

Tesis doctoral

**Caracterización de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$   
capacitativa en células trabeculares**

Elena Abad Adán

Directores de tesis: Dr. Xavier Gasull Casanova y Dr. Arcadi Gual Sala

Departamento de Ciencias Fisiológicas I  
Universidad de Barcelona



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente la oportunidad que los Dres. Arcadi Gual y Xavier Gasull me ofrecieron, hace tiempo, de iniciarme en el mundo de la investigación básica en biomedicina, teniendo en cuenta que mi formación académica era en física y no biología o medicina, propiamente. Para mi ha sido el principio de un trabajo intenso, en lo bueno y en lo malo, pero sin duda intenso y apasionante que en definitiva, me ha permitido dedicarme a lo que más me gusta: el conocimiento científico.

Quiero reconocer muy especialmente la labor científica del Dr. Miguel Morales y darle las gracias por su confianza, apoyo y consejo científico porque han sido válidos y muy alentadores.

En todo este tiempo de doctorado he conocido a mucha gente de muy diversas procedencias geográficas y de formación, y aunque no os puedo nombrar uno por uno, a todos los aludidos os digo que ha sido un placer compartir tiempo y conocimientos con vosotros. Pero sin duda, mis gracias más apasionadas se las dedico a las personas con las que he trabajado a diario, a mis primeros 'maestros' en esta andadura, muchas gracias a David, Núria, Neus, Azucena y Anna, porque inicié este camino, codo con codo, trabajando a vuestro lado y me enseñasteis mucho, fue un placer teneros como ejemplo a seguir y un lujo como compañeros y amigos.

Más adelante, en la última etapa de doctorado, llegaron Emilio, Astrid, Gisela, Germán y Olga, a algunos os he podido conocer más y a otros menos, por razones de tiempo, pero cada uno, otra vez, me ha enseñado algo o me ha dado algún sabio consejo, gracias por haber estado en los buenos y en los no tan buenos momentos.

Y mi agradecimiento también va para los compañeros del laboratorio de biofísica del departamento de C. Fisiológicas I, Núria, Ferranda, Irene y Félix, gracias por haber compartido vuestro conocimiento conmigo para la realización de los experimentos de microscopía de tracción y AFM.

Cuando pienso en todos vosotros y en lo que hemos vivido juntos me siento muy alegre, gracias peña!

No me olvido tampoco de mis compañeros en el laboratorio de Farmacología en Halifax, Nova Scotia. First of all, all my gratitude for the scientific and personal support to Dr. Melanie Kelly during my stage in her lab, it was a pleasure to work with you. And thanks a lot to Manuel and Brendan, I had an unforgettable time with you friends. Also, I want to appreciate to Noel, Christine and Svetlana for their kindness every day. And Carissa, I wait for your visit!

Y por supuesto, GRACIAS a mis padres y a mis amigos por su apoyo y curiosidad por este trabajo, y a Kino que siempre me ha animado y apoyado durante el proceso final de escritura.



A mis padres,  
Niqui y Miguel Ángel.



## **o.ÍNDICE**



## **o.ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14-79</b>
<b>1.a ESTRUCTURA DEL OJO.....</b>	<b>14-22</b>
1.a. 1 GLOBO OCULAR: principales estructuras y sus funciones.....	14-19
<b>-La retina</b>	
<b>-Nervio óptico: transmisión de la información eléctrica visual al cerebro</b>	
1.a. 2 CÁMARAS POSTERIOR Y ANTERIOR .....	20-22
1.a. 2. 1 Cámara posterior	
<b>-Procesos ciliares: formación del humor acuoso (HA)</b>	
1.a. 2. 2 Cámara anterior	
<b>-Ángulo iridocorneal: drenaje del humor acuoso</b>	
<b>1.b FISILOGIA Y FISIOPATOLOGIA DEL HUMOR ACUOSO (GLAUCOMA).....</b>	<b>22-37</b>
1.b. 1 CICLO DINÁMICO DEL FLUJO DEL HUMOR ACUOSO.....	23-26
<b>-Técnicas de medición del flujo de HA</b>	
1.b. 2 GLAUCOMA: NEUROPATOLOGÍA.....	26-32
<b>-Tipos de glaucoma (origen)</b>	
<b>-Glaucoma de presión intraocular normal</b>	
1.b. 3 TERAPIAS PARA EL GLAUCOMA: FÁRMACOS Y CIRUGÍA.....	32-37
<b>-Sintomatología y Diagnóstico</b>	
<b>-Tratamiento médico: farmacología clásica</b>	
<b>-Cirugía de Glaucoma</b>	
<b>-Nuevas perspectivas en la terapia del glaucoma</b>	
<b>1.c MALLA TRABECULAR (TM).....</b>	<b>38-65</b>
1.c.1 DESCRIPCIÓN DEL TEJIDO TRABECULAR.....	38-60
<b>-Células trabeculares y sus mecanismos autoreguladores</b>	
<b>-Receptores de membrana en células trabeculares</b>	

**-Canales iónicos en células trabeculares**  
**-Matriz extracelular (ECM)**

1.c.2 CITOESQUELETO ACTINA/RHO QUINASA Y PROPIEDADES  
CONTRÁCTILES DE LA MALLA TRABECULAR.....60-65

**-Citoesqueleto y contracción celular en la regulación de la  
evacuación del HA**  
**-Efectos de la dexametasona en células trabeculares**

**1.d REGULACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR.....65-79**

1.d.1 MOVILIZACIÓN DEL Ca<sup>2+</sup> INTRACELULAR.....69-71

1.d.2 ENTRADA DE Ca<sup>2+</sup> ACTIVADA POR LOS DEPÓSITOS DE Ca<sup>2+</sup>  
INTRACELULARES (SOCE) .....71-79

- Mecanismos de activación de la SOCE**
- Farmacología de la SOCE**
- TRPs y la entrada de calcio operada por los depósitos intracelulares**
- CRAC: Orai y Stim1**

**2. OBJETIVOS.....81**

**3. MATERIALES y MÉTODOS.....83-94**

3a. Cultivos primarios de células trabeculares .....83-85

3b. Medidas de calcio intracelular y óxido nítrico.....85-87

3c. Medidas electrofisiológicas de corrientes de membrana.....87-90

3d. Microscopía de tracción para medidas de contracción celular.....90-92

3e. Western blot.....92

3f. Análisis estadístico.....92

3g. Perfusión de segmento anterior de ojo.....92-94

**4. RESULTADOS.....96-135**

**4a. Señalización de calcio en las células trabeculares por estímulo de  
sustancias vasoconstrictoras: bradiquinina y endotelina-1.....96-107**

4a.1 Calcio intracelular y calcio extracelular.....96-100

4a.2 Sustancias bloqueadoras de la entrada de calcio extracelular: 2-APB, La<sup>3+</sup>,  
Gd<sup>3+</sup> y SKF96365.....100-103

4a.3 Corrientes activadas por bradiquinina.....103-106

4a.4 Proteínas de canal TRPC identificadas en células trabeculares .....106-107

**4b. La depleción de los depósitos de calcio intracelulares activa la  
entrada 'capacitativa' de calcio.....108-120**

4b.1	Señalización de calcio activada por tapsigargina .....	108-112
4b.2	Sustancias bloqueadoras de la entrada de calcio estimulada por tapsigargina: 2-APB, La <sup>3+</sup> , Gd <sup>3+</sup> .....	112-114
4b.3	Corrientes activadas por depleción de los depósitos intracelulares de calcio: tapsigargina y IP <sub>3</sub> .....	114-118
4b.3a	Tapsigargina (TG)	
4b.3b	1,4,5 inositol-trifosfato (IP <sub>3</sub> )	
4b.4	Selectividad de las corrientes inducidas por IP <sub>3</sub> + EGTA: solución libre de cationes divalentes (Na <sup>+</sup> ).....	118-120
<b>4c.</b>	<b>Participación del calcio intracelular y extracelular en la contracción celular estimulada por bradiquinina y endotelina-1 en BTMs.....</b>	<b>121-131</b>
4c.1	Contracción inducida por bradiquinina y endotelina-1 .....	121-128
4c.2	Posible relación entre los canales de potasio BK <sub>Ca</sub> y la entrada de calcio estimulada por ET-1.....	128-129
4c.3	Posible relación entre la movilización de calcio inducida por ET-1 y la producción de óxido nítrico.....	129-131
<b>4d.</b>	<b>Perfusión de segmento anterior de ojo bovino: Disminución de la facilidad de evacuación de la malla trabecular por efecto de endotelina-1.....</b>	<b>131-132</b>
<b>4e.</b>	<b>Movilización de Ca<sup>2+</sup> y dexametasona (DEX).....</b>	<b>132-135</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>137-159</b>
<b>5a.</b>	<b>Entrada Capacitativa de Ca<sup>2+</sup> extracelular (CCE).....</b>	<b>139-150</b>
5a.1	<i>Receptores de inositol trifosfato (InsP<sub>3</sub>R)</i> .....	141
5a.2	<i>STIM1, Orai y TRPCs</i> .....	142-144
5a.3	Entrada de calcio capacitativa y no capacitativa en células trabeculares.....	144-146
5a.4	Bloqueadores de la entrada capacitativa (y no-capacitativa) de Ca <sup>2+</sup> .....	147
5a.5	<i>Particularidades del 2-APB</i> .....	147-148
5a.6	Lantánidos.....	148-149
5a.7	SKF96365 .....	149
5a.8	Corrientes monovalentes: característica de las corrientes tipo CRAC.....	149-150
5a.9	Funciones de las corrientes de Ca <sup>2+</sup> dependientes de los depósitos intracelulares .....	150
<b>5b.</b>	<b>Homeostasis del Ca<sup>2+</sup> y Glucocorticoides.....</b>	<b>151-152</b>
<b>5c.</b>	<b>Contracción celular y movilización de Ca<sup>2+</sup>.....</b>	<b>152-156</b>

5c.1	Contracción dependiente de Ca <sup>2+</sup> .....	153-154
5c.2	Contracción independiente de Ca <sup>2+</sup> .....	154
5c.3	Contracción sostenida.....	155
5c.4	Relajación de la contracción sostenida.....	155-156
<b>5d.</b>	<b>Deficiencia reguladora en la contracción en ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular.....</b>	<b>156-159</b>
5d.1	Síntesis de NO y contracción en células trabeculares.....	157-158
5d.2	Canales BK <sub>Ca</sub> y contracción en células trabeculares.....	158-159
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>161</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>163-200</b>

### Artículos publicados:

**‘Activation of Store-Operated Ca<sup>2+</sup> channels in Trabecular Meshwork Cells’** Elena Abad, Gisela Lorente, Nuria Gavara, Miguel Morales, Arcadi Gual and Xavier Gasull; Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008 Feb; 49(2): 677-86.

**‘Identification and functional characterization of ClC-2 chloride channels in trabecular meshwork cells’** Núria Comes, E. Abad, M. Morales, T. Borrás, A. Gual and X.Gasull; Experimental Eye Research. 2006; 83(4):877-889.

### Índice de abreviaturas

AA: ácido araquidónico  
 Ap<sub>n</sub>A: polifosfatos de adenosina  
 ATP: adenosina trifosfato  
 Ba<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>: ión bario  
 BK (Bk o BK): bradiquinina  
 BTM: *bovine trabecular meshwork*  
 BK<sub>Ca</sub>, BKCa (o maxiK): canales de potasio de alta conductancia dependientes de calcio  
 Ca<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>: ión calcio  
 Ca<sup>2+</sup>-CaM: Ca<sup>2+</sup>/calmodulina  
 cAMP: adenosina monofosfato cíclico  
 CB: cannabinoides, CBR: receptores cannabinoides  
 CCE: *capacitative calcium entry*  
 Ch: carbacol  
 ClC: canales de cloruro  
 CM: músculo ciliar  
 CRAC: *calcium-release-activated Ca<sup>2+</sup> current*

DAG: diacilglicerol  
 ECM: matriz extracelular  
 EF-hand: región de enlace al calcio  
 ER: retículo endoplasmático  
 ERK: *extracellular signal-regulated kinases*  
 ET-1: endotelina-1  
 G: proteína G  
 Gd<sup>3+</sup>, Gd<sub>3</sub><sup>+</sup>: ión gadolinio  
 GAGs: glicosaminoglicanos  
 GCP: glaucoma congénito primario  
 GPAA: glaucoma primario de ángulo abierto  
 GPAC: glaucoma primario de ángulo cerrado  
 GPCR: *G-protein coupled receptor*  
 GTP: guanosina trifosfato  
 HA: humor acuoso  
 HTM, hTM: *human trabecular meshwork*  
 IP<sub>3</sub>: inositol trifosfato, IP<sub>3</sub>R: receptores de IP<sub>3</sub>  
 iPLA: fosfolipasa independiente de Ca<sup>2+</sup>  
 JCT: *juxtacanalicular connective tissue*  
 La<sup>3+</sup>, La<sub>3</sub><sup>+</sup>: ión lantano  
 MAPK: *mitogen-activated protein kinase*  
 MLCK: *myosin light chain kinase*  
 MLCP: *myosin light chain phosphorylation*  
 MMP: metaloproteinasas de matriz  
 NO: óxido nítrico  
 NOS: sintasa del óxido nítrico  
 OAG: *oleyl-acetyl-glycerol*  
 PAI: *plasminogen activator inhibitor*  
 PDGF: *platelet-derived growth factor*  
 PG: prostaglandinas  
 PGE<sub>2</sub>: prostaglandinas asociadas a receptor EP<sub>2</sub>  
 PGF<sub>2</sub>: prostaglandinas asociadas a receptor FP<sub>2</sub>  
 PIO: presión intraocular  
 PKA: proteína quinasa A  
 PKC: proteína quinasa C  
 PLA: fosfolipasa A  
 PLC: enzima fosfolipasa C  
 PM: membrana plasmática  
 PMA: ésteres de forbol  
 PMCA: bomba Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática  
 RACC: *receptor- activated calcium current/channel*  
 RhoA: *Ras homolog gene family, member A*  
 ROCC: *receptor- operated calcium current/channel*  
 ROCK: *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase*  
 RVD: *regulatory volume decrease*  
 SC: canal de Schlemm  
 SERCA: bomba sarco/endoplasmática Ca<sup>2+</sup>-ATPasa  
 smA: *alfa-smooth muscle actin*  
 SOCC: *store-operated calcium channel*  
 SOCE: *store-operated calcium entry*  
 STIM: *Stromal interaction molecule 1*

TG: taspigargina

TM: *trabecular meshwork*, malla trabecular, red trabecular o trabéculo.

TNF-alfa: factor de necrosis tumoral

TRP: proteína *transient receptor potential*

VEGF: *vascular endothelial growth factor*

## Índice de Figuras

### Introducción

1. Sección sagital del globo ocular humano.....	15
2. Sección sagital media superior de la parte posterior y anterior del globo ocular.....	16
3. Músculos y tendones externos del globo ocular.....	17
4. Organización de las diferentes capas celulares en la retina.....	18
5. Zonas principales de la cámara anterior.....	22
6. Circulación del HA.....	24
7. Detalle de las vías trabecular y uveoscleral de drenaje del HA en el ángulo iridocorneal (a) y dibujo anatomía ángulo iridocorneal (b).....	25
8. Excavación y atrofia del nervio óptico.....	27
9. Dibujo de las capas de la malla trabecular.....	39
10. Imagen de la superficie intracameral de la red trabecular.....	40
11. Diagrama esquemático de las vías de drenaje del HA en la zona del ángulo iridocorneal.....	43
12. El flujo de HA es drenado a través de la red trabecular.....	61
13. Esquema de las vías de señalización posibles de la entrada capacitativa de calcio (SOCE) para BK y ET-1.....	68
14. Modelo del receptor 1 de IP <sub>3</sub> de ratón.....	70
15. Activación de PLC- señal transitoria de Ca <sup>2+</sup> .....	70
16. Modelos de acoplamiento entre STIM1 y Orai1.....	79

### Métodos y Materiales

1. Imagen 1: Disección ojo bovino.....	84
2. Imagen 2: Extracción iris, vítreo, cristalino y CM.....	84
3. Imagen 3: Segmento anterior y anillo trabecular.....	85
4. Figura 1: Configuración ‘whole-cell voltaje-clamp’.....	88
5. Figura 2: Esquema gel de poliacrilamida con <i>beads</i> fluorescentes.....	91

### Resultados

1. Fig 1: Pico de calcio: parámetros básicos.....	97
2. Fig 1b: [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> movilizado por BK y ET-1.....	98
3. Fig 1c: Parámetro T <sub>70</sub> para BK y ET-1.....	99
4. Tabla 1 y 2: Parámetros T <sub>70</sub> y amplitud para BK y ET-1.....	99-100
5. Figura 2: Protocolo de reintroducción de Ca <sup>2+</sup> al medio extracelular.....	100
6. Fig 2a: Reintroducción de Ca <sup>2+</sup> al medio extracelular para BK.....	101
7. Fig 2b: Estadística de la fig.2 <sup>a</sup> .....	102
8. Fig 2c: Reintroducción de Ca <sup>2+</sup> al medio extracelular para ET-1 en HTM5.....	103
9. Fig 2d: Estadística de la fig. 2c.....	103
10. Fig 3a: Densidad de corriente transmembrana inducida por BK; I <sub>BK</sub> .....	104
11. Fig 3b: Corriente vs voltaje de I <sub>BK</sub> .....	105
12. Fig 3c: Densidad de corriente transmembrana inducida por ET-1 en HTM5.....	106
13. Fig 4: Western blot de las proteínas TRPC en cultivo y tejido de BTM.....	107
14. Fig 5 a y b: [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> movilizado por TG y estadística T <sub>70</sub> .....	109

15. Fig 6a: Reintroducción de Ca <sup>2+</sup> al medio extracelular para TG.....	110
16. Fig 6b: Relación transitorios de Ca <sup>2+</sup> intracelular y entrada de Ca <sup>2+</sup> extracelular; TG.....	111
17. Fig 6c: Relación transitorios de Ca <sup>2+</sup> intracelular y entrada de Ca <sup>2+</sup> extracelular; BK.....	112
18. Fig 7a, b, c y d: Bloqueadores entrada de Ca <sup>2+</sup> inducida por TG.....	113
19. Fig 7e: Reintroducción de Ca <sup>2+</sup> al medio extracelular para TG en HTM5.....	114
20. Fig 8a: Densidad de corriente transmembrana inducida por TG; I <sub>TG</sub> .....	115
21. Fig 8b: Corriente vs voltaje de I <sub>TG</sub> .....	116
22. Fig 9a: Densidad de corriente transmembrana inducida por diálisis IP <sub>3</sub> ; I <sub>IP3</sub> .....	117
23. Fig 9b: Corriente vs voltaje de I <sub>IP3</sub> .....	118
24. Fig 10a: Selectividad de I <sub>IP3</sub> : corrientes monovalentes.....	119
25. Fig 10b: Estadística de la fig. 10 a.....	119
26. Fig 11a: Bloqueo por La <sup>3+</sup> de I <sub>IP3</sub> .....	120
27. Fig 11b: Estadística bloqueadores de IP <sub>3</sub> : La <sup>3+</sup> , Gd <sup>3+</sup> .....	120
28. Fig 12 y 13a: Imágenes en campo claro de células BTM sobre gel de poliacrilamida.....	120-122
29. Fig 13b y c: Mapas 'pseudocolor' de tracción de una célula BTM (b:basal; c:BK).....	123
30. Fig 14a: Evolución de la contracción inducida por BK.....	124
31. Fig 14b: Estadística fig. 14a.....	125
32. Fig 15a: Evolución de la contracción inducida por ET-1.....	125-126
33. Fig 15b: Estadística fig. 15a .....	126
34. Fig 15c: Evoluciones de la contracción inducida por BK y ET-1 en presencia de 2-APB.....	127
35. Fig 15d: Evoluciones de la contracción inducida por ET-1 a tiempos largos en presencia y ausencia de Ca <sup>2+</sup> extracelular.....	128
36. Fig 16: [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> movilizado por ET-1 en presencia de iberiotoxina.....	129
37. Fig 17a: Producción de NO en presencia, ausencia de Ca <sup>2+</sup> extracelular y control positivo (NOC-18).....	130
38. Fig 17b: Producción de NO en presencia, ausencia de Ca <sup>2+</sup> extracelular y control negativo (L-NAME).....	131
39. Fig 18: Efecto de la ET-1 sobre la facilidad de evacuación de la malla trabecular (perfusión de segmento anterior de ojo bovino).....	132
40. Fig 19: [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>c</sub> movilizado por BK en células BTM pretratadas con dexametasona.....	133
41. Fig 19 a y b: Estadística de parámetros de amplitud y T <sub>70</sub> en varios días de pre-tratamiento con dexametasona.....	134-135

# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.a ESTRUCTURA DEL OJO

#### 1.a.1 GLOBO OCULAR: PRINCIPALES ESTRUCTURAS Y SUS FUNCIONES

Gracias a las estructuras oculares, a su conformación, su arquitectura y composición podemos gozar del tan complejo sentido de la vista. El ojo humano está comprendido por diversas capas y estructuras muy diversas que forman en conjunto: el globo ocular. El globo ocular tiene una forma esferoidal y está formado por 3 capas concéntricas:

1. Túnica externa: córnea y esclerótica.
2. Túnica media o vascular: úvea, formada por iris, cuerpo ciliar y coroides.
3. Túnica interna: retina

En el interior del globo se distinguen cavidades o compartimentos:

**Cámara anterior:** es el espacio limitado por la córnea, el iris y el diafragma iridopupilar. Está ocupada por humor acuoso y en el ojo humano su volumen aproximado es de 0'2 ml.

**Cámara posterior:** limitada por el iris, la pupila, el cristalino y las fibras de la zónula. Es el lugar de formación del humor acuoso (0'06 ml).

**Cámara vítrea:** limitada por la cara posterior del cristalino y el fondo del ojo (la retina). Está ocupada por el humor vítreo (4'5 ml).

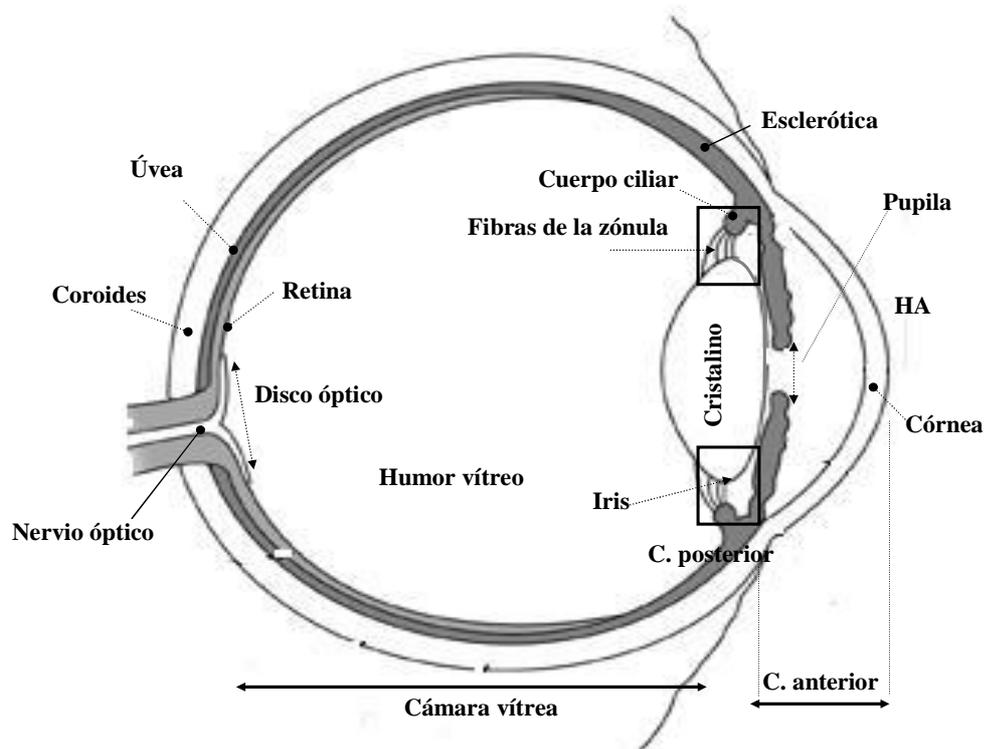
La capa más externa y resistente es la llamada túnica fibrosa, donde se exhiben la *esclerótica* y la *córnea*. La esclerótica es una capa opaca, gruesa, de un color blanquecino, que tiene una función meramente protectora y de soporte del globo ocular. Mantiene la forma del ojo y protege las delicadas estructuras del interior. Como vemos en los dibujos de las **figuras 1 y 2**, en la zona anterior del ojo, la esclerótica se continúa con un tejido circular y traslúcido, similar a ésta en dureza y grosor, que denominamos *córnea*. La *córnea* converge la luz entrante que va a seguir el camino óptico a través de un fluido transparente, el *humor acuoso* (índice de refracción 1.336) de la cámara anterior hasta llegar a la *pupila y el iris*. El iris es un tejido anular y pigmentado, que funciona de diafragma (pupila) controlando la cantidad de luz que finalmente va a llegar a las estructuras fotosensibles y más internas del ojo.

La siguiente capa, por debajo de la externa, es la túnica vascular que está formada por la *úvea* (iris y *cuerpo ciliar*) y la *coroides*, ésta última contiene un elevado riego sanguíneo que aporta nutrientes y O<sub>2</sub> a las estructuras adyacentes avasculares.

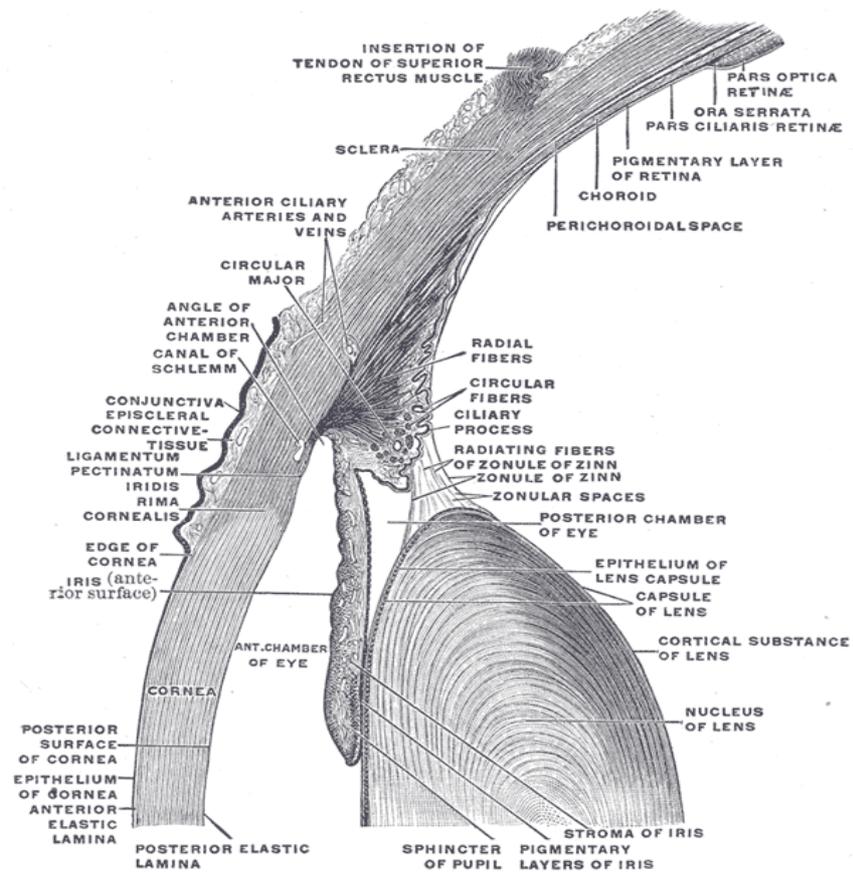
La luz que pasa por la pupila se encuentra con el *cristalino*, una estructura traslúcida que a modo de lente, focaliza los haces de luz en el fondo del ojo, en la retina (plano de imagen). El cristalino está unido a un músculo (músculo ciliar que forma parte del

cuerpo ciliar) por los ligamentos o *fibras de la zónula* y es una lente biconvexa con índice de refracción de 1,437 y un diámetro de aproximadamente 10 mm. La unión al músculo permite variaciones de la curvatura de la lente que se adapta así para que la retina reciba los haces de luz ‘enfocados’ y se obtenga una imagen nítida. El segundo tramo del camino óptico para la luz que ha sido refractada por el cristalino es en la *cámara vítrea*, a través del *humor vítreo*, material gelatinoso, altamente viscoso y transparente que ocupa las 4/5 partes del volumen del globo ocular. Este material protege por amortiguación las estructuras internas y da gran parte de la consistencia al globo ocular.

