance in the membrane of bovine chromaffin cells activated by intracellular GTP gamma S. *J Physiol* 436, 711-724.
- Du, X. Y., and Sorota, S. (1997). Cardiac swelling-induced chloride current depolarizes canine atrial myocytes. *Am J Physiol* 272, H1904-1916.
- Du, X. Y., and Sorota, S. (1999). Protein kinase C stimulates swelling-induced chloride current in canine atrial cells. *Pflugers Arch* 437, 227-234.
- Duan, D., Fermini, B., and Nattel, S. (1995). Alpha-adrenergic control of volume-regulated Cl<sup>-</sup> currents in rabbit atrial myocytes. Characterization of a novel ionic regulatory mechanism. *Circ Res* 77, 379-393.
- Duan, D., Winter, C., Cowley, S., Hume, J. R., and Horowitz, B. (1997). Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 390, 417-421.

Duan, D., Zhong, J., Hermoso, M., Satterwhite, C. M., Rossow, C. F., Hatton, W. J., Yamboliev, I., Horowitz, B., and Hume, J. R. (2001). Functional inhibition of native volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in muscle cells and *Xenopus* oocytes by anti-CIC-3 antibody. *J Physiol* 531, 437-444.

Duncan, K. G., Jumper, M. D., Ribeiro, R. C., Bailey, K. R., Yen, P. M., Sugawara, A., Patel, A., Stern, R., Chin, W. W., Baxter, J. D., and Schwartz, D. M. (1999). Human trabecular meshwork cells as a thyroid hormone target tissue: presence of thyroid hormone receptors. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237, 231-240.

Dutzler, R. (2004). The structural basis of CIC chloride channel function. *Trends in Neurosciences* 27, 315-320.

Eder, C., Klee, R., and Heinemann, U. (1998). Involvement of stretch-activated Cl<sup>-</sup> channels in ramification of murine microglia. *J Neurosci* 18, 7127-7137.

Egan, M., Flotte, T., and Afione, S. e. a. (1992). Defective regulation of outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature* 358, 581-584.

Emma, F., Breton, S., Morrison, R., Wright, S., and Strange, K. (1998). Effect of cell swelling on membrane and cytoplasmic distribution of pICln. *Am J Physiol* 274, C1545-C1551.

Epstein, D., and Rohen, J. (1991). Morphology of the trabecular meshwork and inner wall endothelium after cationized ferritin perfusion in the monkey eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 160.

Erickson, K. A., Schroeder, A., and Netland, P. A. (1995). Verapamil increases outflow facility in the human eye. *Exp Eye Res* 61, 565-567.

Erickson-Lamy, K., Korbmacher, C., Schuman, J. S., and Nathanson, J. A. (1991a). Effect of endothelin on outflow facility and accommodation in the monkey eye in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32, 492-495.

Erickson-Lamy, K., Rohen, J. W., and Grant, W. M. (1988). Outflow facility studies in the perfused bovine aqueous outflow pathways. *Curr Eye Res* 7, 799-807.

Erickson-Lamy, K., Rohen, J. W., and Grant, W. M. (1991b). Outflow facility studies in the perfused human ocular anterior segment. *Exp Eye Res* 52, 723-731.

Erickson-Lamy, K. A., and Nathanson, J. A. (1992). Epinephrine increases facility of outflow and cyclic AMP content in the human eye in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 2672-2678.

Ernest, N. J., Weaver, A. K., Van Duyn, L. B., and Sontheimer, H. W. (2005). Relative contribution of chloride channels and transporters to regulatory volume decrease in human glioma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, 1451-1460.

Estévez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhager, R., Otto, E., Hildebrandt, F., and Jentsch, T. J. (2001). Barttin is a Cl<sup>-</sup> channel beta-subunit crucial for renal Cl<sup>-</sup> reabsorption and inner ear K<sup>+</sup> secretion. *Nature* 414, 558-561.

Estévez, R., and Jentsch, T. J. (2002). CLC chloride channels: correlating structure with function. *Curr Opin Struct Biol* 12, 531-539.

Estévez, R., Pusch, M., Ferrer-Costa, C., Orozco, M., and Jentsch, T. J. (2004). Functional and structural conservation of CBS domains from CLC chloride channels. *J Physiol* 557, 363-378.

Fan, H. T., Morishima, S., Kida, H., and Okada, Y. (2001). Phloretin differentially inhibits volume-sensitive and cyclic AMP-activated, but not Ca-activated. *Br J Pharmacol* 133, 1096-1106.

Feeney, L. (1962). Ultrastructure of the nerves in the human trabecular region. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1, 462-474.

Fernández-Fernández, J. M., Nobles, M., Currid, A., Vazquez, E., and Valverde, M. A. (2002). Maxi K<sup>+</sup> channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C1705-1714.

Fleischhauer, J. C., Mitchell, C. H., Stamer, D. W., Karl, M. O., Peterson-Yantorno, K., and Civan, M. M. (2003). Common actions of adenosine receptor agonists in modulating human trabecular meshwork cell transport. *J Membr Biol* 193, 121-136.

Flügel, C., Tamm, E., and Lütjen-Drecoll, E. (1991). Different cell populations in bovine trabecular meshwork: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Exp Eye Res* 52, 681-690.

Friedrich, T., Breiderhoff, T., and Jentsch, T. J. (1999). Mutational analysis demonstrates that ClC-4 and ClC-5 directly mediate plasma membrane currents. *J Biol Chem* 274, 896-902.

Fritsch, J., and Edelman, A. (1996). Modulation of the hyperpolarization-activated Cl<sup>-</sup> current in human intestinal T84 epithelial cells by phosphorylation. *J Physiol* 490 ( Pt 1), 115-128.

Furukawa, T., Horikawa, S., Terai, T., Ogura, T., Katayama, Y., and Hiraoka, M. (1995). Molecular cloning and characterization of a novel truncated form (CIC-2 beta) of CIC-2 alpha (CIC-2G) in rabbit heart. *FEBS Lett* 375, 56-62.

Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y., and Hiraoka, M. (1998). Characteristics of rabbit CIC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *Am J Physiol* 274, C500-512.

Gabelt, B., and Kaufman, P. L. (2002). Aqueous humor hydrodynamics. In *Alder's Physiology of the eye*.

Gabelt, B. T., Wiederholt, M., Clark, A. F., and Kaufman, P. L. (1997). Anterior segment physiology after bumetanide inhibition of Na-K-Cl cotransport. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1700-1707.

Garavaglia, M. L., Rodighiero, S., Bertocchi, C., Manfredi, R., Furst, J., Gschwentner, M., Ritter, M., Bazzini, C., Botta, G., Jakab, M. (2002). ICln channels reconstituted in heart-lipid bilayer are selective to chloride. *Pflugers Arch* 443, 748-753.