Finalmente, el recorrido o camino óptico de la luz llega a su fin, en la cámara vítrea, en la *túnica nerviosa interna* o *retina*. Esta capa se describe como una extensión del nervio óptico que es el responsable último de la transmisión de la información visual al cerebro. La retina contiene millones de fibras nerviosas que confluyen en el nervio óptico y es un tejido altamente especializado con células fotorreceptoras capaces de transformar el estímulo lumínico en un impulso eléctrico. La zona de mayor densidad de estas fibras en la retina es la *mácula*. En la retina hay una importante red de vasos sanguíneos, conocidos como *arcadas vasculares retinianas* que se extienden en el tejido desde la base del nervio óptico.



**Figura 1. Sección sagital del globo ocular humano.** Capas y cámaras principales del globo ocular.

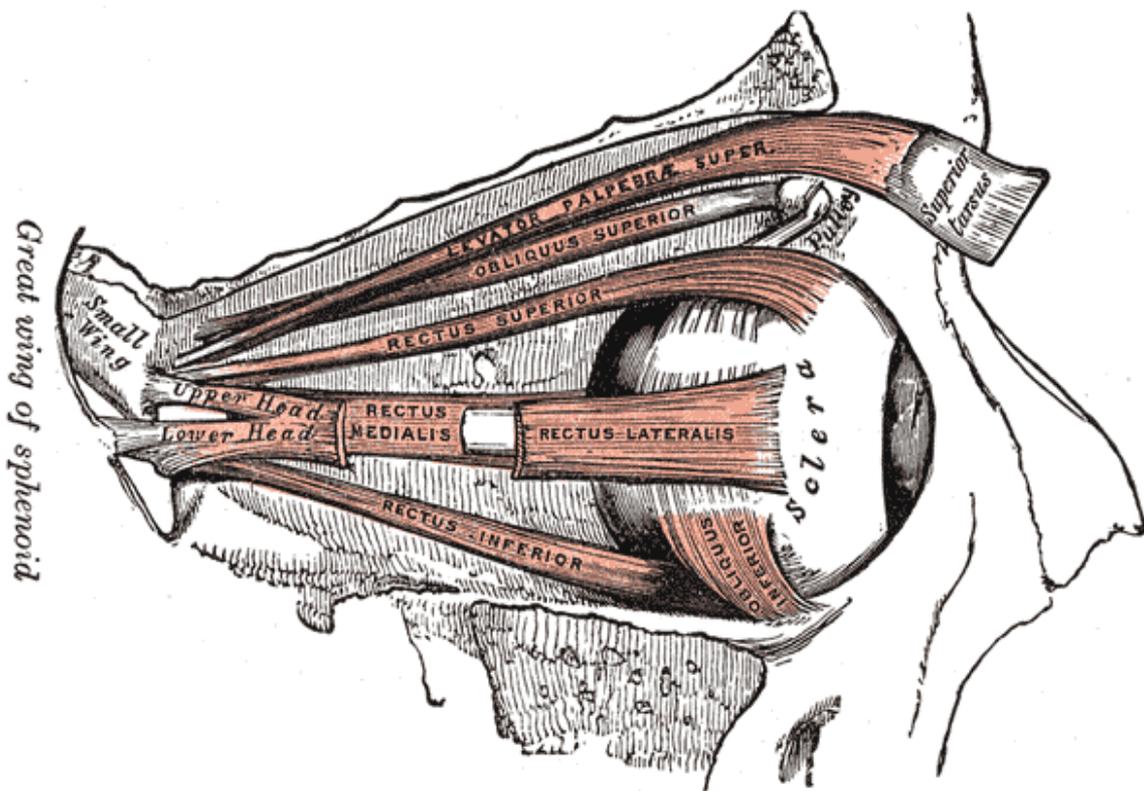


**Figura 2. Sección sagital media superior de la parte posterior y anterior del globo ocular.** Vemos con detalle las estructuras de la cámara anterior, posterior y el ángulo iridocorneal. Dibujo modificado extraído de <http://www.bartleby.com>. Henry Gray (1825–1861). *Anatomy of the Human Body*. 1918

Para la protección de los delicados tejidos oculares existen otras estructuras protectoras como por ejemplo, las pestañas y las cejas, que reducen la cantidad de polvo o suciedad que pudiera afectar la superficie del ojo, también las glándulas lacrimales que segregan lágrima a través del conducto lacrimal y permiten el deslizamiento suave de los párpados. Los párpados son fundamentales en el mantenimiento de la humedad necesaria para la córnea y la esclerótica, además de tener una función limpiadora de la córnea, manteniendo su transparencia y brillo. Los párpados son dos pliegues músculo-membranosos, superior e inferior, con movimiento transversal gracias a un músculo elevador del párpado superior. En sus bordes están implantados los pelos de las pestañas, zona en la cual aparecen también, las glándulas de Meibonio, de tipo sebáceas, que segregan el sebo palpebral.

Externamente, cada globo ocular se aloja en una cavidad ósea protectora, la órbita, que tiene orificios que permiten la entrada de diferentes nervios y vasos sanguíneos. A su vez, esta cavidad está recubierta de una capa resistente, el periostio. Además del globo ocular, y alrededor de éste, hallamos tejido graso, infraorbitario, por entre el cual se colocan los músculos que mueven al globo ocular. Son 6 músculos que se adhieren al globo ocular en diferentes puntos de la esclerótica para permitir el movimiento del ojo, dentro de la órbita (**figura 3**). Se agrupan en tres pares: el par

recto interno- recto externo que permiten el giro alrededor de un eje vertical, el par recto superior-recto inferior que giran entorno a un eje horizontal algo oblicuo y el par oblicuo superior- oblicuo inferior que mueven más directamente la zona de la córnea abajo y afuera (superior) y arriba y afuera (el inferior).



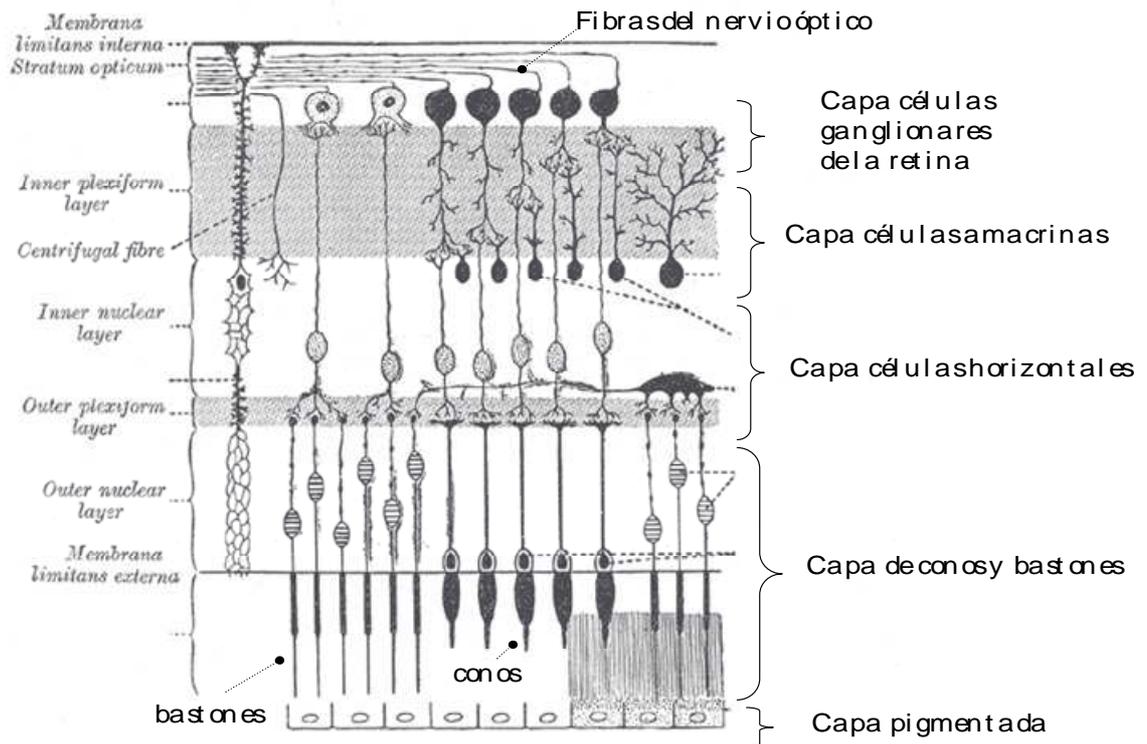
**Figura 3. Músculos externos del globo ocular:** músculos oblicuos superior e inferior, recto superior e inferior, recto lateral (externo), recto medio (interno) y elevador del párpado superior. Sección sagital de la cavidad orbital. Dibujo modificado extraído de <http://www.bartleby.com> Henry Gray. *Anatomy of the Human Body*. 1918

## La retina

La retina es una capa de apenas 1mm de grosor, se une a la coroides y se extiende en una amplia zona central de la pared interna del ojo. Se compone por células fotosensibles de dos tipos: *conos* y *bastones*. La retina está compuesta por 7 capas diferenciadas y funciona como una pantalla sobre la cual se proyectan imágenes de la luz incidente. La capa más externa al ojo, contiene esencialmente a los conos y los bastones (**figura 4**).

Los conos son aptos para la imagen detallada y para la iluminación más intensa, permiten la visión cromática gracias a una pigmentación especial. Los bastones captan, mayormente, el movimiento y son más sensibles en iluminaciones escasas. Los conos pueblan la zona central de la retina: la mácula y se concentran mayoritariamente en la *fóvea*, zona situada cerca del eje visual, desplazada entre 4 y 8°. Es en la fóvea donde quedan enfocadas las imágenes que se ven con mayor nitidez y detalle. La distribución de los bastones están en la periferia de la retina.

Los bastones tienen forma cilíndrica, concretamente dos cilindros unidos por un cuello de fibras o cilio, tienen de largo unas pocas decenas de micras en su longitud y contienen el fotorreceptor, *rodopsina*. Son responsables de la visión en blanco y negro y son sensibles a la luz difusa. Un bastón tiene un botón terminal y se conecta con dendritas a las células bipolares y horizontales, que comentaremos seguidamente. De hecho, conos y bastones se consideran neuronas modificadas. Los conos tienen una terminación en forma cónica compuesta por unas laminillas similares a ciertas estructuras de los bastones. Son responsables de la visión cromática puesto que distinguen diferentes longitudes de onda.



**Figura 4. Organización de las diferentes capas celulares en la retina.** Dibujo modificado extraído de <http://www.bartleby.com>. Henry Gray. *Anatomy of the Human Body*. 1918 (After Cajal)

La retina forma parte del sistema nervioso y por ello distinguimos también como parte de la estructura retinal las neuronas de conducción directa (células bipolares y ganglionares). Las células bipolares ponen en contacto diferentes fotorreceptores, otras en cambio, sólo se unen con una célula, son células de asociación. Las células ganglionares son de tamaño grande y tienen un cuerpo cilíndrico que integra las fibras del nervio óptico y un árbol dendrítico que sinapta con las células bipolares. Además de este conjunto diverso y complejo de redes de asociación, están otro grupo celular protector (aislamiento) y que provee de nutrientes, son la neuroglia y las células de Müller.

#### Química de la visión: la rodopsina y la energía luminosa

La rodopsina es una molécula de membrana, localizada en la zona de las estructuras laminares de los bastones, del segmento externo. Es la molécula

encargada de absorber la energía lumínica de forma que se produce la descomposición del pigmento carotenoide retinal en apenas billonésimas de segundo. Durante el proceso de absorción, esta molécula cambia de una forma doblada a una recta (fotoisomerización) y este cambio de configuración permite la activación de una cadena de reacciones muy rápidas que finalmente llevan a la producción de la metarrodopsina II o 'rodopsina activa'. La rodopsina en activo puede interaccionar con la subunidad alfa de la transducina (proteína G hetero-trimérica) y esta subunidad da paso a un proceso de degradación por hidrólisis de cGMP.

En oscuridad, ciertos canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  se mantienen abiertos y dependen de la estructura cíclica de GMP, a pesar de los intercambiadores que eliminan cationes en condiciones de oscuridad el valor neto del potencial de membrana se despolariza (-30 mV). En cambio, bajo la acción lumínica se hiperpolariza puesto que los canales catiónicos permanecen cerrados, temporalmente. Este proceso inhibe la liberación de neurotransmisores. Los niveles de cGMP se reestablecen en el momento en que la concentración de calcio, eliminado por el intercambiador, es tan baja que no puede inhibir la activación de la proteína de la guanilil ciclasa. Además, la reaparición de cGMP restaura nuevamente la apertura de los canales catiónicos para  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ .

Las células ganglionares son las responsables de transmitir esos cambios finalmente a través del nervio óptico.

### **Nervio óptico: transmisión de la información eléctrica visual al cerebro**

La información visual es uno de los procesos más complejos de la actividad cerebral. En ambas retinas, para cada ojo, existe un nervio, son los nervios ópticos. El nervio óptico, en ambos ojos de igual forma, conduce los impulsos eléctricos generados en la retina, a través de fibras nerviosas (axones de las células ganglionares de la retina) hasta el ganglio geniculado lateral y de allí al *córtex occipital*. La longitud de un nervio óptico es de 35-55 mm, diámetro entre 3 y 7 mm y está envuelto por las tres meninges concéntricas. El nervio tiene una primera porción intraocular, en la cavidad orbitaria. Las fibras nerviosas (axones) de las células ganglionares de la retina se reúnen en la papila óptica, atraviesan la coroides y la esclerótica, y desde ese punto, cabeza del nervio óptico, se forma el nervio. A continuación, está la porción canalicular, cuando entra en el conducto o agujero óptico, al cual se adhiere por la vaina dural, y junto con la arteria y venas oftálmicas, penetra en la cavidad craneal, porción intracraneal, hasta llegar al quiasma.

En la cavidad craneal, los dos nervios llegan a converger, se cruzan formando una X. El *quiasma* es el nombre para esa unión entre ambos nervios, que han variado su estructura para aplanarse de arriba abajo progresivamente en el curso intracraneal (aproximadamente 1 cm). Fibras del nervio del ojo derecho pasan al camino del ojo izquierdo y viceversa. A partir del *quiasma óptico* los haces nerviosos se llaman *tractos ópticos* y conducen la información eléctrica a los puntos correspondientes del cerebro de la zona del *córtex visual*, tras un relevo con células neuronales del tálamo. El *córtex*, corteza visual primaria y las regiones más profundas de la corteza ('cortezas asociativas') es el punto último de procesamiento de la señal eléctrica de la luz.

## 1.a.2 CÁMARAS POSTERIOR Y ANTERIOR

### 1.a.2.1 Cámara posterior

La cámara posterior del ojo como habíamos comentado anteriormente es el espacio del globo ocular delimitado por el iris y el cristalino y los ligamentos que sostienen el cristalino. Este espacio de apenas 0.06 ml es el lugar de formación del humor acuoso, en los procesos ciliares, que forman parte del llamado cuerpo ciliar que está situado en la raíz del iris. El iris y el cuerpo ciliar forman parte de la capa úvea anterior, mientras que la capa a continuación que recubre la pared interna del ojo, la coroides, forma la úvea posterior.

El cuerpo ciliar es una formación muscular y fibrosa, en forma de anillo que sigue el perímetro del iris, por la parte posterior del mismo, en su raíz con la úvea. Se distingue una zona rugosa (*pars plicata*) y una zona lisa (*pars plana*). La *pars plicata*, es una zona de secreción y allí se ordenan los procesos ciliares que filtran el plasma sanguíneo para producir humor acuoso (HA). La *pars plana* se une con la coroides. Además, el cuerpo ciliar contiene el músculo ciliar y la inserción de las fibras de la zónula de los ligamentos suspensorios del cristalino. El músculo ciliar se encarga del proceso de acomodación del cristalino, mediante fibras circulares este músculo por su contracción relaja la zónula, abombando el cristalino (mayor poder de refracción) y mediante la contracción de fibras radiales se tensa la zónula y se aplanan el cristalino (visión lejana). También, el músculo ciliar es de gran importancia en la dinámica de drenaje del HA, su contracción o relajación tiene efectos opuestos sobre el estado de la malla trabecular, en el ángulo iridocorneal de la cámara anterior con resultados directos sobre la facilidad de evacuación del HA. La innervación del músculo está controlada por los nervios ciliares, cortos y largo.

### **Procesos ciliares: formación del humor acuoso (HA)**

Los procesos ciliares del epitelio del cuerpo ciliar son como pequeñas vellosidades, o pliegues, que se extienden en la llamada *pars plicata* o zona rugosa del tejido y se encargan de secretar el humor acuoso.

De forma fisiológica se dan dos procesos simultáneos de producción de HA, el de secreción activa que es mayoritario y el de ultra-filtración. La *secreción activa* es responsable prácticamente del 80% del HA secretado. A la zona llegan una red de capilares sanguíneos ramificados desde la arteria ciliar, las células del epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar pasan iones sodio en contra de un gradiente, gracias al funcionamiento de bombas Na/K, requiere pues este sistema de la energía de la hidrólisis de la adenosina tri-fosfato (ATP). El desequilibrio osmótico resultante del paso de Na<sup>+</sup> desde las células del epitelio ciliar no-pigmentado induce el paso de agua del estroma hacia la cavidad posterior. Tan sólo parte de la solución salina del plasma sanguíneo y algunas de sus proteínas, aunque en baja concentración, pasan a la cavidad posterior (barrera hematoacuosa) y componen el HA inicial. Su composición cambia a medida que va circulando y bañando las diferentes estructuras de la cámara anterior como la córnea o el iris, que segregan nuevo material y redefinen la composición de este humor.

Por *ultra-filtración* se produce un 20% del HA restante, desde los vasos sanguíneos que llegan al cuerpo ciliar y a través de poros en la pared vascular se filtra el plasma sanguíneo. Para que se de este proceso es determinante el valor de la presión en las arterias de los capilares, la presión del plasma y la presión intraocular.

En ocasiones especiales, también se puede secretar HA por *difusión* a través de tejidos como el músculo ciliar, es una tercera vía, muy minoritaria. Son solutos que cruzan tejidos por un menor gradiente de concentración, de forma pasiva y que tienen coeficientes de solubilidad de lípidos altos.

Dos enzimas son principales en la formación activa: la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y la anhidrasa carbónica (CA). Estas enzimas aportan la energía para el paso contragradiente de  $\text{Na}^+$  a la cámara anterior y la CA produce  $\text{HCO}_3^-$ , anión necesario para mantener la electro-neutralidad en el transporte de  $\text{Na}^+$  del lumen de las células no pigmentarias del endotelio ciliar hacia la cámara anterior. En patología glaucomatosa e hipertensiva, en ocasiones, se actúa sobre la producción de humor acuoso con fármacos como el timolol, dorzolamida o brimonidina, que enlentecen el transporte activo (principalmente) y la producción de HA.

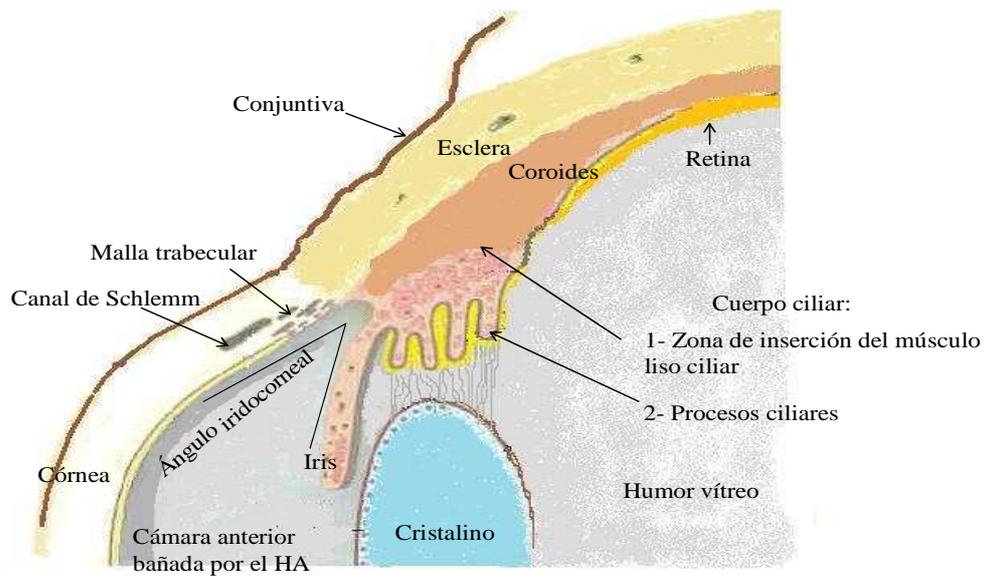
Se sabe que el mecanismo de influjo activo de humor acuoso no es sensible a variaciones de PIO, al menos en el rango de presiones fisiológico, se ha determinado en cambio, que el proceso de ultra-filtración sí es sensible a las variaciones de PIO.

#### 1.a.2.2 Cámara anterior

La cámara anterior es el espacio limitado por la córnea, iris y pupila. Así como en la cámara posterior se forma el HA (procesos ciliares) y en la cámara anterior es filtrado y drenado hacia el sistema sanguíneo, justo en la zona del ángulo iridocorneal.

#### **Ángulo iridocorneal: drenaje del humor acuoso**

El ángulo iridocorneal encontramos la malla trabecular (**figura 5**). La TM está situada en la intersección entre la córnea y el iris, filtra el humor acuoso en el último tramo de su viaje hacia el exterior del globo ocular. A través de este tejido, especializado en filtraje y con una conductividad hidráulica que puede variar de forma activa pasa el 80 % del humor acuoso drenado. Para ello, la malla trabecular modifica sus características químicas y mecánicas, por ejemplo, a través de cambios en la contracción, el volumen celular o modificaciones de la matriz extracelular. Cuando el líquido atraviesa este tejido y superada la barrera endotelial del canal de Schlemm (vena modificada, forma circular adyacente a la TM) pasa a este mismo conducto desde el cual se drena hacia las venas acuosas. Pero el canal de Schlemm en humanos no existe en ojos bovinos y de otras especies mamíferas, en su lugar aparecen unas estructuras denominadas *plexos acuosos* (conjunto de conductos o canales muy pequeños).



**Figura 5.** El humor acuoso producido en los procesos ciliares pasan a través del espacio de la cámara posterior y circula entre el iris y el cristalino, hasta llegar a la cámara anterior dónde es drenado en el ángulo iridocorneal, a través de la malla trabecular principalmente. Una vía alternativa es a través del músculo ciliar hasta la esclerótica (vía uveoscleral o minoritaria). Modificado de <http://www.eyellearn.med.utoronto.ca>

Inicialmente se pensaba que TM era un tejido de resistencia pasiva y con actividad, básicamente, de tipo fagocítica. Pero en los últimos años, los estudios han revelado que las células trabeculares, la matriz extracelular y las interacciones entre ambas, como ya he mencionado, tienen un papel activo en la fisiología de la función de resistencia y filtraje del humor acuoso. De esta forma, actualmente, muchos investigadores focalizan sus esfuerzos en el estudio de TM y de los mecanismos patológicos aparecidos en el tejido de ojos glaucomatosos. De esta manera, TM es actualmente un objetivo farmacológico principal en el estudio de las terapias antiglaucoma.

La bibliografía básica consultada para la información en este apartado: *1a. Estructura del ojo*, son los libros publicados por P. L. Kaufman y Albert Alm. 2004. 'Adler Fisiología del ojo: Aplicación clínica' 10ed. Elsevier y J. V. Forrester, A. D. Dick, P.G. McMenamin and W.R. Lee. 2002. 'The eye: Basic sciences in practice' 2ed. Saunders.

### **1.b FISIOLÓGÍA Y FISIOPATOLOGÍA DEL HUMOR ACUOSO (GLAUCOMA)**

El humor acuoso es un líquido transparente que llena las cámaras anterior y posterior. Su composición es similar a la del plasma sanguíneo pero con niveles más altos de sodio, cloro y bajos niveles de potasio, es en definitiva un producto filtrado del plasma sanguíneo. El contenido de proteínas es menor en el humor acuoso que en el plasma sanguíneo (200 veces inferior) gracias a la barrera hematoacuosa, no obstante, el contenido proteico aumenta durante los procesos inflamatorios (por

ejemplo, en uveítis). También, se encuentra una concentración muy elevada de ascorbato, que es un protector de las estructuras de la cámara anterior, expuestas directamente a la luz, y en especial a los rayos UV.

El HA nutre las estructuras avasculares de la cámara anterior y el iris. Además, su presencia y características permiten que la córnea permanezca transparente y que el iris mantenga su forma. Es un líquido dinámico que fluye a 2 microlitros por minuto y está en constante renovación (el ciclo que reemplaza todo el volumen de humor tarda unos 100 min) por lo que también cumple la función de limpieza de desechos de los tejidos circundantes. El balance entre el volumen de HA secretado en la cámara posterior y la cantidad drenada en el ángulo iridocorneal determina la fijación de un parámetro visual fundamental: la presión intraocular (PIO). La presión intraocular es una constante fisiológica del ojo y oscila en un rango de 10 a 20 mmHg, el promedio es de 15 mmHg.

Incrementos sostenidos en la presión intraocular por encima de 20 mmHg pueden significar daños irreparables en la retina. Concretamente, las células ganglionares, cuyos axones forman el nervio óptico, debido al aumento de estas presiones sufren los efectos de la deformación mecánica y mueren. Esto significa la reducción irreversible y parcial o total, en ocasiones, de la visión. Esta patología es conocida como Glaucoma.

#### 1.b.1 CICLO DINÁMICO DEL FLUJO DE HUMOR ACUOSO

El ciclo del humor acuoso se inicia en el cuerpo ciliar, en los procesos del epitelio ciliar (cámara posterior) donde se produce, para luego circular hacia la cámara anterior bañando primero la superficie posterior del iris y la anterior del cristalino hasta la pupila, desde donde emerge al espacio anterior, el cual ocupa por completo hasta la córnea, el líquido fluye hacia el ángulo iridocorneal y es drenado del ojo, pasando a través de la malla trabecular (vía principal de evacuación del fluido) para llegar al conducto de Schlemm (**Fig. 6 y 7**). El motor de la circulación del humor es un gradiente de temperaturas donde los valores inferiores de temperatura están en la zona próxima a la córnea.

La vía uveoscleral/no convencional, es minoritaria (20% de la evacuación) y funciona en paralelo con la ruta trabecular. El HA atraviesa el tejido del músculo ciliar por los espacios supraciliares y supracoroidales, y drena finalmente por la esclerótica. De hecho, existe también, otra vía, aún más minoritaria que conduce el HA hacia la cámara vítrea, es la vía de drenaje post-iridiano.

La estabilidad de PIO se da cuando el flujo de producción del HA y el flujo de drenaje total son iguales. Podemos usar la ecuación de Goldman más un término añadido para dar cuenta del flujo uveoscleral. De acuerdo con la ley de Ohm, el flujo a través de un sistema determinado  $\Phi$  es directamente proporcional a la diferencia de presión entre la entrada y la salida del sistema e inverso a la resistencia R ( $R=1/C$ , C: facilidad) a su paso:

$$\Phi = (P_{salida} - P_{entrada}) / R.$$

La diferencia de presiones es la fuerza electromotriz para el flujo.

Ecuación de Goldmann:  $\mathbf{PIO} = (\Phi_{in} - \Phi_{uv}) / C + P_{ep}$

**PIO:** presión intraocular

$\Phi_{in}$ : Flujo de humor acuoso producido total, *inflow*

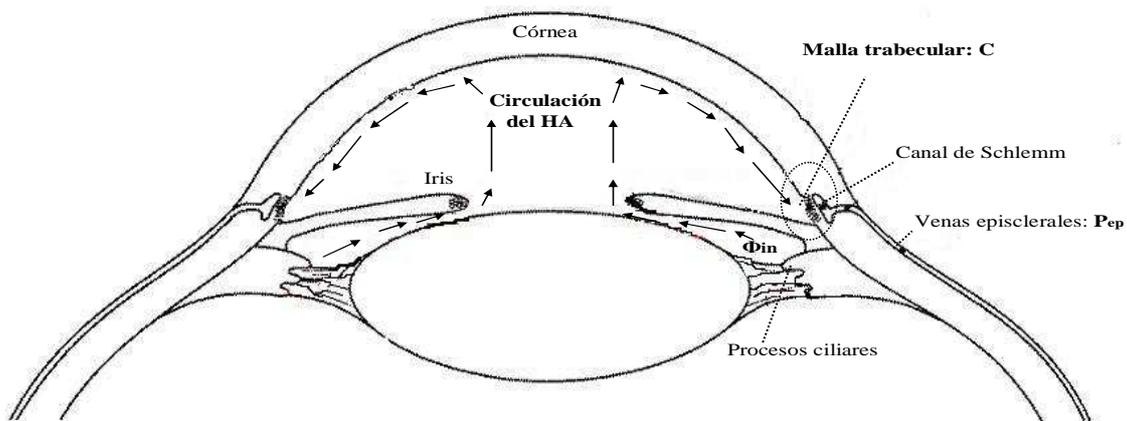
$\Phi_{uv}$ : Flujo drenado por la vía uveoscleral, *outflow*

**C:** Ritmo de drenaje o facilidad de evacuación del flujo (*outflow*) a través de la malla trabecular y el canal de Schlemm.

**Pep:** Presión de las venas episclerales, presión en contra de la salida del humor acuoso desde la cámara anterior.

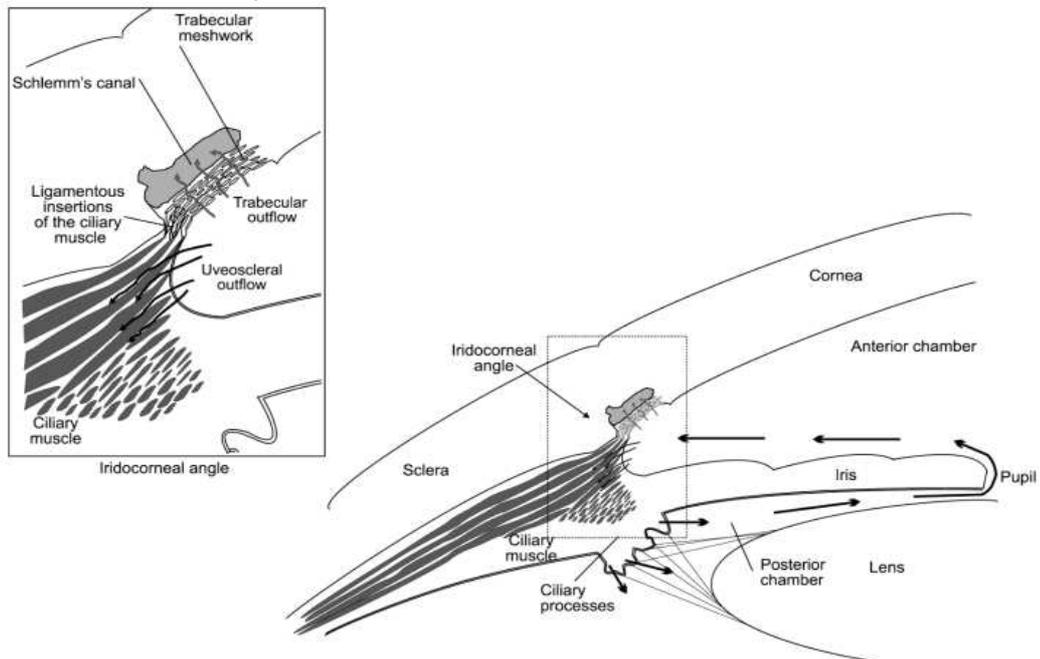
Este modelo muy simplificado ha sido útil en aplicaciones clínicas para el tratamiento y estudio del glaucoma, durante años. Aunque en los últimos años, estudiando el efecto de distintos fármacos hipotensivos, se han podido revisar los parámetros de la ecuación de Goldman con más detalle, no obstante, esta ecuación sigue siendo una aproximación útil.

Existe una relación directa entre valores elevados de la PIO, por encima del rango fisiológico, y el daño celular en la retina, observados en ojos glaucomatosos. Sin duda, la PIO es el principal factor de riesgo. Hasta el momento el objetivo más común en casos de glaucoma es lograr terapias que disminuyan la PIO de forma que el daño al nervio cese lo más rápido posible y de forma estable. Teniendo en cuenta la ecuación de Goldman, para reducir la PIO se puede pretender reducir la presión episcleral, reducir la producción de humor acuoso, aumentar la capacidad de drenaje o conductividad hidráulica del HA a través de la red trabecular, o también potenciar la vía uveoscleral de drenaje. Existen fármacos dirigidos a todos estos puntos, excepto para provocar cambios en la presión de las venas episclerales.

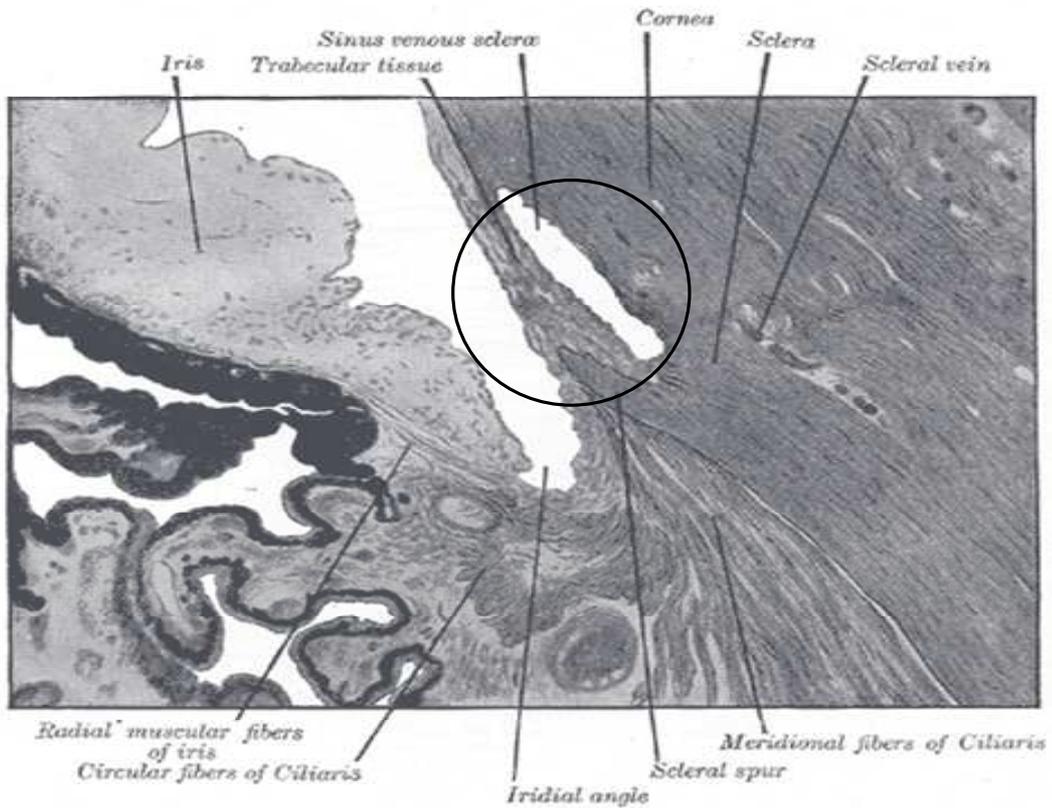


**Figura 6.** Circulación del HA desde los procesos ciliares (flujo producido,  $\Phi_{in}$ ) hasta la zona del ángulo iridocorneal, donde es drenado a través de la malla trabecular (permeabilidad, C) hasta el canal

de Schlemm, para ser evacuado a la circulación venosa (presión episcleral,  $P_{ep}$ ). El HA ocupa el espacio entre la córnea, iris y cristalino.



**Figura 7a.** Esquema de la circulación del HA desde los procesos ciliares hasta el ángulo iridocorneal y las vías de drenaje trabecular y uveoscleral. Extraído de (Llobet et al., 2003).



**Figura 7b.** Dibujo de la anatomía del ángulo iridocorneal (*iridial angle*). Observamos que la malla trabecular (*trabecular tissue*) y el canal de Schlemm (*sinus venous sclera*) son estructuras contiguas y

con el iris definen el ángulo de drenaje del HA. Modificado de <http://www.bartleby.com>. Henry Gray. *Anatomy of the Human Body*. 1918

## **Técnicas de medición del flujo de HA**

Medir cuantitativamente la circulación del humor acuoso es posible usando distintas técnicas como son: la tonometría, tonografía o la fluorofotometría. Conocer parámetros de la circulación de HA puede ser importante para descubrir glaucomas dependientes de la PIO. Un diagnóstico a tiempo es básico en esta patología. Por otra parte, es información útil de seguimiento de los efectos de los fármacos que se estén aplicando al paciente para el control de la PIO.

La tonometría es una técnica rutinaria que mide la presión. Se basa en la utilización de un chorro de aire para aplanar la córnea. Existe la tonometría de contacto, más precisa; con un dispositivo que aplana la córnea y se obtiene información sobre su curvatura, este valor está directamente relacionado con la presión.

Para medir el flujo de humor acuoso se usa la fluoresceína aplicada tópicamente sobre la córnea. Cuando esta sustancia permeabiliza aparece en la cámara anterior y desaparece principalmente siguiendo la misma vía de drenaje del HA. Se van tomando medidas de la concentración de fluoresceína en la córnea (estroma) y en la cámara anterior (fluorofotómetro) y se calcula la cantidad de humor acuoso producido ( $2,75 \pm 0,65 \mu\text{l}/\text{min}$  durante el día, por la noche aumenta) tomando medidas a diferentes tiempos por varias horas.

Pero más determinante es la medición del flujo de salida mediante la tonografía. Se le aplica al ojo un tonómetro pesado (por ejemplo, neumotonógrafo) durante un periodo de cuatro minutos. Al inicio, la PIO aumenta y a medida que transcurre el tiempo, ésta disminuye. La facilidad de salida del flujo (valor-parámetro C de la ecuación de Goldman) puede determinarse a partir de las curvas de disminución de PIO en tablas normalizadas. Útil sobretodo en estudios de grupo porque los cambios de flujo de salida tras los efectos de las terapias, a veces, en un mismo individuo, no se ven claramente.

En cambio los métodos de medida para la presión episcleral no han tenido éxito, los fármacos actuales no usan las venas episclerales como diana farmacológica.

### **1.b.2 GLAUCOMA: NEUROPATOLOGÍA**

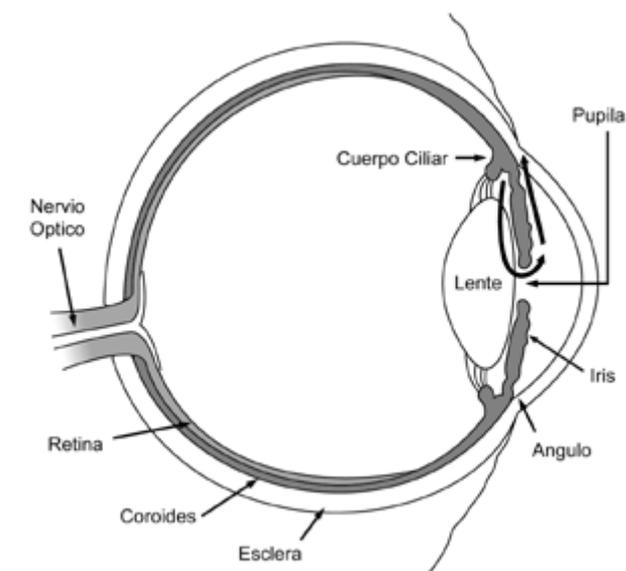
El glaucoma es una enfermedad degenerativa del nervio óptico que lleva a la pérdida de la función visual de forma irreversible. El daño neuronal se produce al nivel de la lámina cribosa de la esclerótica, a través de la cual salen las fibras del nervio óptico.

Esta enfermedad es la segunda causa principal de ceguera en el mundo. Los tratamientos típicos suelen ser preventivos tras la aparición de factores de riesgo, como el principal de ellos, el aumento de la PIO (por encima de 21 mmHg).

Se sabe ahora, que existen múltiples etiologías que provocan un incremento de la PIO, por lo que el glaucoma sería un síntoma y no la enfermedad originaria.

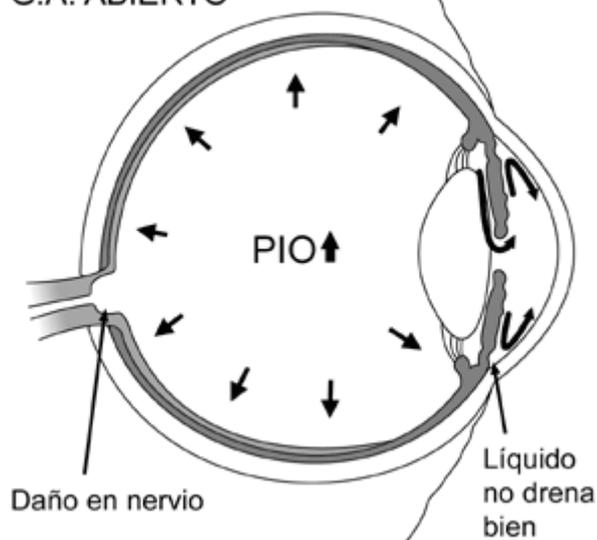
De todos modos, aunque son casos minoritarios, existen glaucomas a presión intraocular normal, donde la degeneración del nervio es muy parecida a los glaucomas con PIO alta.

El aumento de la presión está ligado al desequilibrio del balance entre los valores de la producción y la evacuación del humor acuoso. El HA se acumula en la cavidad anterior y se producen tensiones extras, distribuidas en todo el globo ocular y que mantenidas en el tiempo pueden producir daños irreversibles en la retina. Múltiples cambios químicos y mecánicos se producen debido al aumento de la PIO en los alrededores del nervio, sobre la papila óptica. La presión mecánica sobre los axones y las obstrucciones en la microcirculación y en el transporte axoplásmico, además de ciertos episodios de isquemia, producen la atrofia y muerte del nervio progresivamente. En esa zona de la retina (**figura 8**), aparece la deformación por excavación del nervio óptico, un signo inconfundible de daño al nervio óptico, que aparece ya en los primeros estadios de la enfermedad.



a

G.A. ABIERTO



b

**Figura 8.** La excavación y atrofia del nervio óptico se producen de forma primaria ya en las primeras fases del glaucoma. Vemos en (a) el recorrido típico del HA desde el cuerpo ciliar hasta su evacuación a través de la red trabecular (mayoritariamente), (b) y los cambios en el tejido nervioso óptico en la retina (excavación) por el efecto de un incremento en la PIO debido a la acumulación de HA en la cámara anterior por un mal drenaje del HA en la red trabecular. Dibujos extraídos de <http://www.valledelili.org> 'Glaucoma'

## **Tipos de glaucoma (origen)**

### 1. Clasificación por el ángulo de drenaje

#### Glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA):

En este tipo de glaucoma (mayoritario) se da un aumento persistente de la PIO. El aumento en la PIO es por encima de 21 mmHg, entre los 20 y 30 mmHg, típicamente. El aumento es debido a la variación de la resistencia al paso del HA por su principal vía de drenaje, la vía convencional, de la red trabecular (TM).

A veces, el aumento no es constante, es decir aparecen episodios de altos valores de PIO alternándose con fases menos hipertensas. Las causas no son conocidas. Una vez más, la naturaleza multifactorial de esta enfermedad se manifiesta y la lista de preguntas sobre sus causas originarias es larga, los efectos y las causas parecen confundirse en un complejo sistema de 'feed-back' de disfunciones. Es decir, en medio de todos los desajustes, sucede que la homeostasis de la red trabecular puede verse gravemente alterada con lo cual empeora la situación.

La malla trabecular como veremos con más detalle en posteriores apartados, no es un mero filtro pasivo sino que actúa directa y activamente sobre la resistencia al paso del HA, se encarga de regular estados de más o menos resistencia respondiendo a cambios químicos y mecánicos (hipoxia, 'stretch', etc.)

Los investigadores se hacen hoy, muchas preguntas, puesto que el GPAA se presenta de forma multifactorial y resulta muy difícil concretar la o las causas primeras de la degeneración del tejido. Este estudio es crítico porque es difícil acceder al tejido en condiciones *in vivo*. La histología nos aporta, recientemente, gracias a las nuevas técnicas de microscopía, datos que arrojan algo de luz sobre la verdadera arquitectura de la malla trabecular. Hasta ahora, los estudios sobre la fisiología de las células trabeculares han sido *in vitro*, en cultivo, pero la realidad tridimensional de la red trabecular es fundamental para entender cómo funciona y cómo puede modificar su resistencia al flujo del HA. Y lo mismo ocurre con las interacciones célula-matriz extracelular, las cuales no pueden recrearse en cultivo. Además no existen marcadores específicos para las células trabeculares, por lo que no se pueden diseñar fármacos que actúen exclusivamente en la región de interés.

Se precisa de experimentos *in vivo* y para ello se busca definir modelos animales que mimeticen lo mejor posible lo que en realidad, es una enfermedad fundamentalmente humana. Se ha inducido glaucoma en monos y ciertas razas de perro. Y aunque se ha detectado glaucoma espontáneo en perros, ratones y pájaros, son casos raros y no de GPAA sino de GPAC, es decir, glaucoma primario de ángulo cerrado (crónico) (Gelatt et al., 1998). Una alternativa aproximada al estudio *in vivo* es la mutagénesis química

en ratones. Se trabaja sobre estrategias 'knockout' y transgénicas que permitan estudiar los efectos de ciertos genes de la matriz extracelular en la función del tejido (John et al., 1998).

Otros modelos de estudio de la red trabecular y su función son los de 'ojo entero' y 'segmento anterior' humano o bovino. El tejido, con su especial arquitectura, permanece intacto durante los experimentos. Pero obtener ojos humanos es difícil y muy caro. Pretender el uso de ojos de otras especies mamíferas es aceptable para elaborar modelos básicos de ensayo, pero no es una alternativa definitiva puesto que otras especies no poseen exactamente la anatomía humana.

Otro método usual son los cultivos de células en monocapa que permiten conocer vías de señalización, receptores y el comportamiento molecular de estas células, de forma que podemos comparar con otros tipos celulares. Puede ser muy útil conocer a qué tipo celular se parecen las trabeculares. Pero en cultivo, las células no reproducen fielmente su respuesta como lo harían en la configuración 3-D tan característica del tejido en cuestión. Su entorno no es el de la matriz extracelular sino que se las estimula con factores de crecimiento que tampoco mimetizan la composición del humor acuoso, lo cual puede modificar en cierta medida su fisiología. Otra diferencia más a tener en cuenta es que en cultivo las trabeculares no están bajo un flujo unidireccional (circulación de HA), como acostumbran en su hábitat auténtico. En definitiva, la forma de estudio de TM ha sido, hasta el momento, un enfoque aproximado y esto mismo mismo ocurre con el conocimiento que podemos tener de una de sus patologías más graves: el glaucoma de ángulo abierto.

El GPAA se caracteriza, en parte, por la aparición de formaciones en placa debido al aumento de fibras de colágeno en la matriz y a la disminución en la segregación de metaloproteinasas por parte de las células trabeculares. Cuando esto ocurre, disminuye la capacidad de drenaje de TM. También se observa muerte celular en el tejido enfermo y hay signos de migración celular, cuestiones ambas sin resolver. Estos cambios señalan que la función reguladora de estas células como su capacidad fagocítica son cruciales para el buen funcionamiento del sistema de drenaje. En parte, el material acumulados en placas es de origen celular, al parecer las células se desenganchan de la membrana basal (mueren o migran?) y se fusionan formando esos aglomerados anormales. También, se observa un incremento de la pigmentación de las células. En conjunto, hay cambios ultraestructurales del tejido muy decisivos, similares a los que sufre un tejido envejecido de forma fisiológica (Gabelt and Kaufman, 2005), por estos efectos decimos que el GPAA es parecido a una forma de envejecimiento prematuro (Potau et al., 2000a; Potau et al., 2000b). El GPAA parece avanzar la degradación del tejido con características muy similares a las de un ojo ya anciano. El tejido TM normal pierde células cuando envejece, la tasa de proliferación de estas células es baja, se pasa de más de 1 millón de células a la edad de 20 años y nos quedan tan sólo unas 500.000 a la edad de 80. Por ejemplo, se ha determinado que se da una disminución muy significativa de la expresión de proteínas, un dato relevante es que mientras en ojos normales se hallan 177 proteínas, tan sólo 52 de éstas aparecen en células de un tejido enfermo (Bhattacharya et al., 2005).

Aparecen modificaciones de la composición de la matriz extracelular en forma de aumentos en las fibras de colágeno y acumulación de material extracelular, que en parte podría explicarse debido a la respuesta celular al incremento del factor TGF-beta2 en el HA de ojos glaucomatosos, que estimula la secreción de matriz por parte

de la célula. Además, TGF-beta1 y 2 inducen transglutaminasa de tejido que desencadena una acusada polimerización de fibronectina y otras alteraciones de la matriz capaces de cambiar la facilidad de evacuación del tejido (Gottanka et al., 2004). Hay otras sustancias como la endotelina, el factor VEGF (induce glaucoma neovascular), el inhibidor PAI (inhibe la síntesis de la forma activa de MMPs) o el cd44 soluble (vías pro-apoptóticas, citotoxicidad) están también incrementadas en casos típicos de GPAA, aparecen en el humor acuoso en cantidades no fisiológicas y pueden afectar el normal funcionamiento de la red (Fautsch and Johnson, 2006; Tezel et al., 1997; Tripathi, 1971). En cualquier caso son estudios en progreso, aún no se sabe el origen de los cambios en el contenido proteico del HA ni tampoco sus efectos con exactitud.

La lista de cambios o efectos patológicos reportada en el GPAA es amplia, en algunos casos se detectó el aumento de la dismutasa superoxidante (SOD) y una disminución la capacidad antioxidante (TRAP), por lo que se podría estar produciendo un aumento del estrés oxidativo (daño oxidativo incluso en el ADN de la célula trabecular) (Sacca et al., 2005). Por ejemplo, ELAM-1 (molécula uno de adhesión leucocitaria endotelial) es ya un marcador de glaucoma en células trabeculares y se produce tras la descarga de NK-kB por parte de la célula en respuesta al estrés oxidativo. Este es un rasgo, pues, típico en esta patología. ¿Qué causa el desequilibrio en el sistema antioxidativo en las condiciones patológicas del glaucoma? ¿Es causa o consecuencia? El estrés oxidativo está asociado a muchas enfermedades oculares (Wang et al., 2001).

¿Por qué se forman placas de material en exceso de *detritus*, en los intersticios del tejido hacia las capas más cercanas al canal de Schlemm? ¿Es esta acumulación de material resultado directo de una deficiente regulación metabólica del tejido por parte de las células trabeculares? ¿Esta patología es en definitiva, resultado del efecto 'tapón' de estas acumulaciones?

La realidad parece ser más compleja y el glaucoma primario de ángulo abierto se resiste a ser definido según una causa, su naturaleza es multifactorial. Es decir, no se ha detectado una causa original, en todo caso un conjunto de ellas, que a modo de *feedback*, agravan aún más si cabe la disfunción primera.

Se han descrito también, alteraciones de las propiedades mecánicas de la célula o de la arquitectura del citoesqueleto que determinan cambios en la dureza o falta de elasticidad celular que podrían afectar la permeabilidad o la habilidad drenadora del tejido. El estado contráctil del tejido y en general, sus propiedades físicas son ahora objeto de estudio para nuevas y prometedoras dianas farmacológicas del GPAA (Ethier et al., 2004).

La comunidad científica concreta los objetivos principales actuales para el avance de la investigación en GPAA y algunas de las cuestiones pendientes son (Fautsch and Johnson, 2006):

- Marcadores específicos para células trabeculares y del canal de Schlemm
- Estudiar cómo las células responden a los cambios del entorno (PIO, 'stress' por fricción, 'stretch')
- Cómo afecta el estrés oxidativo en las células trabeculares y del canal de Schlemm.

- Cómo varían las células su capacidad de formación/degradación de la matriz extracelular por cambios en el entorno.
- Estudio de la dinámica celular que lleva a la formación de ‘vacuolas gigantes’ (formaciones permiten el transporte ‘transcelular’ de HA) en las células del endotelio del canal de Schlemm. ¿Cómo actúa el citoesqueleto y la membrana celular en estos sucesos? ¿Son fisiológicos o son propios de la patología glaucomatosa?
- Definir el papel de la matriz extracelular en la función de evacuación

Son sólo algunos puntos de interés de una lista larga de cuestiones abiertas que podrían ayudarnos a comprender la patología y a curarla quizás.