Gasull, X., Ferrer, E., Llobet, A., Castellano, A., Nicolas, J. M., Palés, J., and Gual, A. (2003). Cell membrane stretch modulates the high-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in bovine trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 706-714.

Gilabert, R., Gasull, X., Palés, J., Belmonte, C., Bergamini, M. V., and Gual, A. (1997). Facility changes mediated by cAMP in the bovine anterior segment in vitro. *Vision Res* 37, 9-15.

Gonzalez, P., Epstein, D. L., and Borrás, T. (2000). Genes upregulated in the human trabecular meshwork in response to elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 352-361.

Gosling, M., Smith, J. W., and Poyner, D. R. (1995). Characterization of a volume-sensitive chloride current in rat osteoblast-like (ROS 17/2.8) cells. *J Physiol* 485 ( Pt 3), 671-682.

Grierson, I., and Lee, W. (1973). Erythrocyte phagocytosis in the human trabecular meshwork. *Br J Ophthalmol* 57, 400-415.



Gründer, S., Thiemann, A., Pusch, M., and Jentsch, T. J. (1992). Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360, 759-762.

Gschwentner, M., Nagl, U. O., Woll, E., Schmarda, A., Ritter, M., and Paulmichl, M. (1995). Antisense oligonucleotides suppress cell-volume-induced activation of chloride channels. *Pflugers Arch* 430, 464-470.

Gual, A., Blanco, J., Belmonte, C., and Garcia, A. (1983). Dopamine B-hydroxylase activity in human aqueous humor. *Exp Eye Res* 37, 99.

Gual, A., Llobet, A., Gilabert, R., Borrás, M., Palés, J., Bergamini, M. V., and Belmonte, C. (1997). Effects of time of storage, albumin, and osmolality changes on outflow facility (C) of bovine anterior segment in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 2165-2171.

Hall, S. K., Zhang, J., and Lieberman, M. (1995). Cyclic AMP prevents activation of a swelling-induced chloride-sensitive conductance in chick heart cell. *J Physiol* 488, 359-369.

Hamann, S., Zeuthen, T., La Cour, M., Nagelhus, E. A., Ottersen, O. P., Agre, P., and Nielsen, S. (1998). Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1-5 in human and rat eye. *Am J Physiol* 274, C1332-C1345.

Hara-Chikuma, M., Yang, B., Sonawane, N. D., Sasaki, S., Uchida, S., and Verkman, A. S. (2005). CIC-3 chloride channels facilitate endosomal acidification and chloride accumulation. *J Biol Chem* 280, 1241-1247.

Hardy, S. P., Valverde, M. A., Goodfellow, H. R., Higgins, C. F., and Sepulveda, F. V. (1994). Regulation of volume activated chloride channels by protein kinase C-mediated phosphorylation of P-glycoprotein. *Jpn J Physiol* 44 Suppl 2, S9-15.

Hart, W. (1994). Presión intraocular. *Fisiología del ojo* Hart WM (ed): Alder. Mosby-Doyma, Madrid.

Haug, K., Warnstedt, M., Alekov, A. K., Sander, T., Ramirez, A., Poser, B., Maljevic, S., Hebeisen, S., Kubisch, C., Rebstock, J. (2003). Mutations in *CLCN2* encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies. *Nat Genet* 33, 527-532.

Hermoso, M., Satterwhite, C. M., Andrade, Y. N., Hidalgo, J., Wilson, S. M., Horowitz, B., and Hume, J. R. (2002). CIC-3 is a fundamental molecular component of volume-sensitive outwardly rectifying Cl<sup>-</sup> channels and volume regulation in HeLa cells and *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 277, 40066-40074.

Hiramatsu, M., Furukawa, T., Sawanobori, T., and Hiraoka, M. (2002). Ion channel remodeling in cardiac hypertrophy is prevented by blood pressure reduction without affecting heart weight increase in rats with abdominal aortic banding. *J Cardiovasc Pharmacol* 39, 866-874.

Hiraoka, M., Kawano, S., Hirano, S., and Furukawa, T. (1998). Role of cardiac chloride currents in changes in action potential characteristics and arrhythmias. *Cardiovasc Res* 40, 23-33.

Jackson, P. S., Morrison, R., and Strange, K. (1994). The volume-sensitive organic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by nonhydrolytic ATP binding. *Am J Physiol Cell Physiol* 267, C1203-1209.

Jentsch, T. J., Gunther, W., Pusch, M., and Schwappach, B. (1995). Properties of voltage-gated chloride channels of the CIC gene family. *J Physiol* 482, 19S-25S.

Jentsch, T. J., Poët, M., Fuhrmann, J. C., and Zdebik, A. A. (2005). Physiological functions of CLC Cl<sup>-</sup> channels gleaned from human genetic disease and mouse models. *Annu Rev Physiol* 67, 779-807.

Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., and Zdebik, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 82, 503-568.

Jentsch, T. J., Steinmeyer, K., and Schwarz, G. (1990). Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* 348, 510-514.

Jin, N. G., Kim, J. K., Yang, D. K., Cho, S. J., Kim, J. M., Koh, E. J., Jung, H. C., So, I., and Kim, K. W. (2003). Fundamental role of CIC-3 in volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel function and cell volume regulation in AGS cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G938-948.

Johnson, D. H. (1997). Corticoesteroid glaucoma, in: Epstein, D.L., Allingham, R.R., Schuman, J.S. (Eds.), *Chandler and Grant's Glaucoma*. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, pp 404-411.

Jordt, S. E., and Jentsch, T. J. (1997). Molecular dissection of gating in the ClC-2 chloride channel. *Embo J* 16, 1582-1592.

Jorgensen, N. K., Pedersen, S. F., Rasmussen, H. B., Grunnet, M., Klaerke, D. A., and Olesen, S. (2003). Cell swelling activates cloned Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: a role for F-actin cytoskeleton. *Biochem Biophys Acta* 1615, 115-125.

Joseph, S. M., Buchakjian, M. R., and Dubyak, G. R. (2003). Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes. *J Biol Chem* 278, 23331-23342.

Kajita, H., and Brown, P. D. (1997). Inhibition of the inward-rectifying Cl<sup>-</sup> channel in rat choroid plexus by a decrease in extracellular pH. *J Physiol* 498 ( Pt 3), 703-707.

Kajita, H., Omori, K., and Matsuda, H. (2000a). The chloride channel ClC-2 contributes to the inwardly rectifying Cl<sup>-</sup> conductance in cultured porcine choroid plexus epithelial cells. *J Physiol* 523 Pt 2, 313-324.

Kajita, H., Whitwell, C., and Brown, P. D. (2000b). Properties of the inward-rectifying Cl<sup>-</sup> channel in rat choroid plexus: regulation by intracellular messengers and inhibition by divalent cations. *Pflugers Arch* 440, 933-940.