### Glaucoma de ángulo cerrado (GPAC):

El aumento de la PIO es debido a la obstrucción física del ángulo iridocorneal que se vuelve más estrecho por la posición de iris periférico. Este tipo de alteraciones puede deberse a diversos factores, anatómicos de nacimiento, de herencia, debido a golpes o accidentes que modifiquen las estructuras anteriores del ojo, etc. Por lo tanto, el GPAC no está asociado en el origen a una patología de la malla trabecular aunque ésta pueda resultar dañada por la presión y el ‘stretch’ ejercido por la acumulación de HA en la cavidad anterior.

### 2. Clasificación de glaucoma derivado de otras enfermedades oculares: glaucomas secundarios

Éstos pueden ser de ángulo abierto o cerrado. Incluso en ocasiones se definirían como mixtos. Se deben a consecuencias derivadas de disfunciones ajenas al funcionamiento directo del equilibrio del humor acuoso. Por ejemplo, el *glaucoma de pseudoexfoliación* es una forma de glaucoma que puede desarrollarse en los pacientes afectados con el síndrome de pseudoexfoliación (síndrome de PEX). El término pseudoexfoliación ha sido introducido porque, clínicamente, parece como si el cristalino se estuviera pelando o descamando.

El síndrome de dispersión pigmentaria, induce al *Glaucoma con síndrome de dispersión pigmentaria*, se identifica por los depósitos de melanina sobre aquellas superficies del ojo que están en contacto constante con el humor acuoso. El hallazgo más característico es un depósito en la superficie posterior de la córnea, llamado el huso de Krukenberg.

Otras causas son cambios en el cristalino (luxación del cristalino), tras aplicar cirugía para cataratas o derivado de la diabetes, infecciones que interfieran en definitiva en el drenaje de fluido desde la cámara anterior. Por ejemplo, cuando la causa es la inflamación, suele recurrirse a los corticosteroides para reducirla y éstos pueden aumentar la PIO peligrosamente.

Hay numerosas enfermedades que llevan al glaucoma secundario de ángulo cerrado, desde una dislocación del cristalino, por un golpe o accidente o en distintos síndromes. Cuando el iris bloquea la red trabecular esto suele tener consecuencias

irreversibles a pesar de que el iris vuelva a su posición normal posteriormente y se abra el ángulo de drenaje, el daño es definitivo para el trabéculo.

### 3. Glaucoma congénito primario (GCP)

El glaucoma congénito primario y el asociado a otras alteraciones congénitas es una forma rara de glaucoma, muy minoritario. Los genes responsables del desarrollo defectuoso del ángulo iridocorneal así como del tejido trabecular, las mutaciones que inducen a este tipo de glaucoma están siendo investigados. Se describe como una maduración insuficiente del ángulo y de la red trabecular.

En 2003, en la revista *Science*, se publicó un artículo de Simon W.M. John y su equipo, sobre los resultados de estudios hechos en ratones, en los que la ausencia del gen que codifica para la proteína Cyp1b1 determinaba un glaucoma con las características del GCP humano, malformaciones en la anatomía del ángulo de drenaje.

### **Glaucoma de presión intraocular normal**

No hay diferencias entre el daño al nervio observado en el GPAA y el glaucoma a presión normal. La PIO no excede el rango de valores fisiológicos, pero el nervio está dañado como si la presión fuera igualmente excesiva. Se usan las mismas terapias que para el GPAA, es decir, se pretende disminuir la PIO, ya que se ha visto que es también una medida beneficiosa.

#### 1.b.3 TERAPIAS PARA EL GLAUCOMA: FÁRMACOS Y CIRUGÍA

### **Sintomatología y Diagnóstico**

El paciente no nota nada inusual o especialmente alarmante durante mucho tiempo y mientras, la enfermedad avanza dañando el nervio de forma irreversible. La diagnosis temprana es fundamental en esta patología.

En los casos de glaucoma de ángulo cerrado agudo, la elevación de la presión en el ojo es rápida y muy elevada, es un episodio repentino, con dolor de cabeza, náusea, defectos en la visión inmediatos, ojos rojos, entre otros.

Los glaucomas crónicos suelen presentar signos como la congestión episcleral, neovascularización de la córnea por edema, estrías en la córnea, atrofia de iris, luxación del cristalino, cataratas.

Y en todos los casos, el fondo de ojo muestra atrofia del nervio óptico (isquemia y excavación de la cabeza del nervio).

Revisiones regulares y atención a síntomas como los descritos, son algunos de los consejos para que se acuda al médico lo antes posible.

No se ha determinado un protocolo único, unívoco de diagnóstico del glaucoma. El primer factor a tener en cuenta es el valor de PIO (tonometría), pero también la

exploración del ángulo iridocorneal (gonioscopia, una lente especial que permite eliminar la refracción corneal y así se pueda ver el ángulo de drenaje del ojo).

También, es importante observar el fondo de ojo con un oftalmoscopio, práctica muy útil para el diagnóstico, fácil de realizar y económica. Así se puede observar la papila óptica (parte visible del nervio óptico) que debe de aparecer redonda u ovalada en sentido vertical, color rojo-anaranjado, con bordes bien definidos, con una zona pálida en un lado de la papila que no debe sobrepasar en tamaño la mitad del diámetro papilar. Con esta exploración también podemos observar el entramado de vasos retinianos, que puede darnos además información respecto a otras enfermedades (diabetes, hipertensión arterial). Esta información, acompañada de los síntomas que el paciente explica son el primer paso para determinar el glaucoma y su tipología.

### **Tratamiento médico: farmacología clásica**

En general, el primer objetivo una vez diagnosticado el glaucoma es disminuir la PIO para que cese el daño al nervio óptico. El tratamiento dependerá del tipo de glaucoma y de la capacidad visual del paciente, lo cual da cuenta del nivel de avance de la enfermedad. Así se pueden combinar tratamientos médicos con fármacos de uso tópico generalmente, o bien, la aplicación de cirugía en casos de gravedad. Existen diferentes operaciones quirúrgicas que tienen el efecto reductor de la PIO, una de ellas, es la trabeculotomía, en la que se corta un trozo del tejido trabecular. Aunque la cirugía se reserve para casos de mayor gravedad, en estadios tempranos de la enfermedad también puede ser útil y definitivo el uso de la cirugía láser (Realini, 2008; Scuderi and Pasquale, 2008). Para los casos de ceguera irreversible en los que hay dolor ocular, se puede intervenir quirúrgicamente para la enucleación (extracción del ojo) y la introducción de prótesis intraoculares.

Típicamente, se usan hoy 6 clases de terapias farmacológicas y de uso tópico para el glaucoma. Todas ellas con el propósito de disminuir la PIO (Lee and Higginbotham, 2005):

#### Agonistas colinérgicos (**pilocarpina**)

De efecto muscarínico, contraen el músculo ciliar, lo cual deforma la red trabecular relajando este tejido y permitiendo que el HA pase a través con menor resistencia (pilocarpina, aceclidina). Este tipo de fármacos se usan principalmente para glaucoma de ángulo cerrado, el efecto sobre el músculo ciliar permite que el ángulo iridocorneal aumente contrarestando la obstrucción anatómica inicial. Ciertos efectos secundarios han hecho que esta terapia no se use mayoritariamente, pero es recomendable pilocarpina en combinación con otros fármacos cuando el glaucoma tiene características mixtas (ángulo cerrado-abierto).

#### Agonistas Beta<sub>2</sub>-adrenérgicos (**epinefrina, dipivefrina**)

Actúan específicamente sobre células endoteliales de la red trabecular (pared interna del canal de Schlemm) vía el mecanismo mediado por el Beta-adrenoreceptor. Con exactitud no se conoce el efecto determinante que permite la menor resistencia al paso del HA, pero se conoce que afectan al citoesqueleto de estas células cambiando su forma y propiedades adhesivas sobre la matriz extracelular (epinefrina y dipivefrina). Para el caso de glaucomas en los primeros estadios, la disminución de la PIO no es tan acusada como con fármacos colinérgicos. No es recomendable para glaucomas de ángulo cerrado, por sus efectos de midriasis. Pero también es importante moderar su uso puesto que tiene efectos nocivos para pacientes con enfermedades cardiovasculares, hipertiroidismo y diabetes.

Otras como la apraclonidina y brimonidina, inhiben la secreción de humor acuoso.

### Antagonistas Beta<sub>2</sub>-adrenérgicos (***timolol, levobunolol, betaxolol***)

Interfieren sobre la formación de humor acuoso entre un 24-48%. Es una terapia muy potente, que ha mostrado buenos resultados, acción persistente y buena absorción, aunque también puede generar efectos secundarios no deseados como visión borrosa, sequedad de ojos, blefaritis, a veces, queratitis, conjuntivitis, uveítis. Y también descenso de la frecuencia cardiaca, broncoespasmo, hipoglucemia, etc.

### Inhibidores de la anhidrasa carbónica (***acetazolamida, methazolamida, aminozolamida, dorzolamida***)

Acetazolamida y diclofenamida (uso oral y/o tópico), dorzolamida y brinzolamida (uso tópico) inhiben la secreción, tras el bloqueo de la secreción activa de iones sodio y bicarbonato en el cuerpo ciliar. El uso tópico de algunos de estos fármacos permite evitar casi en su totalidad, los indeseados efectos sistémicos del tratamiento. Pueden darse efectos secundarios adversos, como náuseas, parestesias, astenia, molestias gastrointestinales, formación de cálculos renales, etc.

Este tipo de sustancias, suministradas de forma sistemática, pueden reducir la secreción de HA un 50% y han sido usadas durante muchos años (Becker, 1954; FRIEDENWALD, 1955).

### Análogos de prostaglandinas F<sub>2</sub> alfa (***latanoprost***)

Estimulan la producción de metaloproteinasas de la matriz en el cuerpo ciliar, de esta forma aumentan los espacios entre los tendones del músculo ciliar aptos para que se filtre el HA (evacuación uveoscleral). Es un tratamiento indicado para glaucoma de ángulo abierto principalmente, y tras descartar otros fármacos. Sus efectos nocivos pueden ser edemas maculares quísticos, asociados en general a factores de riesgo debido a cirugía intraocular previa o uveítis (Ishida et al., 2006).

### Otras terapias farmacológicas

Se ha propuesto el uso de cannabinoides, bloqueadores dopaminérgicos y también bloqueadores de canales de calcio entre otras dianas farmacológicas, que permitan el incremento de la facilidad de evacuación del HA aunque evitando los efectos secundarios adversos típicos de las terapias más clásicas, descritas previamente.

### 1. Diuresis osmótica (*glicerol, manitol*)

El *manitol* es el tratamiento de elección para disminuir rápidamente la PIO. Útil en la terapia de urgencia de los glaucomas agudos. Crea un gradiente de osmolaridad entre el líquido intraocular y los vasos sanguíneos que rodean el ojo. Debido a la hiperosmolaridad sanguínea se drena líquido del humor acuoso y del vítreo disminuyendo rápidamente la PIO. El efecto hipotensor dura 8 h y comienza 30 minutos tras la administración del fármaco. Después del tratamiento hay que restringir la toma de agua durante 2-4 horas para evitar contrarrestar la hipotensión al producirse una expansión de líquido en el compartimento extracelular. El tratamiento se puede repetir 4-6 h más tarde si fuera necesario. En pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva esta terapia es delicada ya que puede desencadenar edema de pulmón.

### 2. Antagonistas del calcio (*diltiazem*)

Pueden ejercer un efecto neuroprotector reduciendo el número de células ganglionares de la retina que mueren debido a la entrada excesiva de calcio. El *diltiazem* es un bloqueador de canales de calcio y un fármaco comercializado como antihipertensivo y antiarrítmico, que se usa para controlar el dolor en el tórax (angina).

## **Cirugía de Glaucoma**

Aunque la cirugía se toma como recurso último tras probar el tratamiento médico, en ocasiones, la intervención quirúrgica sobre las vías de drenaje es fundamental y urgente en glaucoma para reducir de forma inmediata el daño sobre el nervio.

En los últimos años la cirugía del glaucoma se ha especializado y diversificado, desde los cortes histológicos de trabéculo (*trabeculotomía*) (Weinreb and Khaw, 2004) para disminuir drásticamente la resistencia de drenaje a los procesos con cirugía láser, que han mostrado efectos de incremento en la expresión de proteínas del tipo metaloproteinasas (gelatinasa B, estromelina) capaces de renovar la matriz extracelular.

Es habitual la práctica con implantes 'shunt' (*gonioimplantes*) que mediante tubos de goma derivan el drenaje por vías adicionales. También existe cirugía para reducir la producción de HA (*ciclotocoagulación* mediante láser), aunque menos eficaz hasta el momento. Las intervenciones no son siempre definitivas para el control de la PIO y se deben combinar con tratamiento médico de forma crónica.

Nuevos modos de cirugía antiglaucomatosa no-perforante, como la esclerotomía o la viscocanalostomía (Robert Stegmann, en 1991) pretenden preservar la estructura

trabecular, sin extirpar trozos del tejido, procedimiento que lleva asociado riesgos posteriores como la sobre-filtración y la irritación. Se trata de una forma refinada de extracción de una fina capa de la pared del SC (Dietlein et al., 2000) creando un bypass que permite el paso del HA hacia el SC sin atravesar la TM.

## **Nuevas perspectivas en la terapia del glaucoma**

En general, actualmente, los pacientes con glaucoma, del tipo que sea, son tratados con ciertas terapias farmacológicas y combinaciones de ellas, a la vez que se puede usar cirugía. Pero a pesar de las posibilidades muchas de estas terapias pueden tener efectos adversos graves o muy graves, e incluso puede ser más difícil el tratarles a posteriori. Las investigaciones continúan y algunos de los proyectos de estudio más novedosos son por ejemplo:

### Terapia génica

La evidencia de que ciertos genes se encuentran sobreexpresados o mutados en enfermos de GPAA ha abierto numerosas investigaciones acerca de éstos y sus efectos sobre la PIO y el daño ganglionar, típico de la enfermedad. Grupos de investigación trabajan con el supuesto que son estos cambios en la expresión genética las causas subyacentes de la enfermedad. Aunque, otros estudios presentan la alteración genética como una consecuencia más de la patología.

Alguno de los genes mejor estudiados relacionados con el GPAA son el gen del CYP1B1 (citocromo P4501B1), relacionado con el glaucoma primario congénito, el gen TIGR/MYOC (*trabecular meshwork inducible glucocorticoid protein*) y el gen de la optineurina (OPTN). Múltiples mutaciones en MYOC se han detectado en casos de GPAA, así como mutaciones en OPTN en glaucoma de presión normal y hasta en un 16.7% de familias con glaucoma hereditario. Aunque se desconoce cómo esas alteraciones inducen glaucoma o modifican la fisiología de la TM.

Las mutaciones en estos genes podrían estar relacionadas, es decir, existen estudios que muestran cómo la OPTN tiene un papel regulador en la expresión de MYOC a nivel post-transcripcional, existe pues una relación de interacción molecular entre estos dos genes que contribuyen al GPAA (Fan et al., 2006; Funayama et al., 2006; Park et al., 2007).

Se están investigando algunos genes que responden a la elevada presión intraocular, como mecanismo adaptativo (Vittitow and Borrás, 2002; Vittitow and Borrás, 2004; Vittitow et al., 2002).

El resultado de los estudios con técnicas de transducción de adenovirus en la red trabecular es prometedor ya que se ha demostrado la alta eficiencia del rendimiento de transducción en células trabeculares (Borrás et al., 2001).

### Fármacos experimentales (posibles futuras terapias)

- Recientemente, se habla del acetato de *anecortave* (Alcon Laboratories), sustancia en fase de prueba, con resultados de éxito, ha sido reconocida por la *American Glaucoma Society*. Permite la disminución de la PIO pero con efectos adversos aún, como dolor ocular, aunque en muy bajo

porcentaje. Mediante inyecciones en el ojo, después de 3 meses, los pacientes con glaucoma tratados presentaban valores normales de PIO.

- Prevenir el efecto de moléculas inflamatorias como el *TNF-alfa*, factor de necrosis tumoral, que aparece en inflamaciones como respuesta autoinmune. Se ha comprobado el aumento significativo de este factor en glaucoma y su relación con el daño al nervio óptico.
- Con el nombre de *Namenda*, ya se comercializa el compuesto *nemantina* como el único fármaco que actúa directamente en la protección del nervio óptico.
- Estudios actuales apuntan en la dirección de las modificaciones del citoesqueleto de las células trabeculares, como factor que degenera durante el proceso patológico de enfermedades como el glaucoma (GPAA). Cambios en la dureza, el tono contráctil, en las uniones intercelulares y la forma de estas células son determinantes para las funciones del tejido, resistencia al paso del HA y filtrado del mismo. El grupo del Dr. Kaufman en Wisconsin probó que la latrunculina-B que despolimeriza filamentos de actina en la célula, incrementaba significativamente la facilidad de evacuación en ojos de mono. Hay otros compuestos como la citocalasina B (Kaufman et al., 1977) y la latrunculina-A y B (Okka et al., 2004; Peterson et al., 1999) modifican el citoesqueleto de actina y las uniones entre células, se han probado también, en la red trabecular, observándose la disminución de la PIO y la facilitación de drenaje de líquidos. Pero, ¿cuál es la razón directa para que el flujo avance con menor resistencia en estos casos? Por qué el estado del citoesqueleto puede ser tan determinante en la función de la malla trabecular?

Se sabe hoy, que el tejido trabecular regula activamente distintos mecanismos para llevar a cabo sus funciones, por ejemplo, mediante los cambios en el estado de contracción/relajación; se probó que la inhibición de la cadena ligera de la miosina (Rao et al., 2005) disminuye la capacidad contráctil de estas células e incrementa la capacidad de drenaje. Romper las uniones entre células y la disminución de fibras de estrés inhibiendo RhoA también tenía efectos directos e inmediatos sobre la facilidad de evacuación (Vittitow et al., 2002).

- Otros candidatos esperanzadores dentro de las nuevas terapias son los inhibidores de la PKC (*H7* y *chelerythrine*) y de la tirosina quinasa (*genisteína*) que han demostrado ser relajantes del tejido trabecular con el consecuente aumento de evacuación de flujo (Stumpff et al., 1997; Thieme et al., 1999).
- Técnicas de transducción de proteínas novedosas que empiezan a aplicarse en tejido y a usarse como método para la aplicación de drogas que actúen de forma específica en el espacio intracelular (Gomez-Cabrero et al., 2005).

## **1.c MALLA TRABECULAR (TM)**

### **1.c.1 DESCRIPCIÓN DEL TEJIDO TRABECULAR**

Hallamos la malla trabecular o trabéculo (TM) en la intersección de la córnea y la esclerótica, justo en el vértice del ángulo iridocorneal y se extiende desde el endotelio de la córnea hasta la úvea. Un tejido ordenado tri-dimensionalmente como una red de intrincado aspecto, con espacios que van de mayor a menor tamaño a medida que el tejido se une con el endotelio del canal de Schlemm, donde es drenado el HA fuera del ojo. La TM se compone de bandas paralelas planas de tejido conectivo (ECM) envueltas por células, las células trabeculares, que son de naturaleza mixta: de tipo endotelial (Foets et al., 1992) y de tipo muscular con propiedades similares a las células de músculo liso (proteínas contráctiles, alfa-actina de músculo liso) (Stumpff and Wiederholt, 2000).

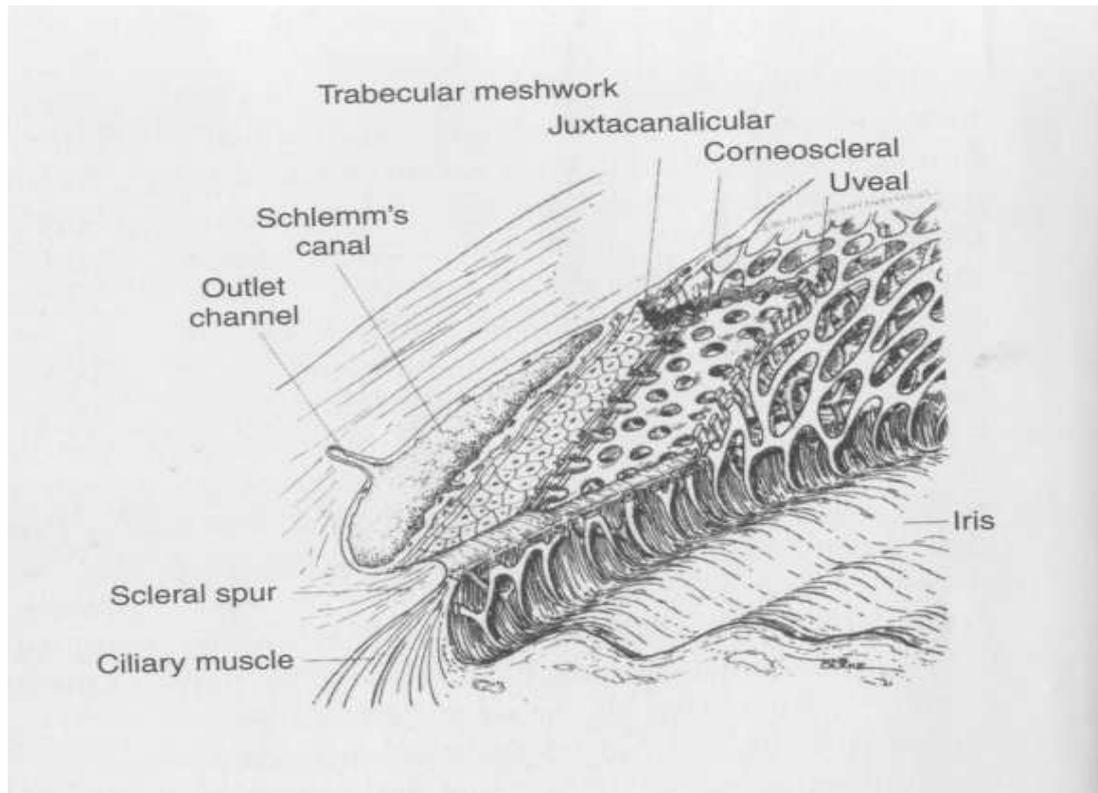
Clásicamente, la malla trabecular se divide en 2 partes. La parte interna o uveal, más próxima a la cámara anterior y la parte que conecta con el canal de Schlemm, mucho más compacta, la zona corneoescleral (**figura 9**).

#### Capa uveal

Es la parte más externa del tejido, es la zona más cercana a la cámara anterior y su aspecto se resume en láminas de tejido conectivo muy finas y en paralelo, con células endoteliales abrazadas a un entramado de fibras. Es un conjunto de 3 a 4 capas de grosores 5 a 12  $\mu\text{m}$ , compuestas de haces de tejido con morfología cilíndrica y superficie rugosa. Estos haces se interconectan formando orificios, espacios, poligonales de diámetros entre 20 a 30  $\mu\text{m}$ . Esta arquitectura presenta cavidades que permiten el paso al humor acuoso con relativa baja resistencia (Lutjen-Drecoll and Rohen, 1981)

#### Capa corneoescleral

Entre el espolón escleral y el endotelio de la córnea. Es una segunda capa, intermedia, parecida a la región uveal, existen láminas basales recubiertas con células trabeculares de tipo endotelial y las láminas en este punto son ricas en colágeno, ácido hialurónico, fibras elásticas y glicoproteínas. Pero los huecos son menores, y la resistencia al flujo de HA aumenta significativamente en relación al tramo uveal (Lutjen-Drecoll and Rohen, 1981).



**Figura 9.** Dibujo esquemático de los tejidos del ángulo iridocorneal y las principales capas de la malla trabecular (TM): capa uveal (la más permeable), corneoescleral (capa intermedia) y juxtacanalicular (más densa y de tipo endotelial). El músculo ciliar (CM) y el espolón escleral (SP) en la base de la red trabecular pueden modificar la arquitectura de éste y la permeabilidad al paso del humor acuoso (HA). El canal de Schlemm (SC) recoge el HA evacuado a través de TM. Extraído de (Gabelt et al., 2003).

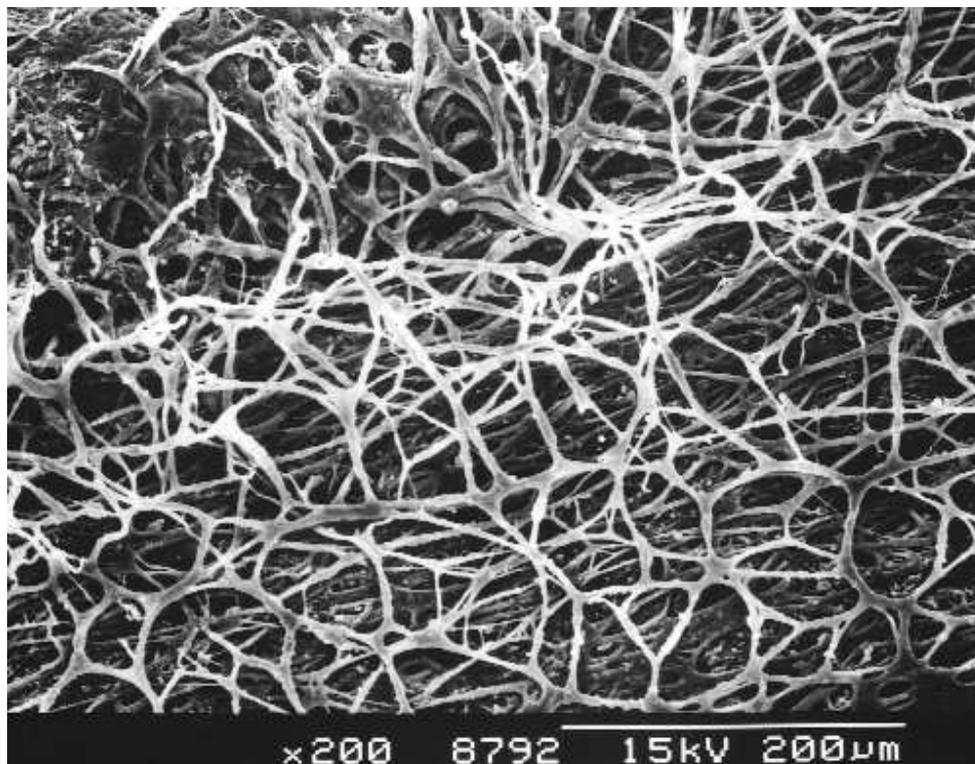
Se trata de entre 15 a 20 capas de haces de tejido con grosores de 5  $\mu\text{m}$ , la amplitud o ancho del haz es mayor que para las capas uveales y son formaciones aplanadas, lisas y dispuestas en paralelo con la periferia de la córnea. Los orificios a través de los cuales fluye el HA son redondeados, sin vértices como en las formas de polígono uveales, con eje mayor máximo de 10  $\mu\text{m}$  y un eje menor de apenas 5  $\mu\text{m}$ .

#### Capa cribiforme o juxtacanalicular (JCT)

Región más profunda de la red trabecular que está en contacto directo con el endotelio interno del canal de Schlemm. La matriz extracelular es densa y los espacios entre células son menores, por eso, es la zona de máxima resistencia al paso del flujo (Lutjen-Drecoll, 1999). Los compuestos de la matriz aquí son colágeno, fibronectina, laminina, glicosaminoglicanos y ácido hialurónico. Las células trabeculares de esta capa son las responsables de secretar o promover la formación de estos compuestos de la matriz (Gabelt et al., 2003).

Sin duda, la arquitectura global de la malla trabecular es fundamental para su función como tejido filtrante, fagocitario y sobretodo para mantener la resistencia adecuada al paso del humor acuoso, de forma que se mantenga el valor de PIO dentro del rango

fisiológico adecuado. En la **figura 10**, vemos la imagen del tejido, como un entramado de células y matriz.



**Figura 10. Imagen de la superficie intracameral de la red trabecular.** Aspecto de red permeable con orificios de diversos tamaños a través de los cuales fluye el HA. Microscopía electrónica de 'scanning' (SEM) (X200). Extraído de J.M. Potau, M. Canals, J. Costa, M.D. Merindano and D. Ruano; 'Obstruction of trabecular orifices in primary open-angle glaucoma'; *Eur J Anat*, 6 (2): 75-81 (2002).

La TM ha de ser capaz de mantener la presión intraocular alrededor de 10-20 mmHg y para ello es preciso que oponga resistencia al paso de HA, puesto que la presión venosa es de 7-9 mmHg. Y esto es posible gracias al conjunto del tejido, por una parte a las propiedades de las células trabeculares (variaciones contráctiles, cambio de volumen, cambios químicos secretando metaloproteinasas, etc.), por otra, a la regulación de la ECM, puesto que su contenido de fibras y colágeno puede variar, y esto afectar nuevamente, a los espacios de permeabilidad del tejido, y también por otros factores externos al tejido, pero debidos a la relación de éste con los nervios del espón escleral y los músculos oculares, especialmente, el músculo ciliar.

#### Relación de TM con otros tejidos de su entorno

Existe una relación de oposición entre el músculo ciliar (CM) y la red trabecular (TM). Sustancias que logran contraer la red trabecular consiguen relajar el músculo ciliar y a la inversa, la contracción del CM implica la relajación de la red trabecular. La pilocarpina, una agonista de receptores colinérgicos, es capaz de la disminución de la PIO y producir un aumento del flujo a través de la red trabecular, en un tono contráctil más relajado por efecto de la contracción del músculo ciliar (Wiederholt et al., 2000a). Las sustancias que consiguen contraer el músculo relajan la malla. Se da

un antagonismo farmacológico entre estos dos tejidos TM y CM, sustancias que contraen a uno relajan al otro y viceversa.

La contracción del tejido trabecular por agonistas muscarínicos y ciertos adrenérgicos implica la disminución en el ritmo de evacuación o una mayor resistencia al paso de fluidos por el efecto relajante de estas sustancias sobre el CM (Erickson-Lamy et al., 1991). De forma directa, sobre el trabéculo, agentes antagonistas de los canales de  $Ca^{2+}$ , algunos agonistas adrenérgicos o mediante la activación del sistema NO/cGMP se induce la relajación de TM, la facilitación del drenaje y la disminución de la PIO (Stumpff and Wiederholt, 2000;Wiederholt et al., 1994a), a su vez, también estas sustancias pueden relajar el CM.

Las sustancias colinérgicomiméticas actúan sobre el sistema nervioso parasimpático, en pro de la relajación de tejidos. Durante mucho tiempo se han usado sustancias de este tipo en la terapia del glaucoma puesto que, en el ojo, tenía el efecto tan buscado de disminuir la PIO en parte por su efecto contráctil sobre el CM (Lepple-Wienhues et al., 1991). Las más populares de estas sustancias son la acetilcolina (Bayer, 1867; es un mediador fisiológico del sistema parasimpático), la pilocarpina (1876, Adolf Weber; jugó un papel clave en la terapia del glaucoma durante décadas) y la aceclidina (Rubitzkov, 1950; posee una acción miótica 10 veces más potente que la de la pilocarpina y su ventaja es que no es tan eficaz con el músculo ciliar, lo cual disminuye efectos secundarios indeseables en la acomodación del cristalino) actúan sobre los nervios que circundan la red trabecular e inducen miosis (contracción de la pupila), por eso los fármacos colinérgicos también se conocen como mióticos y sin duda, forman parte del listado de las terapias antiglaucoma más clásicas. Por otra parte, estudios hechos sobre el tejido TM aislado (perfusión de segmento anterior bovino, extrayendo el músculo y cuerpo ciliar e iris) han mostrado que carbacol y epinefrina (adrenalina), así como sustancias colinérgicos, inducen contracción del tejido TM, y que esto supone el aumento de la resistencia del tejido al flujo de HA (Wiederholt et al., 1995).

Además del CM, está el espolón escleral que se sitúa en la zona de inserción entre la esclera con la raíz del iris y la córnea, este tejido contiene distintas terminaciones nerviosas y es colindante con el TM. Mediante cortes de tejido sagitales y tangenciales de TM y del espolón escleral, estudios por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos han revelado la presencia de terminales nerviosos colinérgicos y nitrérgicos en el TM y en el espolón, de forma que se puede inducir la contracción o relajación de las células del espolón (miofibroblastos contráctiles) a través de estímulos con neurotransmisores y en consecuencia, producir cambios en la función de drenaje de TM (Selbach et al., 2000;Tamm et al., 1992) debido a que estas terminaciones nerviosas están en contacto con las fibras elásticas de la matriz de la TM (Tamm et al., 1992). Se encuentran fibras nerviosas y varicosidades axonales de tipo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-diaforasa (NADPHd), NADPHd-positivas, que son aún más abundantes en el espolón. Este tipo de fibra se hallaron en la zona corneoescleral y cribiforme. También se detectan fibras nerviosas marcadas con inmunoreactivo de transportador vesicular de acetilcolina (VACHT-IR), específicas de neuronas colinérgicas en humanos. Ambos tipos, formarían el grupo de nervios eferentes, que pueden inducir contracción/relajación en las células TM. Las fibras nitrérgicas se encuentran en la proximidad de la pared interna del canal de Schlemm, y tendrían un efecto inhibitor. El grupo de nervios aferentes de TM, serían

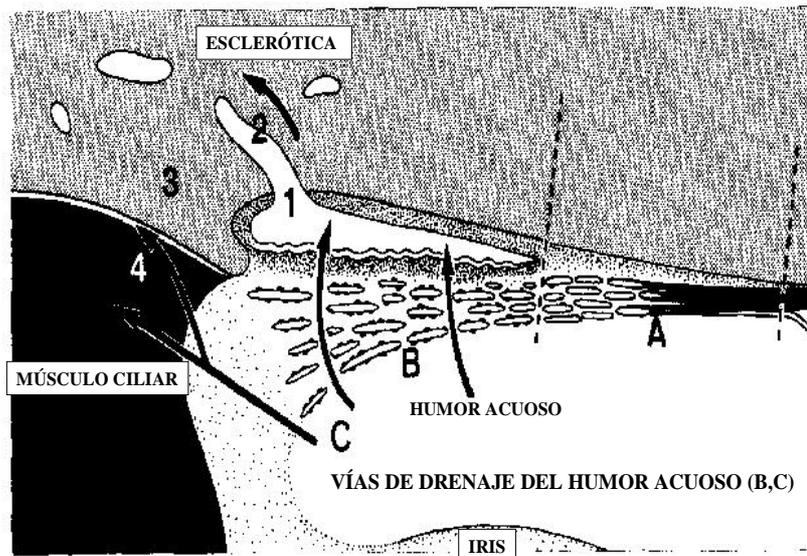
los terminales de sustancias P (SP-IR terminales) hallados en contacto con las fibras elásticas de la matriz de TM, y podrían sentir el 'stretch' del tejido trabecular.

Además, los tejidos del ángulo de drenaje en ojos humanos y de mono contienen células marcadas para la proteína  $\alpha$ -actina de músculo liso, esta proteína aparece tanto en TM como en la región del espón.

La complejidad de su estructura microscópica y la heterogeneidad de sus capas han hecho que el avance en el estudio de la fisiología de TM haya sido lento, pero ahora, podemos observar la morfología de la malla trabecular con el detalle que ofrece por ejemplo la microscopía electrónica (TEM) o incluso técnicas más finas y que permiten que la muestra de tejido se conserve mejor, como es la técnica *quick-freeze/deep-etch* (QF/DE) (Gong et al., 2002). Las nuevas imágenes que se van obteniendo nos revelan datos ultraestructurales más fiables que nos permiten inferir cómo, por ejemplo, cambios en la forma o la mecánica celular pueden alterar el tamaño de los huecos entre haces y modificar significativamente la permeabilidad del tejido. Por otra parte, la microscopía 'two-photon' de láser confocal ha resultado ser de gran utilidad para observar células de la pared interna del canal de Schlemm. Y el uso de la fluorescencia ('fotobleaching') se ha utilizado para detectar el camino del líquido perfundido a través del tejido intacto (Fautsch and Johnson, 2006). No obstante, se considera un cierto margen de duda sobre la sensibilidad para adquirir imágenes sin artefactos propios de la manipulación requerida en las técnicas disponibles.

Como se ha comentado, la imagen de filtro pasivo está obsoleta para TM, se sabe que el papel de la fisiología celular en el tejido es principal puesto que regula la arquitectura y la composición del tejido y de esta manera la función de evacuación; así que es un tejido, sin duda, activo.

Existe desde hace años, una cuestión que añade incógnitas sobre la dinámica del flujo a través de TM, las medidas que se tienen de los espacios microscópicos o poros por donde pasa el flujo, ni en las zonas de menor porosidad, más compactas, de mayor resistencia de la JCT son suficientemente pequeños como para poder explicar el valor de resistencia final observado, que es mucho mayor de lo esperado. Parece que esta incongruencia se puede resolver teniendo en cuenta un fenómeno de interacción hidrodinámica entre la zona JCT y la pared interna del endotelio de Schlemm (efecto 'funneling' o 'embudo') (Johnson et al., 1992).



**Figura 11. Diagrama esquemático de las vías de drenaje del HA en la zona del ángulo iridocorneal.** (A) zona de no drenaje, (B) paso a través de la red trabecular (vía convencional/trabecular) que conduce al canal de Schlemm (1) y posteriormente al colector de canales (2), (C) a través de tejido de músculo ciliar (4) y la esclerótica (3) (vía no convencional/uveoscleral). Modificado de 'Functional Morphology of the Trabecular Meshwork in Primate Eyes', Elke Lütjendrecoll, 1998.

## **Células trabeculares y sus mecanismos autoreguladores**

### Fagocitosis y secreción de metaloproteinasas

Las células trabeculares fagocitan material de detritus del HA a su paso por el tejido, metabólicamente son muy activas, y también secretan sustancias para el mantenimiento de la matriz extracelular. Poseen, aunque no es homogéneo en toda la población, propiedades contráctiles por lo que pueden contraerse y poseen también, receptores que las hacen susceptibles de responder a estímulos diversos, fisiológicos o bien patológicas, como el estrés oxidativo (Buller et al., 1990; Russell and Johnson, 1996). Pero se las considera, mayormente, células de carácter endotelial, especialmente en las capas más cercanas al canal de Schlemm, donde la resistencia al paso del HA es mayor.

Se trata de un tejido complejo porqué su población es mixta, lo cual indica que puede estar realizando diversas funciones. Las células trabeculares fagocitan material diverso, de exfoliación de otros tejidos, pigmentos o incluso ADN, que se encuentran en el HA (Bahler et al., 2004; Barequet et al., 2000; Buller et al., 1990; Yamamoto et al., 2003).

Secretan metaloproteinasas, para mantener y controlar el contenido de fibras de la matriz. Se encargan también de la neutralización de peróxidos y radicales libres mediante enzimas intracelulares (De La Paz and Epstein, 1996; Johnson et al., 1989; Russell and Johnson, 1996).

## Células contráctiles

Las primeras observaciones sobre el tejido señalaron que era un tejido filtrante pasivo, y que eran los cambios de contractibilidad del músculo ciliar en sus inserciones en los alrededores del tejido la causa de las variaciones en la permeabilidad de la red trabecular. Es en el artículo (BARANY and Rohen, 1963) donde por primera vez, se interpreta la respuesta observada para pilocarpina en los incrementos de facilidad de drenaje, como efecto de cambios en el tono contráctil de la red trabecular y no del músculo ciliar. Hoy se sabe, que el comportamiento de la red trabecular asemeja al de los tejidos de músculo liso (Coroneo et al., 1991; de Kater et al., 1990; Tripathi and Tripathi, 1980). Al menos una subpoblación de células TM contienen actina de músculo liso (smA) y poseen capacidad contráctil, propiedad que sin duda puede tener efectos en la función evacuadora del tejido (Flugel et al., 1991; Wiederholt, 1998a). Estudios hechos en perros *beagle*, detectaron proteína smA y se pudo comparar entre ojos glaucomatosos y sanos, en ojos enfermos se detectó menor señal de esta proteína en los análisis de inmunocitoquímica (Hassel et al., 2007). El glaucoma de hecho, se considera una enfermedad de la edad. El envejecimiento del tejido implica muerte celular y disfunciones en la fisiología normal de las células, algunas provocadas por la pérdida de expresión normal de proteínas en la célula (Grierson et al., 1984; Grierson and Howes, 1987).

En la contracción de músculo liso existen diversas vías implicadas en la regulación de la contracción; la vía PKC por ejemplo, fue propuesta al observar cómo esteroides de forbol (PMAs) inducían contracción de forma lenta y sostenida (Meininger et al., 1999). La proteína quinasa C (PKC) es una familia de quinasas serina-treoninas implicadas en una gran variedad de vías de señalización por agonista (Livneh and Fishman, 1997). Su papel en diferenciación, control del crecimiento y muerte celular es conocido, pero su relación con procesos de contracción y relajación para células de músculo liso se sugirió más tarde, en diversas publicaciones, a finales de los años 80 (Andrea and Walsh, 1992). Los efectos contráctiles del carbacol se probaron sobre tiras de tejido trabecular, los cuáles eran remitidos por aplicación de inhibidores de PKC como el H7 y un sustrato que interacciona con PKC (mPKC) que impide que éste se active normalmente (Thieme et al., 1999). Las variantes de PKC son unas dependientes y otras independientes de calcio, y en músculo liso se encuentran tipos de los 2 grupos. Como cierta población de TM contienen smA, nació la hipótesis de implicar PKC en la contracción del tejido y en los efectos sobre su permeabilidad (Wiederholt, 1998b). Otras características acercan a las TM a las células de músculo liso, por ejemplo, su contenido en filamentos contráctiles y ciertas propiedades electrofisiológicas (Wiederholt et al., 1996).

Otras sustancias, como son las vasoconstrictoras bradiquinina (y endotelina-1) han sido ya probadas sobre el tejido intacto, con la técnica de perfusión de segmento anterior, los resultados mostraban la disminución de flujo de HA a través de la red trabecular tras la aplicación de la droga, de forma muy rápida (pocos minutos) y con una lenta recuperación hacia niveles basales (Llobet et al., 1999a).

## Cambios en el volumen celular

Hoy se sabe también que estas células (en primates no humanos y en bovinos) pueden alterar la permeabilidad del tejido mediante la regulación del volumen celular, de esta forma, el aumento de volumen puede disminuir la permeabilidad y a la

inversa. Se habla de un sistema de regulación de incremento de volumen (RVI) y de disminución de volumen (RVD). En relación al sistema regulador de disminución del volumen (RVD) se ha determinado que el mecanismo se debe principalmente a la activación de canales de Cl<sup>-</sup> de 'swelling', K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> symports y antiports Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>, por otra parte, el enlace Ca<sup>2+</sup>-Cam puede mejorar la apertura de estos canales pero no es esencial. Durante el 'swelling' celular se dan incrementos de Ca<sup>2+</sup> intracelular pero esta señal no está causalmente relacionada con el proceso de RVD posterior. No se sabe si todas o sólo algunas de las poblaciones de trabeculares son capaces de alterar su volumen y modificar el drenaje de TM, los estudios apuntan a la población de células de la capa juxtacanicular como las candidatas más plausibles capaces de alterar su volumen y modificar la función del tejido, no obstante, la respuesta a fármacos o condiciones que afectan el volumen celular en estudios de células aisladas sin distinción de capas, es homogénea y consistente (Comes et al., 2005; Mitchell et al., 2002).

## **Receptores de membrana en células trabeculares**

En células trabeculares han sido descritos diversos receptores en membrana. Algunos de ellos son:

### Receptores de adenosina (AR)

Los receptores de adenosina han revelado su capacidad de modular la PIO en condiciones fisiológicas y patológicas. Se ha comprobado que la estimulación de estos receptores (A<sub>1</sub>AR, A<sub>2</sub>AR, A<sub>3</sub>AR) en células trabeculares tiene efectos comunes y otros opuestos (Fleischhauer et al., 2003). Es la llamada modulación de drenaje purinérgica. Los receptores AR acoplados a proteína G tienen la habilidad de alterar la actividad de la adenilil ciclasa y la concentración de cAMP en la célula. También pueden activar la vía de la fosfolipasa C (PLC) y las proteínas quinasa mitogenactivadas (Schulte and Fredholm, 2003).

Testando con diferentes agonistas específicos para cada uno de los AR, se observó variabilidad de respuestas en células TM humanas, indicando la heterogeneidad de poblaciones (de Kater et al., 1990; de Kater et al., 1992; Fleischhauer et al., 2003). Estudios en células de la línea humana TM5, han mostrado resultados más reproducibles. En este caso, tras el estímulo con agonistas de A<sub>1</sub>AR (S-ENBA, ADAC) el volumen celular disminuía ('shrinkage') y no ocurría en cambio, tras estimular selectivamente los receptores A<sub>2</sub> (CGS-21680 y DPMA) o los receptores A<sub>3</sub> (Cl-IB-MECA), ensayos en los que no hubo cambio significativo en el volumen de la célula. El estímulo de A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>AR supuso un incremento en el Ca<sup>2+</sup> intracelular y el incremento en las corrientes 'whole-cell' de salida de K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> pero sus efectos en la permeabilidad del tejido son opuestos (Karl et al., 2007).

La movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular sugiere el papel de la vía PLC. Además el Ca<sup>2+</sup> está directamente implicado en la contractibilidad del tejido y en la remodelación del citoesqueleto de actina de las TM (Grosheva et al., 2006).

Encontramos un efecto regulador sobre la PIO en el knockout de los A<sub>3</sub>AR en estas células para ratón, disminuye la PIO (Avila et al., 2002) y además, se ha hallado la

sobreexpresión de estos receptores en casos de glaucoma de pseudoexfoliación en los A<sub>3</sub>AR de las células del epitelio del cuerpo ciliar (Avila et al., 2002;Schlotzer-Schrehardt et al., 2005). En ambos casos, es la modificación de la secreción de HA o influjo, el factor que altera la PIO.

Por otra parte, en células trabeculares, la agonista A<sub>1</sub> estimula la secreción de MMP-2 y por lo tanto la degradación de la matriz extracelular, efecto que mejora el drenaje y disminuye la PIO (Shearer and Crosson, 2002).

### Receptores purinérgicos (P<sub>2</sub>Y) (nucleótidos, dinucleótidos)

Se ha detectado la presencia de receptores purinérgicos de tipo metabotrópico, los P<sub>2</sub>Y en células trabeculares humanas y bovinas. Concretamente, se han hallado los subtipos P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>Y<sub>4</sub>, P<sub>2</sub>Y<sub>11</sub> (Crosson et al., 2004). Los receptores P<sub>2</sub>Y se componen de 7 dominios transmembrana y acoplados a proteína G, activan la vía PLC y también la vía de la quinasa (ERK)<sub>1/2</sub> regulada por señales extracelulares. Algunos de ellos regulan la adenilato ciclasa a través de G<sub>i</sub> y conectan con otras vías de segundos mensajeros (Hollopeter et al., 2001;Nicholas, 2001).

Encontramos receptores P<sub>2</sub>Y en lugares de secreción (finalizaciones nerviosas de los procesos ciliares), en puntos de drenaje del HA, en retina y en la malla trabecular. Su extensa presencia en tejidos oculares, sugiere que el papel de estos receptores en ojo es diverso y significativo.

Ciertos agonistas para receptores purinérgicos como los polifosfatos diadenosina (Ap<sub>n</sub>A), han sido detectados en muy distintos tejidos de diferentes especies mamíferas, y particularmente en humanos. En ojo, diferentes dinucleótidos se encuentran en la lágrima y en la composición del humor acuoso, mayoritariamente Ap<sub>4</sub>A, Ap<sub>5</sub>A y Ap<sub>3</sub>A, pero abunda sobretodo, Ap<sub>4</sub>A (Mitchell et al., 1998;Pintor et al., 2003).

Los nucleótidos pueden controlar la PIO, por ejemplo, la adenosina y análogos probaron su capacidad en la modulación de PIO, incrementando o disminuyendo su valor dependiendo del receptor estimulado (Crosson, 2001).

En cultivos trabeculares primarios se observan incrementos de Ca<sup>2+</sup> intracelular en forma de pico discreto o en forma oscilatoria con dinucleótidos como Ap<sub>4</sub>A y Ap<sub>5</sub>A. Se ha comprobado que por perfusión de segmento anterior, Ap<sub>3</sub>A y Ap<sub>4</sub>A, facilitan el drenaje de fluidos a través de TM, al igual que la aplicación tópica en la córnea de Ap<sub>4</sub>A. El receptor principal que media el efecto de Ap<sub>4</sub>A y otros dinucleótidos que incrementan el drenaje es el P<sub>2</sub>Y(1) (Soto et al., 2005).

Conocer su mecanismo y sus posibles funciones moduladoras pueden ser de gran utilidad terapéutica en patologías como el glaucoma o el ojo seco.

### Receptores de prostaglandinas (PGs)

Las prostaglandinas (PG) son hormonas sintetizadas y que se secretan de forma local inflamaciones.

Los receptores de PGs están acoplados a proteína G y estimulan segundos mensajeros como la proteína quinasa A (PKA) y PKC, así como median un incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Por ejemplo, una PG como  $\text{PGE}_2$  actúa sobre el receptor EP2 ligado a proteína Gs y causa la activación de adenilil ciclasa y PKA (Abramovitz et al., 1994; An et al., 1993; Sakamoto et al., 1995).

En ojo, en las zonas de drenaje de humor acuoso, en la TM, se producen también PGs, con efectos sobre la regulación normal de la salida de HA (Weinreb et al., 1983; Weinreb and Mitchell, 1989). Se ha comprobado que la aplicación tópica de PGs tiene efectos reductores de la PIO y actualmente, es un tipo de medicación usada en la terapia antiglaucoma. Por ejemplo, es conocido el latanoprost (13,14-dihidro-17-fenil-18,19,20-trinor-PGF<sub>2</sub> alfa isopropil ester), una agonista selectiva del receptor de FP-PG, que es aplicada de forma tópica. Sus efectos son significativos en la vía uveoscleral (alteración de la estructura del camino uveoscleral) para la cual aumenta la facilidad de drenaje sin efectos importantes en la producción de HA y sólo con un ligero efecto facilitador para la vía trabecular (Gabelt and Kaufman, 1989; Lee et al., 1984). La aplicación de PGF<sub>2</sub> produce la descompresión del tejido conectivo en el músculo ciliar y así, por cambios en la estructura (aumento de los espacios intercelulares) y por remodelación de la matriz extracelular del músculo, el flujo de HA puede desviarse más fácilmente por la vía uveoscleral (minoritaria, en condiciones fisiológicas) (Ocklind, 1998; Sagara et al., 1999). Estudios farmacocinéticos hechos en ojo humano, con latanoprost, han permitido determinar que el compuesto se distribuye en el ojo en iris, cuerpo ciliar y ciertas partes anteriores de la esclera (Sjoquist et al., 1999).

Por otra parte, se sabe que la exposición de los tejidos oculares citados, a PGF<sub>2</sub> y otras variantes de prostaglandinas, puede inducir a la mayor actividad, en pocos minutos, de factores de transcripción como c-Fos y c-Jun. Y también, el incremento de la familia de genes de las metaloproteinasas de matriz. Responsables de la degradación de componentes de la matriz extracelular. Esto último, tiene efectos sobre la permeabilidad del tejido trabecular debido a los espacios que aparecen en la matriz. Más adelante, se hablará con más detalle de la composición y papel de la matriz en este tejido (apartado *Matriz extracelular*).

### Receptores de cannabinoides (CB)

Los receptores clásicos para cannabinoides son CB<sub>1</sub>R y CB<sub>2</sub>R. CB<sub>1</sub>R extendido en multitud de tejidos de todo el cuerpo, es objeto de investigación muy intensa actualmente, por su papel en multitud de terapias (p.ej. paliación del dolor).

Recientemente, se ha publicado que CB<sub>1</sub>Rs se encuentran también en células trabeculares (Stamer et al., 2001a) y diversos ensayos demuestran que la administración de cannabinoides en ojo, puede reducir considerablemente la PIO (Jarvinen et al., 2002) y que especialmente los CB<sub>1</sub> están implicados en esta disminución.

Algunos de los agonistas típicos de endocannabinoides son araquidoniletanolamida (anandamida) y araquidonilglicerol (2-AG), y sus variantes más estables, puesto que ambos son inestables.

En diversos tipos celulares, estos agonistas cannabinoides modulan la morfología, la adhesión, o el citoesqueleto celular a través de los CBR (Song and Zhong, 2000; Tahir and Zimmerman, 1991). Por ejemplo, el compuesto 2-Arachidonyl glyceryl ether (2-AGE) o conocido por el nombre de *noladin ether* es un endocannabinoide ligado específicamente a CB1R que se ha testado en TMs, revelando que la estimulación de la migración por fibronectina puede inhibirse con la aplicación de este compuesto, mientras que si se usa junto con SR141716A, un antagonista de los receptores CB1 o CB2, el efecto de noladin desaparece. Resultados similares se obtuvieron para las pruebas de adhesión. Noladin también tuvo efectos sobre las fibras de estrés de actina y las adhesiones focales, modificaciones que se evitaban inhibiendo el receptor de CB1 (Kumar and Song, 2006).

CB1R está acoplado a proteína G, preferentemente a la familia de Gi/o, se asocia a la inhibición de la adenyl cyclasa y canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (N,P/Q) y a la activación de canales de potasio rectificadores de entrada. Se sabe que CB1 activa canales de potasio sensibles a Ca<sup>2+</sup> en células humanas trabeculares y que relaja el tejido TM (tiras de TM bovino) (Stumpff et al., 2005a).

CB2R también se expresa funcionalmente en el ojo, se encuentra en retina y en la malla trabecular. Agonistas selectivos para estos receptores fueron probados en células TM obteniendo resultados sobre la mediación de los CB2R en la disminución de las fibras de estrés y el ritmo de migración (ensayos de 'wound-healing') tras la aplicación de JWH015, agonista selectivo para CB2R. Este compuesto además disminuyó la actividad de Rac1 GTPasa, lo cual sugiere que es ésta la vía en la que interfiere JWH015 (Zhong et al., 2005).

Recientes estudios remarcan la funcionalidad de los receptores CB1R a través del acoplamiento con Gq/11 y Gi/o en la línea celular humana hTM5. WIN una agonista CB1 activa la señalización de Ca<sup>2+</sup> intracelular y fosforilación de ERK1/2. Este compuesto además puede tener un papel directo en la función de TM. Tests en animales probaron la disminución de la PIO tras la aplicación de WIN. Por todo ello, se sugiere el papel de CB1R en la regulación del flujo de HA, a través de TM (McIntosh et al., 2007).