Kanski, J. (1996). *Glaucoma. A: Oftalmología clínica* 3rd ed Kanski, JJ, editor Mosby/Doyma Barcelona 7, 148.

Kaprivinsky, G. B., Ackerman, M. J., Gordon, E. A., Kaprivinsky, L. D., and Clapham, D. E. (1994). Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln. *Cell* 76, 439-448.

Karnezis, T. A., Tripathi, B. J., Dawson, G., Murphy, M. B., and Tripathi, R. C. (1989). Effects of dopamine receptor activation on the level of cyclic AMP in the trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 1090-1094.

Kaufman, P. L., and Bárány, E. H. (1977). Cytochalasin B reversibly increases outflow facility in the eye of the cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16, 47-53.

Kaufman, P. L., and Mittag, T. W. (1994). *Therapy of glaucoma. Medical therapy of glaucoma. A: Glaucoma Kaufman PL, Mitagg TW, editores Mosby-Wolfe, London, 9-11.*

Kawasaki, M., Suzuki, M., Uchida, S., Sasaki, S., and Marumo, F. (1995). Stable and functional expression of the CIC-3 chloride channel in somatic cell lines. *Neuron* *14*, 1285-1291.

Kawasaki, M., Uchida, S., Monkawa, T., Miyawaki, A., Mikoshiba, K., Marumo, F., and Sasaki, S. (1994). Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron* *12*, 597-604.

Kee, C., Sohn, S., and Hwang, J. (2001). Stromelysin gene transfer into cultured human trabecular meshwork cells and rat trabecular meshwork in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *42*, 2856-2860.

Kieferle, S., Fong, P., Bens, M., Vandewalle, A., and Jentsch, T. J. (1994). Two highly homologous members of the CIC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 6943-6947.

Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K. H., and Jentsch, T. J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* *257*, 797-800.

Kornak, U., Kasper, D., Bösl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Delling, G., and Jentsch, T. J. (2001). Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* *104*, 205-215.

Kotera, T., and Brown, P. D. (1993). Calcium-dependent chloride current activated by hyposmotic stress in rat lacrimal acinar cells. *J Membr Biol* *134*, 67-74.

Krauss, A. P., Wiederholt, M., Sturm, A., and Woodward, D. (1997). Prostaglandin effects on the contractility of bovine trabecular meshwork and ciliary muscle. *Exp Eye Res* *64*, 447-453.

Kuang, K., Yiming, M., Wen, Q., Li, Y., Ma, L., Iserovich, P., Verkman, A. S., and Fischbarg, J. (2004). Fluid transport across cultured layers of corneal endothelium from aquaporin-1 null mice. *Exp Eye Res* *78*, 791-798.

Kurz, L. L., Klink, H., Jacob, I., Kuchenbecker, M., Benz, S. (1999). Identification of three cysteines as targets for the Zn<sup>2+</sup> blockade of the human skeletal muscle chloride channel. *J Biol Chem* *274*, 11687-11692.

Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* *78*, 247-306.

- Lemonnier, L., Prevarskaya, N., Shuba, Y., Vanden Abeele, F., Nilius, B., Mazurier, J., and Skyrma, R. (2002).  $Ca^{2+}$  modulation of volume-regulated anion channels: evidence for colocalization with store-operated channels. *FASEB J* 16, 222-224.
- Lepple-Wienhues, A., Rauch, R., Clark, A. F., Grassmann, A., Berweck, S., and Wiederholt, M. (1994). Electrophysiological properties of cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 59, 304-311.
- Lepple-Wienhues, A., Stahl, F., and Wiederholt, M. (1991a). Differential smooth muscle-like contractile properties of trabecular meshwork and ciliary muscle. *Exp Eye Res* 53, 33-38.
- Lepple-Wienhues, A., Stahl, F., and Willner, U. (1991b). Endothelin-evoked contractions in bovine ciliary muscle and trabecular meshwork: interaction with calcium, nifedipine and nickel. *Curr Eye Res* 10, 983-989.
- Lepple-Wienhues, A., Stahl, F., Wunderling, D., and Wiederholt, M. (1992). Effects of endothelin and calcium channel blockers on membrane voltage and intracellular calcium in cultured bovine trabecular meshwork cells. *German J Ophthalmol* 1, 159-163.
- Li, A., Tane, N., and Roy, S. (2004). Fibronectin overexpression inhibits trabecular meshwork cell monolayer permeability. *Molecular Vision* 10, 750-757.
- Li, C., Breton, S., Morrison, R., Cannon, C. L., Emma, F., Sanchez-Olea, R., Bear, C., and Strange, K. (1998). Recombinant pICln forms highly cation-selective channels when reconstituted into artificial and biological membranes. *J Gen Physiol* 112, 727-736.
- Li, X., Shimada, K., Showalter, L. A., and Weinman, S. A. (2000). Biophysical properties of ClC-3 differentiate it from swelling-activated chloride channels in Chinese hamster ovary-K1 cells. *J Biol Chem* 275, 35994-35998.
- Li, X., Wang, T., Zhao, Z., and Weinman, S. A. (2002). The ClC-3 chloride channel promotes acidification of lysosomes in CHO-K1 and Huh-7 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C1483-1491.
- Liang, L. L., Epstein, D. L., de Kater, A. W., Shahsafaei, A., and Erickson-Lamy, K. A. (1992). Ethacrynic acid increases facility of outflow in the human eye in vitro. *Arch Ophthalmol* 110, 106-109.

Light, D. B., Capes, T. L., Gronau, R. T., and Adler, M. R. (1999). Extracellular ATP stimulates volume decrease in *Necturus* red blood cells. *Am J Physiol* 277, 480-491.

Llobet, A., Gasull, X., and Gual, A. (2003). Understanding trabecular meshwork physiology: a key to the control of intraocular pressure? *News Physiol Sci* 18, 205-209.

Llobet, A., Gasull, X., Palés, J., Marti, E., and Gual, A. (2001). Identification of Kir2.1 channel activity in cultured trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2371-2379.

Llobet, A., Gual, A., Palés, J., Barraquer, R., Tobias, E., and Nicolas, J. M. (1999). Bradykinin decreases outflow facility in perfused anterior segments and induces shape changes in passaged BTM cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 113-125.

Lo, W. R., Rowlette, L. L., Caballero, M., Yang, P., Hernández, M. R., and Borrás, T. (2003). Tissue differential microarray analysis of dexamethasone induction reveals potential mechanisms of steroid glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 473-485.

Lütjen-Drecoll, E. (1999). Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes. *Prog Retin Eye Res* 18, 91-119.