### Receptores de serotonina (5HT)

La serotonina (5-hidroxi triptamina; 5HT) es un neurotransmisor endógeno muy potente, propio del sistema nervioso central en mamíferos, pero que se ha hallado también en distintos tejidos oculares (cuerpo ciliar e iris) y en HA.

En células TM humanas se ha detectado vía rt-PCR la señal para dos receptores de serotonina, son 5HT<sub>2A</sub> y 5HT<sub>2B</sub>. El ensayo con distintos agonistas y antagonistas serotoninérgicos muestran que uno de los mecanismos de transducción de la señal para los receptores 5HT<sub>2A</sub> (acoplados a proteína G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>), es la hidrólisis de fosfoinosítoles y la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular. (Sharif et al., 2006).

Se ha propuesto a los receptores de 5HT como posibles dianas farmacológicas, útiles para modificar el flujo de HA y disminuir la PIO, en casos de glaucoma. Los estudios hasta el momento muestran cierta variabilidad dependiendo del receptor en concreto

y de la especie animal testada. Se ha comprobado que ciertas agonistas para receptores de tipo 5HT<sub>2</sub> disminuyen la PIO en monos *cynomolgus* (May et al., 2005).

### Receptores de Bradiquinina (BK)

Estudios de inmunohistoquímica y bioquímica (Igic, 1985; Ma et al., 1996) permitieron reconocer el sistema de kallikrein-kinina en diferentes tejidos del ojo, el cuerpo ciliar, la coroides, el iris, retina y también en el tejido trabecular.

En las células TM, se ha encontrado un tipo específico de estos receptores, los receptores B<sub>2</sub> quinina y la bradiquinina (BK) es su agonista. La Bk estimula la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular y extracelular, a través de la vía PLC, ya que el receptor está acoplado a proteína Gq.

BK induce cambios en la forma de la célula (reducción del área), dependientes de calmodulina, en cultivos primarios de células trabeculares bovinas y en tejido (perfusión de segmentos anteriores) disminuye la facilidad de evacuación (Llobet et al., 1999b).

Enzimas principales de este sistema de quininas se encuentran en el HA. En tejido conocemos que la administración de BK intravenosa disminuye la PIO (Funk et al., 1985) mientras que el resultado de estudios aplicando esta sustancia intracámara, muestran el comportamiento opuesto (Yokoyama et al., 1990).

Por otra parte, se sabe que BK incrementa la señalización de PGE<sub>2</sub> y la formación de cAMP en células trabeculares bovinas (Webb et al., 2003). La elevación de los niveles de cAMP en la cámara anterior por efecto de prostaglandinas incrementa la facilidad de flujo en los experimentos de perfusión de segmentos anteriores de ojos humanos y bovinos (Dijkstra et al., 1999; Gilabert et al., 1997). La producción de PGE<sub>2</sub>, también se ve con otro péptido endógeno, la endotelina-1, que estimula en las TM vías de señalización muy similares a las que activa BK.

Otro de estos sistemas de regulación puesto en marcha por las trabeculares, tras la aplicación de BK, es la secreción de MMP-9 al medio extracelular. Durante un tiempo de varias horas, en una concentración elevada, las metaloproteinasas (MMP) degradan fibras de la ECM y como consecuencia de ello, se facilita el paso de flujo. Este efecto es inhibido por el antagonista del receptor de quininas, HOE-140 (Webb et al., 2006).

### Receptores de Endotelina-1 (ET-1)

ET-1 es una sustancia derivada de células endoteliales que actúa como un regulador local del tono vascular y es uno de los mayores vasoconstrictores fisiológicos. Hay 2 tipos de receptor para ET-1, ET-AR y ET-BR. En células de músculo liso del sistema vascular y de algunos órganos predomina ET-AR. En el cerebro, epitelios y endotelios es preferente ET-BR (Davenport and Battistini, 2002). El receptor A media los procesos de contracción y el receptor B, en cambio, la relajación de las esas mismas células de músculo liso vasculares, a través de la descarga de NO por parte del endotelio vascular (Hirata et al., 1993) aunque también

se han descrito como mediadores de contracción si se expresan en células musculares (Clozel and Gray, 1995).

Los receptores de ET-1 (como los receptores de BK) están acoplados a proteína G, concretamente a las familias  $G_i/G_o$  de las proteínas G sensibles a la toxina *pertussis* (PTX) como se ha comprobado en células mesangiales, en miocitos ventriculares y en células de miometrio uterino de rata (Kelly et al., 1990; Kimura et al., 1999; Simonson and Dunn, 1990) así como en células de músculo liso circular del esófago de gato (Shin et al., 2002). El acoplamiento estimula la hidrólisis de la enzima PLC, esta vía clásicamente produce inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG) y la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular. El incremento de  $Ca^{2+}$  activa las quinasas dependientes de CaM como la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) que fosforila a MLC, lo cual es imprescindible para la contracción celular. DAG, por otra parte, activa proteína quinasa C (PKC) implicada también en el proceso contráctil (Dlugosz et al., 1998; Lee and Severson, 1994). Estudios con forbol esteroides muestran el estímulo contráctil en células de músculo liso (Sato et al., 1992) y mesangiales (Troyer et al., 1988). PKC está implicada también en la fosforilación de MLC en los lugares de serina-1 o 2 y treonina-9 y el complejo CaM fosforila MLC, en treonina-18 y serina-19 (Walsh et al., 1994).

ET-1 aparece en la regulación de la circulación sanguínea de por ejemplo, la retina y coroides (Sugiyama and Azuma, 1995; Troyer et al., 1988) pero también se encuentra expresión de este péptido, sintetizado y secretado, en células del epitelio corneal, del iris, del músculo ciliar, células trabeculares y del límite con el canal de Schlemm, estos tejidos mantienen contacto con el humor acuoso, y se ha determinado que ET-1 afecta la regulación de la PIO de forma autocrina y paracrina (Fernandez-Durango et al., 2003). Sobre el tejido TM, ET-1 induce contracción y en consecuencia la disminución de la salida de HA aumentando el valor de la PIO (Lepple-Wienhues et al., 1991; Thieme et al., 2006a; Wiederholt et al., 1995).

En células TM bovinas ambos receptores coexisten, pero son los ET-AR los que median la contractibilidad del tejido por el estímulo con ET-1 (Choritz et al., 2005). No está clara la función de los receptores B en TM. En células TM humanas, sólo ET-1 (no otras endotelinas como ET-3), estimulan la actividad de la fosfolipasa C (PLC) y de la guanylin ciclase (cGMP) vía el receptor ET-AR, de manera dependiente de la dosis (Haque et al., 1998). Se desconoce si ET-1 actúa de forma autocrina o paracrina en este tejido. Estudios recientes, en células TM bovinas, muestran cómo Bk y ET-1 contraen la célula en apenas unos minutos.

### **Canales iónicos en las células trabeculares**

Los canales iónicos son parte del mecanismo de activación y regulación implicados en la mayoría de las funciones celulares. La apertura de un canal y las variaciones eléctricas que esto comporta además de los cambios químicos que se suceden por el tipo de ión que se mueve a través del canal, son decisivos para el normal funcionamiento de la célula.

En la red trabecular se ha reportado la presencia de muy diversas proteínas de canal y se ha visto su funcionalidad.

Veamos algunos de los tipos de canales mejor estudiados hasta el momento en células trabeculares:

### Canal de alta conductancia de potasio dependiente de $Ca^{2+}$ (**maxiK o BK<sub>Ca</sub>**)

Los maxi-K o canales de  $K^+$  activados por calcio de alta conductancia dependientes de calcio (BK<sub>Ca</sub>), se distribuyen abundantemente en las membranas de las células de tejidos de músculo liso (Nelson and Quayle, 1995; Torphy, 1994) y son una diana típica para drogas relajantes del músculo. Moléculas como el óxido nítrico (NO) que actúa sobre la guanilato ciclasa produciendo cGMP, que fosforila el canal incrementando la probabilidad de apertura de los BK<sub>Ca</sub> (Nelson and Quayle, 1995). El eflujo de  $K^+$  implican repolarización y cierre de canales de calcio de voltaje, activados en procesos de contracción. Los BK<sub>Ca</sub> funcionan entonces, como reguladores de la contracción, relajando el tejido.

Existen canales de  $K^+$  activados por calcio de alta conductancia dependientes de calcio en todos los estratos del tejido trabecular, desde la zona yuxtacáncular hasta las capas más densas, cercanas a la pared interna del canal de Schlemm. Éstos canales regulan, entre otras, la mecánica de 'stretch' en el tejido (Wiederholt et al., 2000b). Aplicación de tensión en la membrana celular (aplicando succión), emulando aumentos en la presión intraocular, modulaba la probabilidad de apertura de estos canales. Experimentos en 'cell-attached' o 'inside-out patch' mostraron que la probabilidad de apertura de los BK<sub>Ca</sub> aumentaba de forma dependiente de la presión ejercida, fenómeno reversible cuando se dejaba de aplicar presión. En células TM, la apertura de canales los BK<sub>Ca</sub> no es exclusivamente dependiente del incremento de  $Ca^{2+}$ , sino que el 'stretch' es un mecanismo de activación por si mismo (Gasull et al., 2003).

La descarga de NO y la relación NO/cGMP permite la activación de BK<sub>Ca</sub> en los tejidos trabecular y músculo ciliar (Wiederholt et al., 1994b).

Estudios electrofisiológicos (Stumpff et al., 1997) muestran que estos canales son muy similares para trabeculares bovinas y humanas. Y para ambos casos, dependían de  $Ca^{2+}$  intracelular, del voltaje de membrana y eran altamente selectivos para el potasio. Pero además, otras pruebas farmacológicas usando bloqueadores específicos (*charybdotoxina*) también resultaron significativas, se trataba de los canales maxi-K descritos anteriormente en muchos otros tejidos de músculo liso. La salida de  $K^+$  lleva a la hiperpolarización y este efecto a la activación de otros canales, como los canales de calcio dependientes de voltaje, aunque en células no excitables como las trabeculares, la hiperpolarización podría tener otros efectos, por ejemplo el estímulo de la entrada de calcio por canales no-selectivos.

Las células TM poseen mecanismos reguladores de la disminución de volumen (RVD) tras sufrir incrementos de volumen elevados (superiores al 10-20% de su volumen en reposo) y prolongados en el tiempo (Mitchell et al., 2002). Se sabe que cambios en el volumen celular determinan variaciones en la facilidad de drenaje del HA. Aumentos en el volumen celular dificultan la circulación del HA a través del tejido y a la inversa. Se ha determinado que durante los cambios de osmolaridad, en un medio hiposmótico, al proceso de 'swelling' o hinchamiento de la célula le sigue la descarga de ATP que estimula los receptores purinérgicos P2Y, y éstos a su vez, inducen la apertura de canales de  $K^+$  y  $Cl^-$  y la salida de agua, así la célula recupera su volumen

en reposo. Estos son algunos de los procesos del mecanismo de RVD. En células TM, el proceso de 'swelling' activa corrientes de  $K^+$  de tipo  $BK_{Ca}$  y de  $Cl^-$ , las  $Cl^-_{swell}$  modulan y activan el proceso. El ATP extracelular potencia el eflujo de  $K^+$  que desactiva los canales de  $Cl^-$ , al parecer, como mecanismo regulador (Soto et al., 2004).

La activación de los canales  $BK_{Ca}$  puede venir dada por el incremento en el  $Ca^{2+}$  intracelular, o por factores endógenos de la célula como el sistema NO/cGMP pueden ser también activadores de estos canales y modular la permeabilidad del tejido.

### Canales de calcio tipo L-dependientes de voltaje (*voltage-operated calcium channels, VOCC*)

Canales de calcio voltaje dependientes tipo L como Cav1.2 y Cav1.3 se expresan habitualmente y en gran número en células de músculo esquelético y cardíaco, fundamentalmente. Son hoy, el 'target' principal de multitud de fármacos dirigidos a la cura de enfermedades cardiovasculares. Estas 2 isoformas son también comunes en sistemas neuronales y neuroendocrinos, en el cerebro estos canales funcionan para la diferenciación neuronal, la plasticidad sináptica, en la generación de potenciales de acción y secreción de hormonas. No obstante, en otros tipos celulares también se ha probado recientemente su presencia, aunque no queda clara su función, por ejemplo en células cromafines.

Los VOCC son la vía de entrada más importante de  $Ca^{2+}$  en células de músculo liso en vasos sanguíneos y arteriolas de la circulación cerebral, están implicados pues en el estado contráctil de la célula y también en la regulación de la expresión genética (Hill et al., 2001). No obstante, en estos tejidos aparecían corrientes de  $Ca^{2+}$  resistentes a los bloqueantes de los VOCC, de forma que se postulaban la existencia de otros canales de  $Ca^{2+}$  en células de músculo liso vascular (Edwards et al., 1990).

En TM, se ha postulado la presencia de VOCCs, pero aún no está determinado. Se encontró que tras la depolarización de células trabeculares en presencia de 10 mM de  $Ba^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ , aparecían corrientes de entrada a potenciales positivos hasta -30 mV, con una forma parecida a la de canales de  $Ca^{2+}$  tipo L; la nifedipina (bloqueante de los canales L), inhibía esas corrientes de entrada y una agonista conocida para estos mismos canales, BayK8644, en cambio, las aumentaba (Edwards et al., 1990). En este mismo trabajo, se investiga la relación entre agonistas muscarínicos, carbacol y acetilcolina, y las corrientes L. Anteriormente, se había observado que éstas incrementaban el  $Ca^{2+}$  intracelular (Shade et al., 1996) y que contraían las tiras de TM (Wiederholt et al., 1996) y que este efecto contráctil podía ser parcialmente inhibido por nifedipina (Wiederholt, 1998a) sugiriendo el papel directo de los canales L, en la contracción del tejido. Se postula también, que a su activación le sigue la de los canales  $BK_{Ca}$  que hiperpolarizan a la célula e inactivan a los canales tipo L, disminuyendo el contenido de  $Ca^{2+}$  citosólico, de forma que el tejido pueda relajarse (Stumpff et al., 1997).

Todos estos datos apuntan a la presencia de este tipo de canal iónico, en trabeculares, y nuevamente, sugieren el comportamiento de este tejido como el de un tejido similar al de músculo liso. A la vez, que se mantiene la idea que es precisamente esta capacidad de modificar su contractibilidad una de las formas reguladoras más importante que utiliza TM para la función de drenaje.

### Canales de potasio rectificadores de entrada (*Kir 2.1*)

Los Kir son una familia de canales de potasio rectificadores de entrada. Conducen K<sup>+</sup> a potenciales negativos al de equilibrio del K<sup>+</sup> y permiten corrientes pequeñas de salida a potenciales más positivos al potencial de equilibrio. Participan en el mantenimiento del potencial de membrana de la célula. Descritos en diferentes tipos celulares, estos canales están siempre ligados al transporte de K<sup>+</sup> y a la excitabilidad de la célula. Las diferencias entre miembros de esta familia, son por ejemplo, la diferencia en las magnitudes de la rectificación de entrada, en las conductancias single-channel y en los nucleótidos y segundos mensajeros intracelulares que puedan modificar su actividad.

Mediante la técnica de western-blot en células trabeculares bovinas y humanas aparecen las proteínas del canal Kir 2.1 (Llobet et al., 2001).

Se observaron corrientes rectificadoras de entrada de K<sup>+</sup>, con las características típicas para Kir2.x, fuerte rectificación, activación rápida y a potenciales muy negativos se detectaba la pequeña inactivación. También, mostraban cierta sensibilidad de bloqueo para los iones de Cs<sup>+</sup> y Ba<sup>2+</sup> extracelulares. La aplicación de Ba<sup>2+</sup> además inducía depolarización de la membrana. El canal Kir 2.1 en BTMs era sensible al incremento de cAMP intracelular. El análogo 8-Br-cAMP supuso la disminución de la corriente Kir en un 50%.

En estudios de perfusión de segmento anterior bovino y humano, se ha visto que el incremento de cAMP induce el aumento de flujo de evacuación. El canal podría entonces estar funcionando para mantener el gradiente iónico a través de la membrana celular (Erickson-Lamy and Nathanson, 1992; Gilabert et al., 1997).

En conjunto, estos resultados sugerían la presencia funcional de canales de tipo Kir 2.1 en células trabeculares bovinas y humanas.

### Canales de cloruro de la familia ClC y canales de 'swelling'

Los canales de cloruro dependientes de voltaje de la membrana plasmática, juegan un papel crucial en procesos que regulan el volumen celular, la homeostasis iónica (potencial de membrana) y el transporte transepitelial (Jentsch et al., 2005). Esta familia de canales que permiten la difusión de cargas negativas, está ampliamente reconocida y caracterizada a nivel molecular.

En células HTM cells, de los 7 miembros de la familia de ClC, sólo son abundantes: ClC-2 y ClC-3, dos veces más que ClC-6 y 7 y 4 veces superior que para el contenido de ClC-4 y 5. ClC-1 es específico para músculo esquelético y no se encuentra en células trabeculares. La transcripción de los genes para CLCN2 incrementaba significativamente después de aplicar periodos cortos de presión (unos minutos). En cambio, se ha visto que para tiempos largos, durante días, la transcripción es mayor para CLCN3, de hecho, no existían cambios significativos para CLCN2. En el primer caso, parece pues que la activación es un mecanismo fisiológico, en el último caso, se sugiere la posibilidad de que CLCN3 pueda intervenir con prioridad en situaciones

patológicas. En cambio, para tratamientos con dexametasona la expresión para ClC-3 disminuye (Comes et al., 2005).

Las corrientes de ClC-2 son rectificadoras de entrada, bloqueadas por  $\text{Cd}^{2+}$  (no específico) (Fritsch and Edelman, 1996) y muestran una activación exponencial característica, muy marcada en los potenciales hiperpolarizantes. Estas y otras propiedades como las de la permeabilidad aniónica para ClC-2 ( $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$ ) son similares en los diferentes tipos celulares estudiados. En células TM, se observan estas características y además, la regulación del canal por cambios en el pH extracelular pero no su papel sobre la regulación del volumen celular (canales de swelling). La sensibilidad a pH del canal deriva de la protonación extracelular del residuo E217 que facilita su activación, previa hiperpolarización (Niemeyer et al., 2003).

Por otra parte, el 8Br-cAMP (análogo de cAMP) incrementa las corrientes ClC-2 en TM y se sabe que la vía cAMP-PKA está implicada en la regulación de estos canales en otros tipos celulares (Cuppoletti et al., 2004) y también, funcionalmente, sobre el incremento de evacuación del flujo de humor acuoso en TM (Gilabert et al., 1997) o en la regulación de la apertura de los canales Kir.

Pero además, ClC-2 podrían estar funcionando en la regulación de la concentración de  $\text{Cl}^-$  en la célula, permitiendo su eflujo cuando su contenido es excesivo, trabajando en colaboración con los cotransportadores  $\text{Na}/\text{K}/2\text{Cl}$ , tarea fundamental para el transporte transepitelial (Jentsch et al., 2005; Llobet et al., 2001).

Sobre los canales  $\text{Cl}_{\text{swelling}}$  sabemos que están presentes en células TM, son canales de cloruro dependientes de voltaje que se encuentran en la membrana celular (Mitchell et al., 2002). Estas corrientes, bloqueadas por tamoxifen o DIDS, se caracterizan además por ser rectificadoras de salida y su actividad decae con el tiempo a voltajes depolarizantes. En células TM, las corrientes  $\text{Cl}_{\text{swell}}$  se activan junto con los canales de potasio  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , para mediar en el proceso de recuperación de volumen celular en situaciones de hipotonicidad severa del medio (disminución reguladora del volumen, RVD). Estos mecanismos iónicos y su papel en la regulación del volumen celular son esenciales en el mantenimiento y regulación de la función evacuadora del tejido TM (Comes et al., 2006).

## Canales de agua (AQP<sub>s</sub>)

Las Aquaporinas (AQPs) son una familia de proteínas encargadas del transporte de agua. Expresadas principalmente en epitelio y endotelio mamífero. Las células epiteliales muestran una permeabilidad osmótica a menudo muy grande comparado con lo que se podría esperar de simple difusión de agua a través de la membrana celular. La hipótesis de ciertos poros o canales de agua, era una idea plausible, pero que necesitaba demostrarse, hallar y aislar esas formaciones porosas para conocer su estructura y funcionalidad. En 1992, se halló un canal propiamente de agua, bidireccional (en función del gradiente osmótico). Eran las aquaporinas, capaces de dejar paso a billones de moléculas de agua por segundo.

En ojo se expresan al menos 5 proteínas de una familia de 10 homólogas, que forman canales de agua para facilitar su transporte a través de barreras membranosas. Estos canales, se agrupan en tetrámeros, cada subunidad contiene un poro individual para agua, formado por seis dominios heliocoidales transmembrana. Las AQPs 1, 2, 4, 5 y 8 son transportadores de agua de forma selectiva, las 3, 7, 9 y 10 pueden transportar pequeños solutos (glicerol). En cualquier caso, todos estos canales son impermeables a especies cargadas (ej protones).

La llamada AQPO o proteína intrínseca mayor (MIP) es bien conocida porqué sus mutaciones se asocian con las cataratas en humanos. En los tejidos secretores del epitelio ciliar, donde es crucial el fenómeno del transporte de soluciones y en definitiva, lugar de formación del humor acuoso, hallamos a la AQP1. En la conjuntiva encontramos las AQP3 y AQP4 en el epitelio ciliar y retina. AQP5 se halla en córnea y epitelio de la glándula lacrimal. Se ha visto que en ratones transgénicos de fenotipo ocular, a los que les falta ciertas expresiones de AQPs aparecen efectos en la transparencia corneal (Berry et al., 2000; Verkman, 2003).

En la zona endotelial de la red trabecular (TM) humana encontramos AQP1 (la forma más abundante en ojo). Estos canales de agua determinan el volumen intracelular basal de la célula y también la permeabilidad paracelular, el transporte de agua y los cambios en el volumen de la célula trabecular son factores que influyen en la capacidad de drenaje y en el valor de la PIO, en definitiva. De esta forma, su presencia muy extendida en ojo y de los resultado de varios estudios *in vitro* se concluye que pueden ser importantes dianas farmacológicas para terapias antiglaucoma (Stamer et al., 2001b).

## Bombas e intercambiadores (Ca<sup>2+</sup>- ATPasa)

En células trabeculares hallamos diferentes bombas y proteínas transportadoras de membrana. La bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa se determinó usando ouabaína, despolarizando la membrana (Coroneo et al., 1991). Intercambiadores como el de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Chu et al., 1992) o el K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>, relacionados ambos con la regulación de volumen celular (Mitchell et al., 2002). Y el sistema cotransportador Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> (HTM y BTM) dependiente de cloro, también interviene en los cambios de volumen.

Las bombas dedicadas al Ca<sup>2+</sup> que recaptan o expulsan al ión de la célula, o en flujos intracelulares de los depósitos al citosol tienen una función clave y fundamental

porqué es insustituible. Los gradientes de calcio en los diferentes compartimentos de la célula, son elevados, y la peligrosidad y versatilidad de este ión no permite rangos amplios para su circulación, las bombas forman parte de la compleja maquinaria en red que controla la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$ .

La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) es una bomba de extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol hacia el exterior de la célula. Es una enzima de la familia tipo-P (o tipo E1-E2) ATPases, está presente en todas las células eucariotas y es clave en la regulación de la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Su estructura se forma de 10 segmentos transmembrana con los 2 terminales C y N en el interior de la célula. El término C contiene la cola de más de 100 aminoácidos de longitud, probablemente responsable de la regulación de la bomba.

Funciona de forma continua y puede ser estimulada con etanol y calmodulina (CaM) y también con el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, puesto que por encima de valores basales, se promueve intensamente su funcionamiento. En la membrana plasmática también hay un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) que aprovecha la energía cedida por iones  $\text{Na}^+$  al entrar en el citosol a favor de su gradiente electroquímico. Opera junto a la PMCA para extraer  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula.

La PMCA obtiene su energía de la hidrólisis de ATP, por cada una de estas moléculas se extraen 2 iones calcio, pero a un ritmo no tan alto como el que puede asumir el transportador NCX, aunque la bomba tiene mayor afinidad por el ión ( $K_m$  de 100 a 200 nM). La bomba es la encargada de mantener el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico muy bajo. Otro elemento importante en la regulación de la PMCA es el enlace  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, que actúa en ésta incrementando su afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  y su ritmo de funcionamiento en más de 10 veces.

La bomba sarco/endodoplasmática  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (SERCA) localizada en la membrana del retículo (endoplasmático, ER o sarcoplásmico, SR) tiene una estructura similar a la PMCA y transfiere iones  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol al lumen de ER, mediante la hidrólisis de ATP. Inhibida por tapsigargina, tiene asociada la proteína, *calsequestrin*, que desde el interior del ER se enlaza con iones libres de calcio y así ayuda a la SERCA en su labor contra gradiente (en el interior del retículo se guarda 10.000 veces la concentración citosólica) dado que disminuye el  $\text{Ca}^{2+}$  en el ER y por lo tanto, la diferencia electroquímica. Tapsigargina y el compuesto ácido ciclopiazónico (CPA) inhiben de forma específica a estas ATPasas.

### Canales de calcio activados por la descarga de $\text{Ca}^{2+}$ (*store-operated calcium channels, SOCC*)

El fenómeno de la descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular al citosol suele ir acompañado de un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior. Es la conocida como entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa (CCE) o dependiente de los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares (*store-operated calcium entry, SOCE*). Es decir, debido a un estímulo, del lumen del retículo endoplasmático (ER) se descarga  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol, este fenómeno en sí, o el estado de 'vaciamiento' del retículo de algún modo, activa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, una corriente de entrada, por vías no dependientes de voltaje. La evidencia de que un fenómeno seguía al otro, y que tenían relación directa, no fue publicada hasta finales de los años 80, en un review: 'A model for receptor regulated

calcium entry' de Putney JW Jr, publicado en *Cell Calcium*, 1986 Feb; 7(1):1-12, donde se hablaba prácticamente, por primera vez, de la naturaleza 'bifásica' de la señal de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activada por agonista: "The biphasic nature of agonist-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilization is thus seen as an initial emptying of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pool by inositol (1,4,5) trisphosphate, followed by rapid entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into the pool and, in the continued presence of inositol (1,4,5) trisphosphate, into the cytosol". En estos últimos 20 años, estudios diversos en distintos tipos celulares han permitido que el inmenso puzzle de datos fuera dibujando un esquema sobre las posibles identidades y mecanismos de activación de la SOCE; aunque en realidad, tenemos tan sólo un esbozo porque la complejidad y diversidad del tema, aún hoy, deja muchos cabos abiertos. Se trata de un conjunto de corrientes, con diversas características farmacológicas y electrofisiológicas, y tienen en común que son catiónicas y dependientes del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  los depósitos intracelulares (fundamentalmente, el retículo endoplasmático, ER). Sus conductancias son muy bajas, el registro en 'cell-attached' no es práctico ya que no se registra actividad 'single-channel', la selectividad es variable también, unos registros muestran corrientes altamente selectivas al  $\text{Ca}^{2+}$  pero en otros casos, dependiendo del tipo celular, o de la forma de vaciar el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  (por agonista o mediante formas 'pasivas' que no incluyen segundos mensajeros o vías de señalización alternativas).

Sobre estas corrientes se sabe que algunas son no-selectivas y otras altamente selectivas para el  $\text{Ca}^{2+}$ , así la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por la descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (*calcium-release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  current*, CRAC), que abreviamos como Icrac es la primera y mejor estudiada del grupo de corrientes SOC, su activación no es dependiente de voltaje, estos canales no se abren por depolarización como los canales Cav (dependientes de voltaje). Muestra una relación corriente-voltaje fuertemente rectificadora de entrada y es prácticamente cero a potenciales positivos. La rectificación es muy marcada en parte debido a las condiciones del protocolo clásico usado para determinar y maximizar la presencia de este tipo de corriente, por ejemplo, se eleva la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a 10 mM mientras en que en el interior de la célula son decenas de nM y por otra parte, el protocolo de voltaje es en forma de rampa de -100 a +100 mV. Con un conductancia de menos de 1 a 10 pS, un valor inusualmente bajo, en el rango de los femtosiemens, este dato se obtiene de forma indirecta por análisis de ruido; ésta es una característica muy específica de esta corriente.

Las curva de rectificación y su comportamiento independiente de voltaje no son cualidades únicas de las CRAC, otros canales selectivos para  $\text{Ca}^{2+}$  también las comparten, como TRPV5 y TRPV6 (y no son canales de tipo SOC).

Las corrientes CRAC, se activan por el vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  del ER, bien por mecanismos pasivos, con quelantes en el citosol, tipo BAPTA-AM, que impiden la recuperación de  $\text{Ca}^{2+}$  que se pierde normalmente por los canales de leak del retículo, o mediante la aplicación externa de taspigargina o ácido ciclopiazónico (bloqueantes ambos de la bomba de recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  del ER, la llamada bomba sarcoendoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$ , SERCA) o por mecanismos activos como la aplicación de  $\text{IP}_3$ , mediante la diálisis de la molécula, o por estímulo de receptores que produzcan señalización para  $\text{IP}_3$ .

Esta corriente es altamente selectiva para el  $\text{Ca}^{2+}$  ( $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} >1000$ ) y con una relación corriente versus voltaje fuertemente rectificadora de entrada, con un potencial de

reversión positivo, por encima de 50 mV. Otra particularidad definitoria de las CRAC es que pueden conducir iones monovalentes en ausencia de cationes externos divalentes (fracción mol anómala) ( $P_{Na} > P_{Cs}$ ) que no obstante es rápidamente desactivada (apenas unas pocas decenas de segundos) (Cahalan et al., 2007; Hogan and Rao, 2007). La corriente monovalente de hecho es mayor que la corriente de  $Ca^{2+}$ . Farmacológicamente, hay diversidad de bloqueadores para esta corriente pero que no son específicos, se reconoce la inhibición de las CRAC por lantánidos  $La^{3+}$  y  $Gd^{3+}$  y otros, el SKF96365 o el 2-aminoetoxi difenilborato (2-APB). Éste último fue uno de los primeros bloqueadores reconocidos, aunque inicialmente se conocía a esta sustancia por su capacidad de inhibición de los receptores de  $IP_3$  tras permear en la célula. Pero además, el 2-APB a baja concentración, inferior a 50  $\mu M$ , puede actuar como activador o potenciador de las CRAC.

El incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular proveniente de la descarga del ER dura apenas unos pocos segundos, y la SOCE que se activa rápidamente apenas unos segundos tras el pico de  $Ca^{2+}$  inicial y puede prolongarse unos minutos. Una de las funciones primeramente asignadas para la SOCE es la de recuperación del contenido basal del retículo tras la descarga estimulada, puesto que el calcio almacenado puede no haberse recuperado a pesar de las bombas recuperadoras de  $Ca^{2+}$  siempre activas en la membrana del retículo (SERCA), debido a la extrusión de  $Ca^{2+}$  al exterior de la célula, por la bomba Ca-ATPasa, en la membrana celular o al 'buffering' de otros orgánulos. Por tanto, una función principal para esta corriente es de homeostasis del calcio.

Otra función en la que interviene la SOCE es en la del mantenimiento de concentraciones de  $Ca^{2+}$  citosólico por encima del basal, a tiempos largos, cuando ya la recuperación de los depósitos puede haberse normalizado. Este efecto forma parte de los patrones de señalización del  $Ca^{2+}$ , que tiene consecuencias diversas según el tipo celular (Berridge et al., 2000). Es una señal continua necesaria, por ejemplo, para mantener el tono contráctil del músculo liso: los estudios en células vasculares de músculo liso revelan la presencia de este tipo de corriente y han sido determinantes para corroborar el papel que juegan en la función muscular (Pfitzer, 2001; Stevens, 2001). En miocitos humanos de arterias pulmonares, las corrientes SOC están implicadas, también, en funciones de proliferación y crecimiento celular (Golovina et al., 2001).

Se han identificado corrientes SOC en las células del endotelio vascular y su función en la homeostasis de la permeabilidad de la capa (Wu et al., 2005).

Especialmente, en células no excitables, la entrada SOC, regula la secreción, la exocitosis y el crecimiento celular (Artalejo et al., 1998; Labelle et al., 2007; Shuttleworth, 1997).

Una tercera función observada es la que relaciona la entrada de  $Ca^{2+}$  de tipo SOC con la señalización de transitorios de  $Ca^{2+}$  oscilatorios. Existe una coordinación entre el pico de calcio por la descarga intracelular y la activación de los SOC, para de esta forma recuperar el nivel de  $Ca^{2+}$  intracelular en el retículo y poder 'disparar' otro transitorio (Bird and Putney, Jr., 2005; Thomas et al., 1996). Esta corriente pues, juega un papel crítico en el mantenimiento de la señal oscilatoria pero además, curiosamente, en este caso parece producirse de forma localizada, es decir, el

estímulo de  $\text{Ca}^{2+}$  entrante, llega a un lugar o compartimento intracelular concreto sin pasar por zonas comunes citosólicas (Putney and Bird, 2008).

En los siguientes años han aparecido multitud de trabajos aportando nuevos datos, en distintos tipos celulares en los que se detectaban estas corrientes, células de músculo esquelético, liso, endotelio vascular y sistema nervioso. Y las conclusiones de estos estudios, sobre los agonistas que fisiológicamente pueden activar estas corrientes apuntan a aquellas que activan receptores acoplados a proteínas-GTP que activan a la PLC-beta o bien, receptores acoplados a tirosina, que en estado de fosforilación puede activar a la PLC-gamma, de forma que en cualquier caso la cascada de señalización lleva a la producción de  $\text{IP}_3$ , que desencadena la apertura de los canales/receptor  $\text{IP}_3\text{R}$  en la membrana del retículo produciéndose la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol de forma pasiva y transitoria, con la consiguiente activación de los SOCC (Parekh and Penner, 1997b).

Pero la caracterización de estas corrientes viene siendo una tarea complicada, un árduo camino, no es sencillo el aislamiento de estas corrientes (de apenas unos pocos pA/pF y muy baja conductancia) ni tampoco identificar las proteínas asociadas, ni el mecanismo de activación que actúa, se ha recopilado información diversa, y el rompecabezas, justo ahora parece empezar a resolverse con la identificación de proteínas clave para las Icrac, hablamos de  $\text{STIM}_1$  (sensor del estado de  $\text{Ca}^{2+}$  del ER) y  $\text{Orai}_1$  (subunidad filtrante del poro del canal, en membrana (Yeromin et al., 2006). Las corrientes SOC no selectivas se relacionan, en cambio, con la superfamilia de canales TRPs. Éstos, agrupados de forma heteromérica podrían formar canales catiónicos no-selectivos (permeables a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ). Además, ninguna de las subunidades TRP poseen un sensor de voltaje (a diferencia de los Cav). Específicamente, la subfamilia TRPC (TRP canónicos) se activa por receptores acoplados a proteína G y receptores tirosina quinasa, en ambos casos ligados a la hidrólisis de fosfoinositoles vía fosfolipasa C (PLC) y son buenos candidatos para las corrientes SOC (Pedersen et al., 2005).

Numerosos estudios hablan ya de la relación entre la disfunción de la actividad de estos canales y ciertas enfermedades (Hopf et al., 1996; Putney, Jr., 2003).

## **Matriz extracelular (ECM)**

Vemos que las células trabeculares es una población heterogénea y ninguno de los subtipos trabeculares parecen tener una naturaleza específica, no son células musculares pero algunas tienen propiedades contráctiles que las asemejan al tipo de músculo liso, no son endoteliales pero algunas forman prácticamente un endotelio. En cambio, la red trabecular sí es un tejido específico, filtra y ofrece resistencia, al paso del flujo de HA resistencia que además es autoregurable. Y esto es posible, gracias a la organización y estructura en 3-D de las células y de la matriz extracelular, que no es un mero anclaje para las células, sino que también interviene decisivamente en estructura y función del tejido.

Al igual que distinguimos diferentes capas celulares en el tejido, la ECM en cada una de esas zonas es también distinta. En general, la composición de esta matriz es común a la de otros tejidos. En las capas más cercanas a la cámara anterior (capa uveal) los haces de células se forman en monocapas sobre membranas basales

(lámina rara y lámina densa) y en el interior del haz, cubierta por la lámina, está la matriz, que contiene colágenos intersticiales, tipo I y III, también V y VI (Marshall et al., 1991). Se forman placas de célula y matriz de forma plana dejando orificios y canales por los que se mueve el flujo. Es una organización que ofrece menor resistencia que la estructura de la capa yuxtacanicular (YCT), donde la cantidad de matriz es superior, y no hay un orden de haces como en la capa uveal. La matriz junto con las células, que siguen adheridas a membranas basales, forman nuevamente haces, pero ya no aplanados, y entre los cuales el espacio libre para que fluya el HA es menor. Colágenos de tipo V y VI que intersectan con fibrilos elásticos. Justo en el centro de los haces se concentran fibras elásticas, fibrilos de colágeno y material derivado de la funda de los microfibrilos (Lutjen-Drecoll and Rohen, 1981; Lutjen-Drecoll et al., 1986). El material ECM alrededor de los haces se esparce amorfo entre las capas de la zona JCT o cribiforme (Tripathi, 1971).

Gracias a las técnicas de tinción microscópica (ej. hematoxilina-eosina) y a la microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB) se han identificado además del material de fibras, fibrilos y colágenos distintos, también la presencia de glicosaminoglicanos (GAGs), que son cadenas con alta densidad de grupos sulfatos y carboxilos negativos en pH fisiológico, lo cual hace sospechar que estos compuestos podrían estar implicados especialmente, en la resistencia del tejido al flujo. En relación a esto, se conoce desde hace muchos años que enzimas que degradan selectivamente GAGs disminuyen la resistencia al flujo del HA casi un 50% en ensayos de perfusión de segmento anterior de ojo bovino (BARANY and SCOTCHBROOK, 1954).

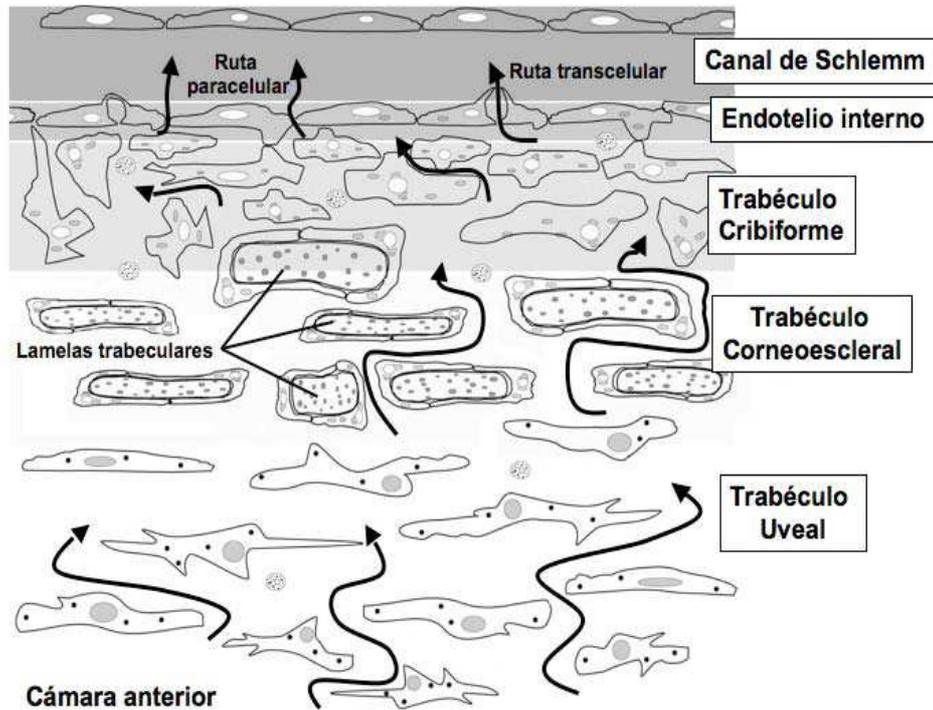
Observando la morfología celular y de la ECM en las distintas capas, se diría que es en la zona uveal, por donde hay orden en la disposición de los haces de células y ECM, y los espacios libres son abundantes, la misión principal de las trabeculares sería la de fagocitar detritus y ‘aligerar’ el HA, para ser filtrado convenientemente en la segunda etapa, en la cual, el tejido es denso, menos permeable.

#### 1.c.2 CITOESQUELETO DE ACTINA/RHO QUINASA Y PROPIEDADES CONTRÁCTILES DE LA MALLA TRABECULAR.

### **Citoesqueleto y contracción celular en la regulación de la evacuación del HA**

Estudios recientes como el de Ram Avtar y Rashmi Srivastava (*Modelling aqueous humor outflow through trabecular meshwork*, Applied Mathematics and Computation 189 (2007) 734–745) permiten un modelo de evacuación detallado a través de la red trabecular porque tiene en cuenta su estructura mixta (pared interna del endotelio del canal de Schlemm y la zona yuxtacanicular). Sorprendentemente, el lugar de resistencia a la evacuación del HA, aún no se conoce con exactitud. Gracias al avance en las técnicas de observación de la malla trabecular en ojos glaucomatosos se ha podido recopilar información sobre los cambios histológicos asociados, pero el foco original de la resistencia o de las alteraciones del tejido no está claro aún. Como ya se ha comentado, las técnicas que pretenden determinar la estructura de la malla trabecular son críticamente invasivas. A pesar de esto, el análisis del corte de tejido

analizado por micrografía de transmisión electrónica (MET) aporta una información clave, puesto que permite distinguir, por ejemplo, el endotelio de la pared del canal de Schlemm de la zona del tejido conectivo yuxtacanicular. Se consiguen ver las vacuolas que se sabe son un mecanismo más para el transporte transcelular del HA a través del endotelio hacia el canal de Schlemm (Johnson et al., 1992; Johnson, 2006).



**Figura 12.** El flujo de HA es drenado a través de la red trabecular, primero a través de la zona uveal, con mayor espacio entre haces de células y prosigue su camino hacia la capa corneoescleral donde las células trabeculares se abrazan a las lamelas trabeculares, haces de matriz extracelular, a modo de ‘pilares’. Hasta llegar a la capa cribiforme, de tipo endotelial, donde la densidad de células es muy superior y la resistencia del tejido crece significativamente. El HA cruza la última barrera, la pared interna del canal de Schlemm (SC), un endotelio muy especial; el flujo atraviesa caminos intercelulares (poros) y transcelulares (formación de ‘vacuolas gigantes’). Dibujo extraído de (Llobet et al., 2003).

Citoesqueleto y propiedades contráctiles de las células TM

La principal fuente de resistencia a la evacuación del ojo, del flujo de HA es la red trabecular, tanto en ojos sanos como en los glaucomatosos (excepto en el tipo de ángulo cerrado). También se sabe que es en este punto en el que se decide fundamentalmente la PIO. Pero especialmente la resistencia del tejido aparece en las capas más cercanas al endotelio del canal de Schlemm, es decir, la capa cribiforme de la red trabecular y la pared interna del endotelio de Schlemm.

Hemos comentado cómo la permeabilidad de la red trabecular es altamente susceptible a cambios que puedan darse en su forma y arquitectura o cambios del volumen celular y en general, cambios fisiológico-químicos debido de los sistemas autoreguladores de la célula. Uno de los secretos mejor guardados de las células trabeculares y sus vecinas del endotelio de SC, es su adaptabilidad a los ‘entornos difíciles’. La constante fricción del fluido y la necesidad de ofrecer resistencia a su

paso, ha hecho que las células trabeculares sean especialistas en elasticidad. Estas células del tejido más tupido de la red trabecular permiten el paso trans-celular o para-celular de HA a través de poros y a través de formaciones celulares bulbares, a modo de distensiones, o casi hernias de la célula, que recogen fluido y lo pasan al canal de evacuación. Estas formaciones creadas por gradiente de presión aparecen desde la base de la célula y se dirigen a la zona opuesta, a través de la célula, donde aparecen como un balón lleno de líquido. Son las llamadas ‘vacuolas gigantes’. Se pensó que este fenómeno no era fisiológico, que podía indicar, de hecho, el deterioro del tejido, y que era un mecanismo de urgencia cuando los valores de la PIO eran muy elevados y se habló también de ‘artefactos’ debidos a las técnicas, aún demasiado agresivas, de fijación de tejido. Hoy se habla de las vacuolas gigantes como procesos propios de la mecánica celular de la red trabecular. Estas formaciones son realmente excepcionales y dan cuenta de la importancia de la mecánica elástica de estas células puesto que son capaces de sufrir variaciones de ‘stretching’ como parte de un proceso fisiológico, casi 10 veces superiores al valor máximo que podría soportar la mayoría de tipos celulares.

La clave de estas capacidades tan sorprendentes, parece que la tiene el citoesqueleto de estas células. Paul Kaufman y su grupo junto con el Dr. Ethier han trabajado con latrunculina-B, en ojos de mono y humano; este agente causa como es sabido la rotura de los filamentos de F-actina en la célula. En humanos, los tejidos estudiados tras el tratamiento con latrunculina-B, mostraron algo revelador, el incremento muy potenciado del número de poros en las células del límite con el canal de Schlemm y de las formaciones de vacuolas gigantes.

Por microdissección del tejido y mediante técnicas de microscopía de escáneo por láser y escaneo confocal, se pudo observar el estado del citoesqueleto de las células trabeculares vecinas al canal de Schlemm, o células de la llamada pared interna de SC, reconociendo bandas bien marcadas de actina ordenadas de forma que estas células podían anclarse entre ellas fuertemente a la vez que por su organización permitían la distensión en el medio de la célula, por lo que tendría sentido el aumento de la flexibilidad que permite la formación de las vacuolas. A medida, que nos alejamos de la zona más endotelial, las células se ordenan suspendidas en una estructura de red tridimensional más porosa y puede ser menor la necesidad de elasticidad en estas capas no es tan prioritaria, aunque estos mismos cambios en la reorganización de citoesqueleto se veían también, por tratamiento con latrunculina, no era una respuesta unánime de la población celular.

El mismo estudio en tejidos de ojos enfermos por glaucoma, mostraron una organización del citoesqueleto muy distinta, con alto contenido de fibras entrecruzadas. Un patrón muy distinto al visto en tejido de ojo sano. Y además, una particularidad que sugiere que estas células son menos elásticas y más duras, menos capaces de soportar las deformaciones de las vacuolas y de mantener el tejido en buenas condiciones, sin que se rompan las uniones entre ellas.

La importancia del citoesqueleto de actina en la función de estas células es ahora ya una evidencia, y el desarrollo de nuevas terapias para la modificación o regulación del mismo, es ya una realidad muy potente y esperanzadora para el tratamiento del glaucoma (Ethier et al., 2004). Se ha comentado, previamente, el resultado de la aplicación de drogas como la latrunculina A o B y la citocalasina B que desensamblan citoesqueleto de actina principalmente y disminuyen la resistencia del tejido porque,

se sugiere, que lo distienden al destruir las interacciones cruzadas de los filamentos de actina, rompiendo la adhesión celular al sustrato y las uniones intercelulares.

Puede ser interesante comparar estas observaciones con resultados sobre reorganización del citoesqueleto en la permeabilidad de los endotelios vasculares. Y especialmente, la relación del citoesqueleto con la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula. Es sabido que drogas inflamatorias incrementan la permeabilidad de las capas endoteliales debido a la formación de gaps interendoteliales (Dudek and Garcia, 2001). Sustancias como la histamina, la trombina o la bradiquinina producen descargas de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares, la subsiguiente entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  vía 'store-operated' (SOC) y la activación de PKC. De esta forma se fosforila la quinasa de cadena ligera, la MLCK dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina promoviendo la interacción de actina y miosina por fosforilación de 20- kDa (MLC20) (Garcia et al., 1995). De esta forma, el citoesqueleto puede cambiar y por ejemplo modificar su organización y por lo tanto la forma y la dureza de la célula. La vía PKC interviene en la permeabilidad incrementándola por activación de mecanismos dependientes de cadherina (uniones VE-caherina) (Rabiet et al., 1996). En esta misma línea de investigación, sobre la respuesta a trombina en la función de la barrera endotelial, se vió que el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico por la exposición a TG tiene efectos similares de incremento en la permeabilidad en la línea celular, la ECV304 (transformada espontáneamente de células HUVEC, que exhiben propiedades endoteliales y epiteliales) (Sandoval et al., 2001). La vía activada es la de PKC-alfa y se forman discontinuidades de unión pero curiosamente no hay un aumento de la dureza celular o del número de fibras de actina. Cuando se trata del estímulo por agonista, los efectos de la trombina, por ejemplo, incluyen el aumento en las fibras de estrés y la participación de la red de microtúbulos, recientes estudios en plaquetas humanas, revelan que el tratamiento con colchicina reduce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por trombina.

El citoesqueleto de microtúbulos también juega un papel importante en el mantenimiento de interacciones entre estructuras internas celulares. Estudios hechos en células TM humanas, colchicina y vinblastina (depolimerizantes de microtúbulos) inducen contracción celular in vitro y el aumento de la facilidad de drenaje del tejido (Gills et al., 1998).

Como hemos visto anteriormente, en células TM, existe una población con propiedades contráctiles propias de músculo liso y que fármacos como la ET-1 o el Ch que incrementan la acción de la Rho/Rho quinasa (activada por proteína G) (Somlyo and Somlyo, 2000) inducen contracción y esta variación del estado contráctil del citoesqueleto: un aumento de la resistencia al paso del HA. Se ha sugerido que la vía activada por ET sea la de RhoA y ROCK y que es independiente  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (Renieri et al., 2008). Otros estudios, también muy recientes, muestran que un inhibidor de ROCK (Y-27632 (Y-27)) modifica la red del citoesqueleto de actina de tal forma que el espacio de conexión entre las capas JCT y la pared interna del canal de Schlemm aumenta (Lu et al., 2008) y esto facilita la evacuación de líquidos.

La inhibición de RhoA, Rho-GTPasa/ Rho quinasa se establece como una nueva línea de tratamiento del glaucoma, remarcando el papel protagonista del citoesqueleto de las células trabeculares en el mantenimiento de la función de drenaje del tejido.

Pero la importancia del citoesqueleto en células TM va más allá y se presenta como diana farmacológica potencial muy efectiva para el desarrollo de nuevas terapias antiglaucoma. En un estudio reciente, Profilina I (PfnI, proteína secuestradora de monómeros de actina) (Carlsson et al., 1977) unida a un dominio de transducción como PTD4 capaz de atravesar membranas biológicas, determinó el aumento de la capacidad de evacuación de la red trabecular en ensayos sobre el tejido, mediante experimentos de perfusión de segmento anterior bovino. La alteración del citoesqueleto de actina de la célula trabecular, puede llevar a modificaciones significativas en el conjunto de la fisiología del tejido (Gomez-Cabrero et al., 2005). En estudios posteriores, el ensayo de PfnI en cultivos primarios de células trabeculares bovinas revela que su efecto sobre el citoesqueleto es independiente de factores de crecimiento. Las células tratadas muestran una elevada capacidad para la formación de lamelipodios (prolongaciones de la membrana celular que sirven para generar movimientos de desplazamiento), el doble de células presentan lamelipodios versus los ensayos de control con factores de crecimiento (10% de FBS, inductor de lamelipodios clásico). Estos resultados apuntan a que la acción de la PfnI es directa sobre la dinámica del citoesqueleto, facilitando el enlace de actina-ATP y acelerando así, la actividad de la actina filamentosa (Syriani et al., 2008).

## **Efectos de la dexametasona en células trabeculares**

Una de las problemáticas más duras en la búsqueda de terapias contra el glaucoma, o para su cura, es que los fármacos utilizados suelen tener efectos paralelos no deseados o incluso en ciertos casos pueden derivar en disfunciones que empeoran el estado glaucomatoso del paciente. La Dexametasona (DEX) es un glucocorticoide sintético (hormonas esteroides) muy potente usado habitualmente en muchas terapias antiinflamatorias e inmunosupresoras. En ojo se utiliza en forma de gotas (uso tópico) como parte del tratamiento contra inflamaciones. Pero puede tener efectos adversos difíciles de controlar, incluso, DEX puede inducir glaucoma. Por todo ello, esta sustancia y sus efectos sobre la red trabecular ha sido estudiada ampliamente en los últimos años.

Hoy sabemos que DEX es capaz de regular un cierto número de genes en la TM humana. El gen de myocilina (MYOC/TIGR) es conocido por estar directamente relacionado con glaucomas primarios de ángulo abierto y se han identificado múltiples mutaciones (Alward et al., 1998). MYOC se halló como una proteína sobreexpresada en TM ligada al tratamiento con glucocorticoides como la DEX y se encontraba en el citoplasma de las trabeculares y en otros puntos del espacio extracelular (zona JCT de la matriz extracelular) (Nguyen et al., 1998; Ueda et al., 2000). MYOC aumentada podría estar actuando a través del incremento de cAMP, la actividad de PKA y la inhibición de RhoA, modificando el citoesqueleto de la célula trabecular (pérdida de fibras de estrés de actina y de adhesiones focales) y la composición de la matriz (Shen et al., 2008).

Otro gen sobreexpresado en células trabeculares en ciertos glaucomas de ángulo abierto es el TAGLN, también relacionado con el tratamiento con DEX (Leung et al., 2003). Este gen está implicado en la función de 'cross-linking' para actina y muy posiblemente tiene relación con la producción de redes de actina cruzada (*crosslinked actin networks*, CLANs). Este tipo de reorganización drástica del

citoesqueleto de F-actina implica que la célula sea más dura y esto de alguna forma incrementa la resistencia del tejido (Read et al., 2007).

La ECM en la red trabecular incluye elastina, fibrilina-1, glycoproteína-1 asociada a microfibrila, decorina y colágeno tipo VI. DEX es capaz de inducir mayor expresión para algunos componentes de la matriz (ej. fibronectina), de forma que se generan acumulaciones anormales de material matricial en el tejido en forma de placas de material derivado de membrana basal (Steely et al., 1992). Por otra parte, el exceso de acumulación de material es una característica común observada en la mayoría de glaucomas de ángulo abierto y como ya hemos comentado, es también una característica del tejido en pacientes de edad avanzada. Pero además, DEX puede inhibir la capacidad de fagocitosis de la célula de forma que impide el turnover de matriz y favorece la acumulación de detritus y pigmentos (Zhang et al., 2007b).