Lütjen-Drecoll, E., and Rhoen, J. W. (1994). The normal anterior segment. Anatomy of aqueous humor formation and drainage. In *Glaucoma*, vol 7 ed. Kaufman, P. L. and Mittag, T. W. Mosby-Wolfe, London.

Maeno, E., Ishizaki, Y., Kanaseki, T., Hazama, A., and Okada, Y. (2000). Normotonic cell shrinkage because of disordered volume regulation is an early prerequisite to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9487-9492.

Maepea, O., and Bill, A. (1989). The pressure in the episcleral veins, Schlemm's canal and the trabecular meshwork in monkeys: effects of changes in intraocular pressure. *Exp Eye Res* 49, 645.

Maertens, C., Wei, L., Voets, T., Droogmans, G., and Nilius, B. (1999). Block by fluoxetine of volume-regulated anion channels. *Br J Pharmacol* 126, 508-514.

Malinowska, D. H., Kupert, E. Y., Bahinski, A., Sherry, A. M., and Cuppoletti, J. (1995). Cloning, functional expression, and characterization of a PKA-activated gastric Cl<sup>-</sup> channel. *Am J Physiol* 268, C191-200.

Matsumoto, Y., and Johnson, D. H. (1997a). Dexamethasone decreases phagocytosis by human trabecular meshwork cells in situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1902-1907.

Matsumoto, Y., and Johnson, D. H. (1997b). Trabecular meshwork phagocytosis in glaucomatous eyes. *Ophthalmologica* 211, 147-152.

Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S., and Marumo, F. (1999). Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the ClC-K1 chloride channel. *Nat Genet* 21, 95-98.

Maul, E., and Sears, M. (1979). ATP is released into the rabbit eye by antidromic stimulation of the trigeminal nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18, 256-262.

Mercado, A., Mount, D. B., and Gamba, G. (2004). Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochem Res* 29, 17-25.

Miles, E. W., Rhee, S., and Davies, D. R. (1999). The molecular basis of substrate channeling. *J Biol Chem* 274, 12193-12196.

Miller, C., and White, M. M. (1984). Dimeric structure of single chloride channels from *Torpedo* electropax. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 2772-2775.

Mintenig, G. M., Sánchez-Vives, M. V., Martin, C., Gual, A., and Belmonte, C. (1995). Sensory receptors in the anterior uvea of the cat's eye. An in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 1615-1624.

Mintenig, G. M., Valverde, M. A., Sepulveda, F. V., Gill, D. R., Hyde, S. C., Kirk, J., and Higgins, C. F. (1993). Specific inhibitors distinguish the chloride channel and drug transporter functions associated with the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Receptors Channels* 1, 305-313.

Mitchell, C. H., Carre, D. A., McGlenn, A. M., Stone, R. A., and Civan, M. M. (1998). A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7174-7178.

Mitchell, C. H., Fleischhauer, J. C., Stamer, W. D., Peterson-Yantorno, K., and Civan, M. M. (2002). Human trabecular meshwork cell volume regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C315-326.

Mohammad-Panah, R., Gyomory, K., Rommens, J., Choudhury, M., Li, C., Wang, Y., and Bear, C. E. (2001). CIC-2 contributes to native chloride secretion by a human intestinal cell line, Caco-2. *J Biol Chem* 276, 8306-8313.

Moorman, J. R., Palmer, C. J., John, J. E., III, Durieux, M. E., and Jones, L. R. (1992). Phospholemman expression induces a hyperpolarization-activated chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 267, 14551-14554.

Morales, M. M., Nascimento, D. S., Capella, M. A., Lopes, A. G., and Guggino, W. B. (2001). Arginine vasopressin regulates CFTR and CIC-2 mRNA expression in rat kidney cortex and medulla. *Pflugers Arch* 443, 202-211.

Moser, T., Chow, R. H., and Neher, E. (1995). Swelling-induced catecholamine secretion recorded from single chromaffin cells. *Pflugers Arch* 431, 193-203.

Nascimento, D. S., Reis, C. U., Goldenberg, R. C., Ortiga-Carvalho, T. M., Pazos-Moura, C. C., Guggino, S. E., Guggino, W. B., and Morales, M. M. (2003). Estrogen modulates CIC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflugers Arch* 446, 593-599.

Nehrke, K., Arreola, J., Nguyen, H. V., Pilato, J., Richardson, L., Okunade, G., Baggs, R., Shull, G. E., and Melvin, J. E. (2002). Loss of hyperpolarization-activated Cl<sup>-</sup> current in salivary acinar cells from *Clcn2* knockout mice. *J Biol Chem* 277, 23604-23611.

Niemeyer, M. I., Cid, L. P., Zuniga, L., Catalan, M., and Sepulveda, F. V. (2003). A conserved pore-lining glutamate as a voltage- and chloride-dependent gate in the CIC-2 chloride channel. *J Physiol* 553, 873-879.

Niemeyer, M. I., Yusef, Y. R., Cornejo, I., Flores, C. A., Sepulveda, F. V., and Cid, L. P. (2004). Functional evaluation of human CIC-2 chloride channel mutations associated with idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Genomics* 19, 74-83.

Nietsch, H. H., Roe, M. W., Fiekers, J. F., Moore, A. L., and Lidofsky, S. D. (2000). Activation of potassium and chloride channels by tumor necrosis factor alpha. Role in liver cell death. *J Biol Chem* 275, 20556-20561.

Nilius, B., Eggermont, J., Voets, T., and Droogmans, G. (1996). Volume-activated Cl<sup>-</sup> channels. *Gen Pharmacol* 27, 1131-1140.

Nilius, B., Prenen, J., Walsh, M. (2000). Myosin light chain phosphorylation-dependent modulation of volume-regulated anion channels in macrovascular endothelium. *FEBS Lett* 466, 346-350.



- Nilius, B., Seherer, J., Viana, F., De Greef, C., Raeymaekers, L., Eggermont, J., and Droogmans, G. (1994). Volume-activated Cl<sup>-</sup> currents in different mammalian non-excitabile cell types. *Pflugers Arch* 428, 364-371.
- Nilius, B., Voets, T., Prenen, J., Barth, H., Aktories, K., Kaibuchi, K., Droogmans, G., and Eggermont, J. (1999). Role of Rho and Rho kinase in the activation of volume-regulated anion channels in bovine endothelial cells. *J Physiol* 516, 67-74.
- Nilsson, S., Sperber, G., and Bill, A. (1986). Effects of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on intraocular pressure, facility of outflow and formation of aqueous humor in the monkey. *Exp Eye Res* 43, 849-857.
- Nilsson, S. F. E., and Bill, A. (1994). The normal anterior segment. Physiology and neurophysiology of aqueous humor inflow and outflow. In *Glaucoma*, vol 7 ed. Kaufman, P. L. and Mittag, T. W. Mosby-Wolfe, London.
- Noulin, J. F., Fayolle-Julien, E., Desaphy, J. F., Poindessault, J. P., and Joffre, M. (1996). Swelling and cAMP on hyperpolarization-activated Cl<sup>-</sup> conductance in rat Leydig cells. *Am J Physiol* 271, C74-84.
- O'Donnell, M. E., Brandt, J. D., and Curry, F. R. (1995). Na-K-Cl cotransport regulates intracellular volume and monolayer permeability of trabecular meshwork cells. *Am J Physiol* 268, C1067-1074.
- Obenberger, J., Starka, L., and Hampl, R. (1971). Quantitative determination of endogenous corticosteroids in the rabbit plasma and aqueous humor. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 183, 203-211.
- Oiki, S., Kubo, M., and Okada, Y. (1994). Mg<sup>2+</sup> and ATP-dependence of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels in human epithelial cells. *Jpn J Physiol* 44, S77-S79.
- Okada, Y., Maeno, E., Shimizu, T., Dezaki, K., Wang, J., and Morishima, S. (2001). Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol* 532, 3-16.
- Okka, M., Tian, B., and Kaufman, P. L. (2004). Effects of latrunculin B on outflow facility, intraocular pressure, corneal thickness, and miotic and accommodative responses to pilocarpine in monkeys. *Trans Am Ophthalmol Soc* 102, 251-257.
- Ornellas, D. S., Nascimento, D. S., Christoph, D. H., Guggino, W. B., and Morales, M. M. (2002). Aldosterone and high-NaCl diet modulate ClC-2 chloride channel gene expression in rat kidney. *Pflugers Arch* 444, 193-201.

Ortego, J., Escribano, J., and Coca-Prados, M. (1997). Cloning and characterization of subtracted cDNAs from a human ciliary body library encoding TIGR, a protein involved in juvenile open angle glaucoma with homology to myosin and olfactomedin. *FEBS Lett* *413*, 349-353.

Pang, I. H., Shade, D. L., Matsumoto, S., Steely, H. T., and De Santis, L. (1996). Presence of functional type B natriuretic peptide receptor in human ocular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *37*, 1724-1731.

Park, K., Arreola, J., Begenisich, T., and Melvin, J. E. (1998). Comparison of voltage-activated Cl<sup>-</sup> channels in rat parotid acinar cells with ClC-2 in a mammalian expression system. *J Membr Biol* *163*, 87-95.

Parkerson, K., and Sontheimer, H. (2003). Contribution of chloride channels to volume regulation of cortical astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* *284*, 1460-1467.

Pasantes-Morales, H., and Morales, S. (2000). Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron* *86*, 414-427.

Paulmichl, M., Li, Y., Wickman, K., Ackerman, M., Peralta, E., and Clapham, D. (1992). New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* *356*, 238-241.

Peterson, J. A., Tian, B., Bershady, A. D., Volberg, T., Gangnon, R. E., Spector, I., Geiger, B., and Kaufman, P. L. (1999). Latrunculin-A increases outflow facility in the monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *40*, 931-941.

Phipps, D. J., Branch, D. R., and Schlichter, L. C. (1996). Chloride-channel block inhibits lymphocyte activation and signalling. *Cell Signal* *8*, 141-146.

Piwon, N., Gunther, W., Schwake, M., Bösl, M. R., and Jentsch, T. J. (2000). ClC-5 Cl<sup>-</sup> channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* *408*, 369-373.

Polansky, J. R., Fauss, D. J., Chen, P. (1997). Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product. *Ophthalmologica* *211*, 126-139.

Pusch, M., Jordt, S. E., Stein, V., and Jentsch, T. J. (1999). Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J Physiol* *515* ( Pt 2), 341-353.

Putney, L. K., Brandt, J. D., and O'Donnell, M. E. (1997). Effects of dexamethasone on sodium-potassium-chloride cotransport in trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1229-1240.

Putney, L. K., Brandt, J. D., and O'Donnell, M. E. (1999). Na-K-Cl cotransport in normal and glaucomatous human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 425-434.

Rezaie, T., Child, A., Hitchings, R., Brice, G., Miller, L., Coca-Prados, M., Heon, E., Krupin, T., Ritch, R., Kreutzer, D. (2002). Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *Science* 295, 1077-1079.

Rich, A., Farrugia, G., and Rae, J. L. (1999). Effects of melatonin on ionic currents in cultured ocular tissues. *Am J Physiol* 276, C923-929.

Ritch, R., and Liebmann, J. (1994a). Exfoliation syndrome, a Kaufman, PL, Mittag, TM (eds). *Glaucoma Textbook of Ophthalmology*, editat per Podos, F i Yanoff, M Mosby-Wolf, London.

Ritch, R., and Liebmann, J. (1994b). Pigment dispersion syndrome, a Kaufman, PL, Mittag, TM (eds). *Glaucoma Textbook of Ophthalmology*, editat per Podos, F i Yanoff, M Mosby-Wolf, London.

Ritter, M., Ravasio, A., Jakab, M., Chwatal, S., Furst, J., Laich, A., Gschwentner, M., Signorelli, S., Burtscher, C., Eichmuller, S., and Paulmichl, M. (2003). Cell swelling stimulates cytosol to membrane transposition of ICln. *J Biol Chem* 278, 50163-50174.

Roman, R. M., Feranchak, A. P., Salter, K. D., Wang, Y., and Fitz, J. G. (1999). Endogenous ATP release regulates Cl<sup>-</sup> secretion in cultured human and rat biliary epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 276, 1391-1400.

Roman, R. M., Smith, R. L., Feranchak, A. P., Clayton, G. H., Doctor, R. B., and Fitz, J. G. (2001). CIC-2 chloride channels contribute to HTC cell volume homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G344-353.

Rubera, I., Tauc, M., Poujeol, C., Bohn, M. T., Bidet, M., De Renzis, G., and Poujeol, P. (1997). Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> conductances activated by cell swelling in primary cultures of rabbit distal bright convoluted tubules. *Am J Physiol* 273, F680-F697.

Ruskell, G. (1975). The sources of trabecular meshwork nerve terminals. *Exp Eye Res* 20, 181-182.

Ruskell, G. (1976). The source of the nerve fibres of the trabeculae and adjacent structures in monkey eyes. *Exp Eye Res* 23, 449-454.

Sakaguchi, M., Matsuura, H., and Ehara, T. (1997). Swelling-induced Cl<sup>-</sup> current in guinea-pig atrial myocytes: inhibition by gibenclamide. *505*, 41-52.

Sardini, A., Amey, J. S., Weylandt, K. H., Nobles, M., Valverde, M. A., and Higgins, C. F. (2003). Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels. *Biochim Biophys Acta* 1618, 153-162.

Sato, T., and Roy, S. (2002). Effect of high glucose on fibronectin expression and cell proliferation in trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 170-175.

Schliess, F., Schreiber, R., and Haussinger, D. (1995). Activation of extracellular signal-regulated kinases Erk-1 and Erk-2 by cell swelling in H4IIE hepatoma cells. *Biochem J* 309, 13-17.

Schwiebert, E. M., Cid-Soto, L. P., Stafford, D., Carter, M., Blaisdell, C. J., Zeitlin, P. L., Guggino, W. B., and Cutting, G. R. (1998). Analysis of ClC-2 channels as an alternative pathway for chloride conduction in cystic fibrosis airway cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3879-3884.

Schwiebert, E. M., Mills, J. W., and Santon, B. A. (1994). Actin-based cytoskeleton regulates a chloride channel and cell volume in a renal cortical collecting duct cell line. *J Biol Chem* 269, 7081-7089.

Shade, D. L., Clark, A. F., and Pang, I. H. (1996). Effects of muscarinic agents on cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 62, 201-210.

Shimada, K., Li, X., Xu, G., Nowak, D. E., Showalter, L. A., and Weinman, S. A. (2000). Expression and canalicular localization of two isoforms of the ClC-3 chloride channel from rat hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G268-276.

Shimizu, S., Lichter, P. R., Johnson, A. T., Zhou, Z., Higashi, M., Gottfredsdottir, M., Othman, M., Moroi, S. E., Rozsa, F. W., Schertzer, R. M. (2000). Age-dependent prevalence of mutations at the GLC1A locus in primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 130, 165-177.

Shirato, S., Murphy, C. G., Bloom, E., Franse-Carman, L., Maglio, M. T., Polansky, J. R., and Alvarado, J. A. (1989). Kinetics of phagocytosis in trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 2499-2511.

Shuba, L. M., Ogura, T., and F., M. T. (1996). Kinetic evidence distinguishing volume-sensitive chloride current from other types in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 491, 69-80.

Skuta, G. L. (1994). Specific types of glaucoma. The angle-closure glaucomas. A: Glaucoma Kaufman PL, Mitagg TW, editores Mosby-Wolfe, London, 8-11.

Sorota, S. (1992). Swelling-induced chloride-sensitive current in canine atrial cells revealed by whole-cell patch-clamp method. *Circ Res* 70, 679-687.

Soto, D., Comes, N., Ferrer, E., Morales, M., Escalada, A., Palés, J., Solsona, C., Gual, A., and Gasull, X. (2004). Modulation of aqueous humor outflow by ionic mechanisms involved in trabecular meshwork cell volume regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 3650-3661.

Soto, D., Pintor, J., Peral, A., Gual, A., and Gasull, X. (2005). Effects of dinucleoside polyphosphates on trabecular meshwork cells and aqueous humor outflow facility. *J Pharmacol Exp Ther* 314, 1042-1051.

Srinivas, S. P., Maertens, C., Goon, L. H., Goon, L., Satpathy, M., Yue, B. Y., Droogmans, G., and Nilius, B. (2004). Cell volume response to hyposmotic shock and elevated cAMP in bovine trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 78, 15-26.

Staley, K., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C., and Jentsch, T. J. (1996). Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron* 17, 543-551.

Stamer, W. D., Huang, Y., Seftor, R. E., Svensson, S. S., Snyder, R. W., and Regan, J. W. (1996). Cultured human trabecular meshwork cells express functional alpha 2A adrenergic receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 2426-2433.

Stamer, W. D., Peppel, K., O'Donnell, M. E., Roberts, B. C., Wu, F., and Epstein, D. L. (2001). Expression of aquaporin-1 in human trabecular meshwork cells: role in resting cell volume. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1803-1811.

Stamer, W. D., Seftor, R. E., Snyder, R. W., and Regan, J. W. (1995a). Cultured human trabecular meshwork cells express aquaporin-1 water channels. *Curr Eye Res* 14, 1095-1100.

Stamer, W. D., Seftor, R. E., Williams, S. K., Samaha, H. A., and Snyder, R. W. (1995b). Isolation and culture of human trabecular meshwork cells by extracellular matrix digestion. *Curr Eye Res* 14, 611-617.

Steely, H. T., Browder, S. L., Julian, M. B., Miggans, S. T., Wilson, K. L., and Clark, A. F. (1992). The effects of dexamethasone on fibronectin expression in cultured human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33.

Steinhausen, K., Stumpff, F., Strauss, O., Thieme, H., and Wiederholt, M. (2000). Influence of muscarinic agonists and tyrosine kinase inhibitors on L-type  $Ca^{2+}$  channels in human and bovine trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 70, 285-293.

Steinmeyer, K., Ortland, C., and Jentsch, T. J. (1991). Primary structure and functional expression of a developmentally regulated skeletal muscle chloride channel. *Nature* 354, 301-304.

Stobrawa, S. M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A. A., Bösl, M. R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A. (2001). Disruption of *ClC-3*, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* 29, 185-196.

Stoilov, I., Akarsu, A., and Sarfarazi, M. (1997). Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the *GLC3A* locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet* 6, 641-647.

Stone, E. M., Fingert, J. H., Alward, W. L., Nguyen, T. D., Polansky, J. R., Sunden, S. L., Nishimura, D., Clark, A. F., Nystuen, A., Nichols, B. E. (1997). Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science* 275, 668-670.

Stone, R. A. (1986). Vasoactive intestinal polypeptide and the ocular innervation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27, 951-962.

Straiker, A. J., Maguire, G., Mackie, K., and Lindsey, J. (1999). Localization of cannabinoid  $CB_1$  receptors in the human anterior eye and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2442-2448.

Strange, K. (2002). Of mice and worms: novel insights into *ClC-2* anion channel physiology. *News Physiol Sci* 17, 11-16.

Stumpff, F., Que, Y., Boxberger, M., Steinhausen, K., Strauss, O., and Wiederholt, M. (1999a). Flufenamic acid stimulates maxi-K channels in trabecular meshwork cells. *Pflugers Arch* 437, R79.

Stumpff, F., Que, Y., Boxberger, M., Strauss, O., and Wiederholt, M. (1999b). Stimulation of maxi-K channels in trabecular meshwork by tyrosine kinase inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1404-1417.

Stumpff, F., Strauss, O., Boxberger, M., and Wiederholt, M. (1997). Characterization of maxi-K-channels in bovine trabecular meshwork and their activation by cyclic guanosine monophosphate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1883-1892.

Stumpff, F., and Wiederholt, M. (2000). Regulation of trabecular meshwork contractility. *Ophthalmologica* 214, 33-53.

Stutzin, A., Torres, R., Oporto, M. (1999). Separate taurine and chloride efflux pathways activated during regulatory volume decrease. *Am J Physiol* 277, C392-C402.

Szucs, G., Heinke, S., Droogmans, G., and Nilius, B. (1996). Activation of the volume-sensitive chloride current in vascular endothelial cells requires a permissive intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. *Pflugers Arch* 431, 467-469.

Takashima, Y., Taniguchi, T., Yoshida, M., Haque, M. S. R., Igaki, T., Itoh, H., Nakao, K., Honda, Y., and Yoshimura, N. (1998). Ocular hypotension induced by intravitreally injected C-type natriuretic peptide. *Exp Eye Res* 66, 89-96.

Tamm, E., Flügel, C., Stefani, F. H., and Rohen, J. W. (1992). Contractile cells in the human scleral spur. *Exp Eye Res* 54, 531-543.

Tamm, E., and Lutjen-Drecoll, E. (1996). Ciliary body. *Mic Res Tech* 33, 390-439.

Tamm, E. R., Russell, P., Epstein, D. L., Johnson, D. H., and Piatigorsky, J. (1999). Modulation of myocilin/TIGR expression in human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2577-2582.

Tanaka, H., Matsui, S., Kawanishi, T., and Shigenobu, K. (1996). Use of chloride blockers: a novel approach for cardioprotection against ischemia-reperfusion damage. *J Pharmacol Exp Ther* 278, 854-861.

Tarran, R., Argent, B. E., and Gray, M. A. (2000). Regulation of a hyperpolarization-activated chloride current in murine respiratory ciliated cells. *J Physiol* 524 Pt 2, 353-364.

Taylor, A., Streilein, J., and Cousins, S. (1994). Immunoreactive vasoactive intestinal peptide contributes to the immunosuppressive activity of normal aqueous humor. *J Immunol* 153, 1080-1086.

Tewari, K. P., Malinowska, D. H., Sherry, A. M., and Cuppoletti, J. (2000). PKA and arachidonic acid activation of human recombinant ClC-2 chloride channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C40-50.

Thiemann, A., Gründer, S., Pusch, M., and Jentsch, T. J. (1992). A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356, 57-60.

Thieme, H., Hildebrandt, J., Choritz, L., Strauss, O., and Wiederholt, M. (2001). Muscarinic receptors of the M2 subtype in human and bovine trabecular meshwork. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239, 310-315.

Thieme, H., Nass, J. U., Nuskovski, M., Bechrakis, N. E., Stumpff, F., Strauss, O., and Wiederholt, M. (1999a). The effects of protein kinase C (PKC) on trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 3254-3261.

Thieme, H., Nass, J. U., Nuskovski, M., and Wiederholt, M. (1999b). The effects of the carbonic anhydrase inhibitors methazolamide, diclofenamide and dorzolamide on trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Exp Eye Res* 69, 455-458.

Thieme, H., Nuskovski, M., Nass, J. U., Pleyer, U., Strauss, O., and Wiederholt, M. (2000). Mediation of calcium-independent contraction in trabecular meshwork through protein kinase C and rho-A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 4240-4246.

Thoroed, S. M., Bryan-Sisneros, A., and Doroshenko, P. (1999). Protein phosphotyrosine phosphatase inhibitors suppress regulatory volume decrease and the volume-sensitive Cl<sup>-</sup> conductance in mouse fibroblasts. *Pflugers Arch* 438, 133-140.

Tian, B., Geiger, B., Epstein, D. L., and Kaufman, P. L. (2000). Cytoskeletal involvement in the regulation of aqueous humor outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 619-623.

Tripathi, R., Chan, W., Li, J., and Tripathi, B. (1994). Trabecular cells express the TGF-beta 2 gene and secrete cytokine. *Exp Eye Res* 58, 523-528.

Tripathi, R., and Tripathi, B. (1984). Anatomy, orbit and adnexa of the human eye. In *The eye* 3rd ed. ed. PRESS, A. Davson H, Orlando, Florida.



- Tripathi, R. C. (1968). Ultrastructure of Schlemm's canal in relation to aqueous outflow. *Exp Eye Res* 7, 335-341.
- Tseng, G. (1992). Cell swelling increases membrane conductance of canine cardiac cells: evidence for a volume-sensitive Cl channel. *Am J Physiol* 262, C1056-C1068.
- Tzounopoulos, T., Maylie, J., and Adelman, J. P. (1995). Induction of endogenous channels by high levels of heterologous membrane proteins in *Xenopus* oocytes. *Biophys J* 69, 904-908.
- Uusitalo, R., Palkama, A., and Stjernschantz, J. (1973). An electron microscopic study of the blood-aqueous barrier in the ciliary body and iris of the rabbit. *Exp Eye Res* 17, 49-56.
- Valverde, M. A. (1999). CIC channels: leaving the dark ages on the verge of a new millennium. *Curr Opin Cell Biol* 11, 509-516.
- Valverde, M. A., Bond, T. D., Hardy, S. P., Taylor, J. C., Higgins, C. F., Altamirano, J., and Alvarez-Leefmans, F. J. (1996). The multidrug resistance P-glycoprotein modulates cell regulatory volume decrease. *Embo J* 15, 4460-4468.
- Valverde, M. A., Diaz, M., Sepulveda, F. V., Gill, D. R., Hyde, S. C., and Higgins, C. F. (1992). Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355, 830-833.
- Valverde, M. A., Mintenig, G. M., and Sepulveda, F. V. (1993). Differential effects of tamoxifen and I<sup>-</sup> on three distinguishable chloride currents activated in T84 intestinal cells. *Pflugers Arch* 425, 552-554.
- Vanoye, C., Altenberg, G., and Reuss, L. (1997). P-glycoprotein is not a swelling-activated Cl<sup>-</sup> channel: possible role as a Cl<sup>-</sup> channel regulator. *J Physiol (Lond)* 502, 249-258.
- Varela, D., Niemeyer, M. I., Cid, L. P., and Sepulveda, F. V. (2002). Effect of an N-terminus deletion on voltage-dependent gating of the CIC-2 chloride channel. *J Physiol* 544, 363-372.
- Verdon, V., Winpenny, J. P., Whitfield, K. J., Argent, B. E., and Gray, M. A. (1995). Volume-activated chloride currents in pancreatic duct cells. *J Membr Biol* 147, 173-183.

Verkman, A. S. (2003). Role of aquaporin water channels in eye function. *Exp Eye Res* 76, 137-143.

Vittitow, J., and Borrás, T. (2002). Expression of optineurin, a glaucoma-linked gene, is influenced by elevated intraocular pressure. *Biochem Biophys Res Commun* 298, 67-74.

Vittitow, J., and Borrás, T. (2004). Genes expressed in the human trabecular meshwork during pressure-induced homeostatic response. *J Cell Physiol* 201, 126-137.

Vittitow, J. L., Garg, R., Rowlette, L. L., Epstein, D. L., O'Brien, E. T., and Borrás, T. (2002). Gene transfer of dominant-negative RhoA increases outflow facility in perfused human anterior segment cultures. *Mol Vis* 8, 32-44.

Voets, T., Manolopoulos, V., Eggermont, J., Ellory, C., Droogmans, G., and Nilius, B. (1998). Regulation of a swelling-activated chloride current in bovine endothelium by protein tyrosine phosphorylation and G proteins. *J Physiol* 506, 341-352.

Voets, T., Szucs, G., Droogmans, G., and Nilius, B. (1995). Blockers of volume-activated Cl<sup>-</sup> currents inhibit endothelial cell proliferation. *Pflugers Arch* 431, 132-134.

Voets, T., Wei, L., De Smet, P., Van Driessche, W., Eggermont, J., Droogmans, G., and Nilius, B. (1997). Downregulation of volume-activated Cl<sup>-</sup> currents during muscle differentiation. *Am J Physiol* 272, C667-674.

von Weikersthal, S. F., Barrand, M. A., and Hladky, S. B. (1999). Functional and molecular characterization of a volume-sensitive chloride current in rat brain endothelial cells. *J Physiol* 516, 75-84.

Wang, G. X., Hatton, W. J., Wang, G. L., Zhong, J., Yamboliev, I., Duan, D., and Hume, J. R. (2003). Functional effects of novel anti-CIC-3 antibodies on native volume-sensitive osmolyte and anion channels in cardiac and smooth muscle cells. *Am J Physiol Circ Physiol* 285, 1453-1463.

Wang, L., Chen, L., and Jacob, T. J. C. (2000). The role of CIC-3 in volume-activated chloride currents and volume regulation in bovine epithelial cells demonstrated by antisense inhibition. *J Physiol* 524, 63-75.

Wang, L., Chen, L., Walker, V., and Jacob, T. J. C. (1998). Antisense to *MDR1* mRNA reduces P-glycoprotein expression, swelling-activated Cl<sup>-</sup> current and volume regulation in bovine ciliary epithelial cells. *J Physiol* 511, 33-44.

- Watson, P. A. (1989). Accumulation of cAMP and calcium in S49 mouse lymphoma cells following hyposmotic swelling. *J Biol Chem* 264, 14735-14740.
- Wax, M. B., Molinoff, P. B., Alvarado, J., and Polansky, J. (1989). Characterization of beta-adrenergic receptors in cultured human trabecular cells and in human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30, 51-57.
- Wax, M. B., Tezel, G., Kobayashi, S., and Hernández, M. R. (2000). Responses of different cell lines from ocular tissues to elevated hydrostatic pressure. *Br J Ophthalmol* 84, 423-428.
- Weinreb, R. N., Bloom, E., Baxter, J. D., Alvarado, J., Lan, N., O'Donnell, J., and Polansky, J. R. (1981). Detection of glucocorticoid receptors in cultured human trabecular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21, 403-407.
- Weinreb, R. N., and Khaw, P. T. (2004). Primary open-angle glaucoma. *The Lancet* 363, 1711-1720.
- Weylandt, K. H., Valverde, M. A., Nobles, M., Raguz, S., Amey, J. S., Diaz, M., Nastrucci, C., Higgins, C. F., and Sardini, A. (2001). Human CIC-3 is not the swelling-activated chloride channel involved in cell volume regulation. *J Biol Chem* 276, 17461-17467.
- Wiederholt, M. (1998). Direct involvement of trabecular meshwork in the regulation of aqueous humor outflow. *Curr Opin Ophthalmol* 9, 46-49.
- Wiederholt, M., Dörschner, N., and Groth, J. (1997). Effect of diuretics, channel modulators and signal interceptors on contractility of the trabecular meshwork. *Ophthalmologica* 211, 153-160.
- Wiederholt, M., Groth, J., and Strauss, O. (1998). Role of protein tyrosine kinase on regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 1012-1020.
- Wiederholt, M., Schäfer, R., Wagner, U., and Lepple-Wienhues, A. (1996). Contractile response of the isolated trabecular meshwork and ciliary muscle to cholinergic and adrenergic agents. *German J Ophthalmol* 5, 146-153.
- Wiederholt, M., Sturm, A., and Lepple-Wienhues, A. (1994). Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 2515-2520.

Wiederholt, M., Thieme, H., and Stumpff, F. (2000). The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Prog Retin Eye Res* 19, 271-295.

WoldeMussie, E., and Ruiz, G. (1992). Effect of histamine on signal transduction in cultured human trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res* 11, 987-995.

Wordinger, R. J., Clark, A. F., Agarwal, R., Lambert, W., McNatt, L., Wilson, S. E., Qu, Z., and Fung, B. K. (1998). Cultured human trabecular meshwork cells express functional growth factor receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 1575-1589.

WuDunn, D. (2001). The effect of mechanical strain on matrix metalloproteinase production by bovine trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res* 22, 394-397.

Xiong, H., Li, C., Garami, E., Wang, Y., Ramjeesingh, M., Galley, K., and Bear, C. E. (1999). CIC-2 activation modulates regulatory volume decrease. *J Membr Biol* 167, 215-221.

Yamamoto-Mizuma, S., Wang, G. X., Liu, L. L., Schegg, K., Hatton, W. J., and Duan, D. (2004). Altered properties of volume-sensitive osmolyte and anion channels (VSOACs) and membrane protein expression in cardiac and smooth muscle myocytes from *Clcn3<sup>-/-</sup>* mice. *J Physiol* 557, 439-456.

Yuan, L., and Neufeld, A. H. (2000). Tumor necrosis factor-alpha: a potentially neurodestructive cytokine produced by glia in the human glaucomatous optic nerve head. *Glia* 32, 42-50.

Yue, B. Y. (1996). The extracellular matrix and its modulation in the trabecular meshwork. *Surv Ophthalmol* 40, 379-390.

Zholos, A., Beck, B., Sydorenko, V., Lemonnier, L., Bordat, P., Prevarskaya, N., and Skyrma, R. (2005).  $Ca^{2+}$  and volume-sensitive chloride currents are differentially regulated by agonists and store-operated  $Ca^{2+}$  entry. *J Gen Physiol* 125, 197-211.

Zhong, J., Wang, G. X., Hatton, W. J., Yamboliev, I. A., Walsh, M., and Hume, J. R. (2002). Regulation of volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in pulmonary arterial smooth muscle cells by PKC. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C1627-C1636.

Zhou, L., Li, Y., and Yue, B. Y. (1999). Alteration of cytoskeletal structure, integrin distribution, and migratory activity by phagocytic challenge in cells from an ocular tissue-the trabecular meshwork. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35, 144-149.