#### 1.d REGULACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR

##### **‘Life- giving’ signal: Ca<sup>2+</sup>**

En multitud de procesos celulares aparece el Ca<sup>2+</sup> como segundo mensajero clave en la transmisión de señales citoplasmáticas (Berridge et al., 1998). El Ca<sup>2+</sup> en una célula proviene de dos fuentes básicas, de los propios almacenes de calcio (retículo sarco/endoplasmático y de las mitocondrias) y calcio que entra desde el exterior celular y que pasa, pues, a través de la membrana plasmática por canales iónicos.

La naturaleza del Ca<sup>2+</sup> libre en el citosol está altamente regulada por la célula; en condiciones estables, mientras la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el exterior es de 1 mM, en el citosol, la concentración es unas 10.000 veces menor (50 a 100 nM) y 100 veces inferior al valor en el retículo y las mitocondrias, principales depósitos de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Este ión es tremendamente versátil, implicado en proliferación, crecimiento celular, expresión génica, exocitosis, en la señalización depolarizante para el disparo de potenciales de acción en neuronas y también, en la señal de apoptosis, en elevadas concentraciones y si son prolongadas en el tiempo, el Ca<sup>2+</sup> es tóxico. Tantas y tan distintas tareas sólo pueden realizarse con un claro patrón de señalización y un alto grado de compartimentalización. Las señales de Ca<sup>2+</sup> se distinguen por su amplitud (máximo de concentración), su duración en el tiempo (propiedades temporales) pero también por su localización (compartimentalización). Hay múltiples sitios de unión para el Ca<sup>2+</sup> en la célula, y sin un patrón definido, el Ca<sup>2+</sup> pondría en marcha multitud de cascadas de señalización sin orden ni concreción (Carafoli, 2004).

El calcio es poco soluble y si permaneciera libre en el citosol precipitaría rápidamente mezclado con fosfatos y ácidos orgánicos intracelulares. La membrana celular es impermeable al Ca<sup>2+</sup>. El gradiente electroquímico de este ión (ecuación de Nernst) es enorme, el paso de Ca<sup>2+</sup> a través de la membrana desde el exterior de la célula se retiene en 10 millones de veces lo que sería el valor de la concentración, si de forma pasiva, por gradiente simplemente, este ión pudiera permeabilizar. Mantener estos gradientes no es un gasto menor para la célula, pero a cambio, sin duda, la célula

utiliza profusamente este ión para multitud de señalizaciones. La dinámica de los sistemas que introducen o descargan  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol celular es estricta, muy específica y compleja. Existen flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular y en las membranas de los depósitos intracelulares: ER y las mitocondrias. Por tanto, hay niveles de dinámicas del calcio intracelular, pero unos dependen de los otros, se trata de una red reguladora de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Fisiológicamente, las células dan señales para la movilización de calcio intracelular, que proviene de sus propios depósitos, por ejemplo, mediante receptores de membrana, un estímulo externo, cierto agonista, activa su receptor en membrana correspondiente y éste, desencadena una cascada de señales químicas que llegan a producir la apertura de canales de calcio en el interior de la célula y así el vaciamiento transitorio de los depósitos de calcio intracelular y el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol. De alguna forma, esta situación permite o induce que se abran ciertos canales de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana, los llamados 'store-operated calcium channels' (SOCC) o como inicialmente se les conocía, 'capacitative calcium channels' o 'capacitative calcium entry', es decir, entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa (CCE), nombre que reflejaba la idea de que los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  se comportaban como si fueran condensadores en un circuito eléctrico.

En 1985, se publican unos experimentos realizados en células parótidas acinares (células secretoras de enzimas de la glándula parótida) para analizar la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos intracelulares y su relación con el medio extracelular a diferentes ritmos, estimulando el sistema de secreción de amilasa con isoprenalina (agonista de receptores Beta-adrenérgicos). De los resultados obtenidos se pudo entrever que existía una relación entre la descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, su recuperación en los depósitos y la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Más concretamente, se observó que el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular dependía del estado de  $\text{Ca}^{2+}$  en los depósitos. Es decir, los depósitos de calcio controlaban la 'entrada de calcio capacitativa'. Cuando éstos recuperaban el contenido basal de calcio se paraba el influjo de calcio, pero cuando se vaciaban, aparecía la señal de entrada de calcio a través de la membrana (Argent and Arkle, 1985). En este tipo celular, otras sustancias como la acetilcolina, la norepinefrina, la sustancia P y la activación de los receptores alfa-adrenérgicos aumentan los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular para la señalización de la función secretora de salivar (Putney, Jr., 1986).

La descarga de calcio intracelular mediante tapsigargina (inhibidor de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo, SERCA) aportó, más adelante, nuevas evidencias sobre la existencia de estos canales ligados a los depósitos de calcio. La tapsigargina tan sólo afecta el contenido de calcio del ER y no implica segundos mensajeros u otras vías de señalización que no sea una vía estrictamente dependiente de los depósitos intracelulares de calcio, conocida como 'store-operated calcium entry' (SOCE).

La función que primeramente se estableció para esta corriente de entrada, fue la de devolver a los depósitos intracelulares su contenido  $\text{Ca}^{2+}$  basal, teniendo en cuenta que parte de éste se había reorganizado, en otros 'buffers' de la propia célula, o se había perdido, expulsado hacia el medio extracelular por las bombas de membrana plasmática  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas (PMCA) y otros intercambiadores de la membrana Na/Ca (NCXs).

Mientras que los mecanismos implicados en la activación y regulación de la descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular se conoce con gran detalle, el o los mecanismos de activación y la naturaleza de los propios canales que median la SOCE es un enigma.

Los receptores acoplados a proteína G, tras ser estimulados por su agonista correspondiente, mediante la proteína G asociada activan la fosfolipasa C (PLC) que genera 2 productos: 1,4,5-inositol trisfosfato ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol (DAG).  $\text{IP}_3$  es una molécula pequeña, fácilmente difundible por el citosol, capaz de activar/abrir los receptores canal de  $\text{IP}_3$  intracelulares (por ejemplo, en el retículo endoplasmático) produciendo así la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el lumen del ER hacia el citosol, de forma pasiva. Esta salida de calcio, o la disminución de calcio en el lumen de los depósitos implicados en la descarga, está relacionada con la subsiguiente entrada o influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular al citosol, a través de los SOCC. Cualquier procedimiento que vacíe los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  es capaz de activar los SOCC (Parekh and Penner, 1997b) aunque fisiológicamente el suceso de la descarga ocurra por el aumento de  $\text{IP}_3$  citosólico.

Son muchas los agonistas de los diferentes receptores de membrana acoplados con proteína G que activan la encima PLC, por ejemplo hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, etc. La movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  en sus diferentes formas o patrones, es imprescindible para muchas y muy diversas funciones, proliferación, secreción, contracción muscular, respuestas inmunes, funciones del cerebro, transducción de luz, etc.

Algunos de los primeros estudios electrofisiológicos sobre la SOCE fueron realizados en mastocitos. Estas células se distribuyen en un gran número de tejidos conectivos, son secretoras de sustancias como la heparina y la histamina en respuesta a inflamaciones, función para la cual es precisa la señalización vía  $\text{Ca}^{2+}$ . Los resultados de estos trabajos mostraron que el vaciado de los depósitos de calcio activaban una corriente de calcio de entrada no dependiente de voltaje, rectificadora de entrada y muy selectiva para este ión, la llamaron corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por la descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (CRAC) (Hoth and Penner, 1992; Zweifach and Lewis, 1993).

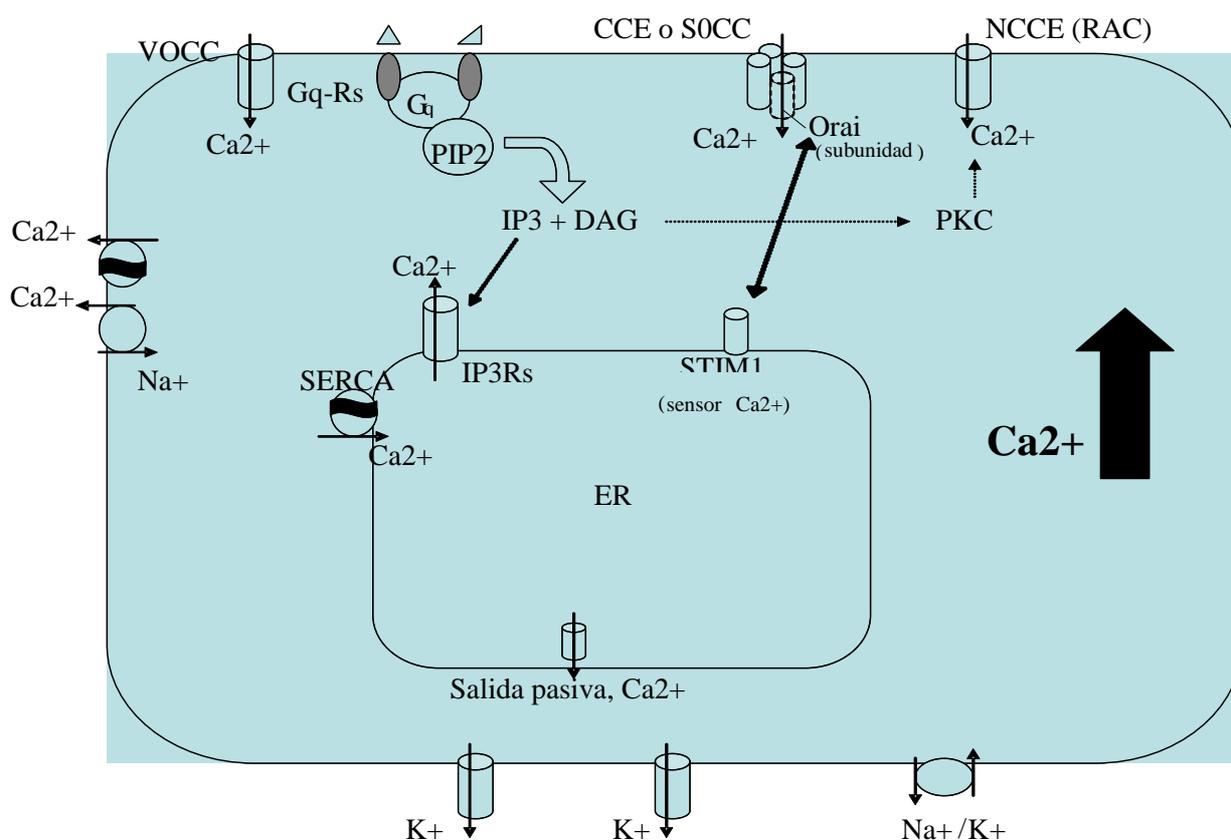
Rápidamente, aparecieron otras corrientes de calcio, en otros tipos celulares, similares a las CRAC. Se trataba de corrientes SOC porque dependían de los depósitos y no del potencial de membrana, eran corrientes catiónicas pero no eran altamente selectivas para el  $\text{Ca}^{2+}$  (Parekh and Penner, 1997a). Se sugirió la relación entre éstas y las corrientes TRPC (subfamilia de los canales TRP, catiónicos no-selectivos activados por estímulo a receptor- acoplado a la fosfolipasa C) con las que comparten ciertas similitudes.

Junto con la CCE, también se determinó la llamada 'entrada de calcio no-capacitativa' (NCCE). Este influjo podría estar mediado no directamente por la activación de la descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular sino por otra vía u otro producto derivado de la enzima PLC. Se intuyó la posibilidad de la NCCE en trabajos como el de Robert S. Mathias (Mathias et al., 1997) donde se ensayaba la estimulación por el factor de crecimiento PDGF, el cual también produce descarga de calcio vía  $\text{IP}_3$  e influjo CCE a través de la activación de  $\text{PLC}_\gamma$ . La mutación del receptor de PDGF en células de ovario de hamster, de forma que éste no pueda enlazarse a  $\text{PLC}_\gamma$ , inhibió la descarga y el influjo de calcio, no obstante, el bloqueo del receptor de  $\text{InsP}_3$  (usando heparina) no inhibió totalmente el influjo de calcio inducido por PDGF, ni tampoco la introducción

de  $\text{InsP}_3$  en el citosol explicaba el total de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por el factor de crecimiento. En definitiva, la nueva hipótesis presentaba un nuevo tipo de corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, no ligada al proceso de descarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , sólo como vía alternativa o paralela, la NCCE.

Más tarde, se determina la presencia de NCCE en células plaquetarias humanas, se reconoce como vía paralela de la CCE y se describe su relación con PKC, vía receptor acoplado a proteína G o bien activando directamente la PKC (mensajeros intracelulares como el DAG y el ácido araquidónico) (Rosado and Sage, 2000). Estudios posteriores recogen datos sobre el antagonismo de los dos tipos de entrada de calcio, CCE y NCCE no se activan simultáneamente, sino que lo hacen a modo recíproco, primero una y después otra. Se presenta una vía de señalización para NCCE a través de NO y cGMP-PKG que inhiben CEE (Moneer et al., 2005; Taylor and Moneer, 2004).

Otros estudios apuntan a que existe una corriente de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada directamente por DAG endógeno. Sería el caso del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  derivado de la activación del receptor de células T (TCR) aunque también existía corriente CCE en estas células (Chakrabarti et al., 1995). En otros tipos celulares, además de para células T, se ha manifestado esta entrada de calcio mediada por DAG (Bird et al., 2004) que se ha considerado también como no-capacitativa.



**Figura 13.** Esquema de las vías de señalización posibles de la entrada capacitativa de calcio (SOCE) para BK y ET-1 (agonistas para receptores acoplados a Gq, GqRs). La molécula IP<sub>3</sub> (producto de la hidrólisis de PLC en IP<sub>3</sub> + DAG) abre los receptores de membrana de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>Rs) del retículo endoplasmático (ER) que permiten la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del lumen del retículo hacia el citosol (transitorio

de calcio). El sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  del ER, la proteína STIM1, interacciona con la proteína Orai1 (subunidad del canal de calcio capacitativo) activando canales capacitativos de calcio (CCE), permitiendo la entrada desde el exterior (SOCE) (incremento de calcio sostenido). La molécula de DAG desde la membrana celular podría interactuar también con canales de calcio no-capacitativos (NCCE) induciendo su activación, o bien también, mediante la vía DAG-PKC-NCCE. Este proceso implica un incremento bifásico del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico transitorio y el inicio de distintos procesos dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , como por ejemplo, la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. Otros elementos que participan en la homeostasis del calcio son la bomba de extrusión de calcio y los intercambiadores de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  y  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$  en la membrana plasmática y la bomba de recaptación de calcio del ER (SERCA).

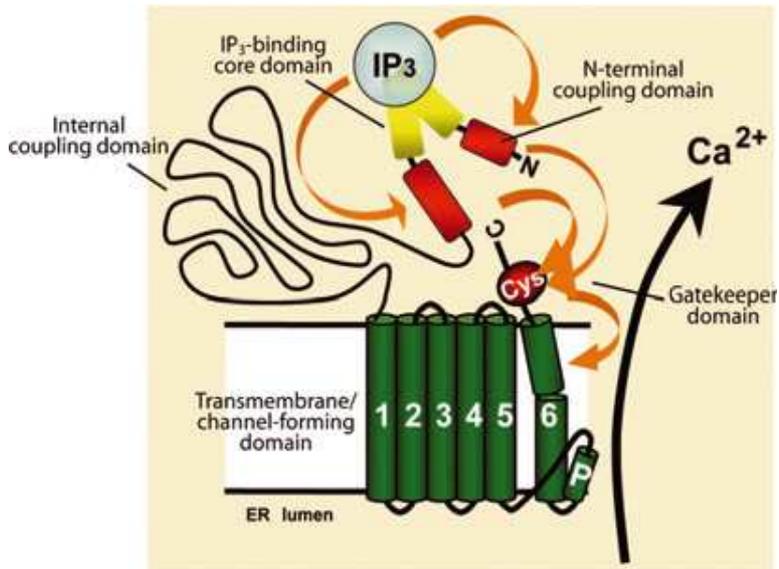
### 1.d.1 MOVILIZACIÓN DEL $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULAR

#### Señalización vía PLC: $\text{IP}_3$ y DAG

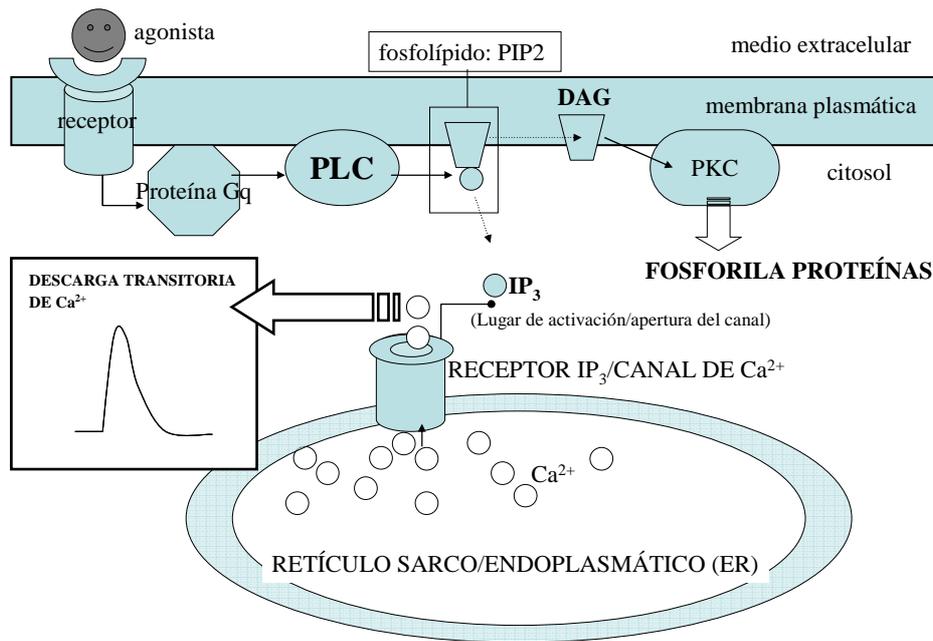
Los receptores de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) son proteínas transmembrana, que aparecen en el retículo formando una estructura de canal. Cuando la molécula de  $\text{IP}_3$  interactúa con el dominio de enlace de este receptor, un cambio conformacional abre el poro del canal, dejando pasar  $\text{Ca}^{2+}$  del lumen del retículo sarco/endoplasmático hacia el citosol, de forma pasiva, por diferencia de gradiente. Pueden formar macrocomplejos de señalización (proteína *scaffold*) para luego volver a su conformación estable o en reposo. Pertenecen a una familia de receptores – canal con seis dominios transmembrana, y aparecen cerca de almacenes de calcio, no sólo en el retículo, y están reguladas  $\text{IP}_3$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Estos receptores (tipo I-III) se han identificado en diferentes especies mamíferas y con un tamaño molecular de unos 300 kDa y formando un tetrámero. Contienen lugares de fosforilación para proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA), para la quinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina (CamKII), PKC, casein quinasa II (CKII) y la tirosina quinasas (Patel et al., 1999).

La isoforma tipo II es más sensible a  $\text{IP}_3$  pero estos receptores también dependen del  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol (tipo I y II), por encima de cierto valor de la concentración de este ión (alrededor de 300 nM) los receptores/canal no se activan. La isoforma I es la más abundante en células de músculo liso y Purkinje.

Un importante número de receptores en la membrana celular están acoplados a proteína G (GPCR). Éstas pueden activar diferentes formas de la fosfolipasa C (PLC) como son PLC-beta, -gama y -eta. Otro tipo, los receptores de tirosina quinasa (RPTK, *receptor protein tyrosine kinase*) activan la forma -gama de la PLC. En cualquier caso, estas enzimas producen la hidrólisis de  $\text{PIP}_2$  y los productos son el 1, 4, 5-inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y el diacilglicerol (DAG). La molécula de  $\text{IP}_3$  es pequeña y fácilmente difundible por el citosol hasta llegar a los lugares de enlace en los  $\text{IP}_3\text{R}$ . El DAG permanece en membrana y desencadena otros caminos en paralelo, como por ejemplo, la activación de PKC (Chalmers et al., 2006; Harnick et al., 1995; Taylor et al., 2004).



**Figura 14.** Modelo con 5 dominios estructurales del receptor 1 de  $IP_3$  de ratón. Vemos un término N de acoplamiento, de enlace a  $IP_3$ , un 6º dominio, que forma el poro del canal que contiene el dominio de apertura/cierre del canal por cambio conformacional. Extraído de Katsuhiko Mikoshiba, 2007.



**Figura 15.** Activación de la vía de la fosfolipasa C (PLC) por el acoplamiento de un receptor de membrana y la proteína G, hidrólisis del fosfolípido  $PIP_2$  y formación de inositol 1,4,5 trifosfato ( $IP_3$ ) (activa la apertura los receptores de  $IP_3$  en la membrana del ER y la salida de  $Ca^{2+}$  al citosol) y diacilglicerol (DAG), fosfolípido en membrana capaz de activar la quinasa PKC y procesos de fosforilación (también la se ha descrito la posibilidad de que participe en la apertura o activación de ciertos canales de la familia TRPC).

## Tapsigargina (TG)

Tapsigargina bloquea las bombas intracelulares responsables de la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el ER, desde el citosol, las llamadas bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  sarcoplasmáticas ATPasa (SERCA) trabajan incesantemente contragradiante. El ER (principal depósito intracelular) posee canales de leak de  $\text{Ca}^{2+}$  por los que fluye constantemente este ión hacia el citosol, la SERCA permite un equilibrio y la conservación de un contenido basal de calcio en el retículo y también a su vez, regula el contenido en el citosol. Inhibir la SERCA significa el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol de forma pasiva sin la intervención de segundos mensajeros o vías de señalización.

La aplicación de TG permitía estudiar el fenómeno de la entrada capacitativa de calcio (CCE) o SOCE, de forma limpia, sencilla, casi aislada, evitando así los caminos adicionales y paralelos activados mediante un estímulo por receptor (agonistas de receptores acoplados a proteína G). La SOCE no dependía exclusivamente de PLC, aunque ésta era la forma fisiológica en la que podía aparecer un influjo de estas características. De hecho, en experimentos aditivos con la activación de PLC por receptores muscarínicos y TG al mismo tiempo, no se observaron cambios en la corriente de influjo capacitativo, es decir, se activaba la misma corriente, y no otras en adición, al menos en los primeros estudios en células parótidas. Además, fue revelador también observar cómo el ritmo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma no dependía de  $\text{IP}_3$  o dicho de otra forma, la permeabilidad de ER no era determinante para la CCE (Putney, Jr., 1990).

El bloqueo de la SERCA mediante tapsigargina fue la forma más clara de demostrar que estas corrientes dependían directamente del estado de contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares (Hoth and Penner, 1992; Takemura et al., 1989b). De hecho, recientemente, y gracias a los ensayos con TG (y otras sustancias inhibitoras de la SERCA) han sido posibles los descubrimientos que relacionan de forma clara las proteínas STIM y Orai como parte del mecanismo de activación e identidad del complejo que forma el canal de las corrientes CRAC.

### 1.d.2 ENTRADA DE $\text{Ca}^{2+}$ ACTIVADA POR LOS DEPÓSITOS DE $\text{Ca}^{2+}$ INTRACELULARES ('store-operated calcium entry', SOCE)

Tras estímulos vía PLC o con tapsigargina se observó cómo a la primera descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol proveniente del ER, aparecía un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el medio extracelular. Esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , no dependiente de voltaje, era la llamada entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  operada por los depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares, abreviado, SOCE o SOC.

¿Por qué se activan? ¿Cómo se activan? ¿Cuál es la identidad de estos canales? Todavía hoy, después de 20 años de estudio, éstas son cuestiones por resolver.

Algunas de estas corrientes podrían funcionar de forma exclusiva para que parte del calcio entrante se invierta en recuperar el nivel basal fisiológico de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo, otras en cambio podrían conducir el  $\text{Ca}^{2+}$  hacia otros compartimentos celulares y su misión sería otra. La cantidad de calcio almacenada en el retículo es relevante para el crecimiento de la célula (Short et al., 1993) y su proliferación (Gill et al., 1996) debido

a que ese calcio está implicado en el procesamiento de proteínas y en la expresión de genes. En este último caso, cualquier cambio en el patrón de oscilaciones de la señal de calcio determina el inicio o el fin de un proceso de expresión de genes. Actualmene, se analiza la posibilidad de un tratamiento con bloqueadores de los SOCC como inhibidores de la proliferación de células cancerígenas (Enfissi et al., 2004).

Para células no excitables, como es el caso de las trabeculares, el aporte de calcio externo mayoritario es el que viene mediado por estos canales 'capacitativos'. Y la importancia de mantener la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  por encima de los niveles basales queda demostrada, por ejemplo, en la regulación de la secreción de células epiteliales y sanguíneas (descarga de proteínas y secreción transepitelial de sales y agua, y en sangre, para la secreción vesicular de enzimas lisosomales, en los procesos de anabolismo y catabolismo de carbohidratos en el hígado, en la contracción muscular en los diferentes tipos de tejidos musculares, como por ejemplo, en la contracción de las células de músculo liso o en el crecimiento celular, la diferenciación y en la apoptosis en multitud de tipos celulares. Pero además, el  $\text{Ca}^{2+}$  es esencial para la movilidad del esperma, señales de  $\text{Ca}^{2+}$  oscilatorias que permiten la fertilización del oocito. Exocitosis y transcripción genética, movilidad celular, también dependen de los incrementos de calcio citosólico, y de su patrón espacial y temporal.

En linfocitos, por ejemplo, esta vía de entrada de calcio controla la regulación de factores de transcripción, la organización del citoesqueleto, la movilidad de la célula, su proliferación y la producción de citoquinas (Emptage et al., 2001). Mantener el nivel de calcio citosólico elevado por tiempos prolongados es necesario en células T para, por ejemplo, la producción de interleuquina-2, y de hecho, es preciso el influjo de calcio para que se active la célula, no es suficiente con un incremento de calcio proveniente del retículo. Incluso, se estudia el papel de sustancias sphingolípidos secretadas por células cancerígenas por ser inhibidoras de la SOCE y funcionar como inmunosupresores (Lewis, 2001).

El  $\text{Ca}^{2+}$  es crucial para el sostenimiento de la vida, pero también participa de las 'señales de muerte' puesto que interviene en apoptosis y necrosis. La cascada de señalizaciones para la apoptosis parece implicar en todas las hipótesis sobre las que se trabaja, la descarga de calcio intracelular del ER y/o principalmente el nivel elevado de calcio en el citosol, que puede precisar también de la entrada extracelular. Por tanto, la relación de la apoptosis con los procesos capacitativos de incremento de calcio es directa, pero también diversa puesto que mientras en células de cáncer de próstata la inhibición de canales SOC supuso mayor muerte celular (Vanden Abeele et al., 2003), en células CHO, la ausencia de calcio extracelular disminuyó la muerte por apoptosis (posiblemente porque si no existe influjo de calcio se retrasa la transcripción de factores como el GADD153) (Pigozzi et al., 2004).

Una de las claves de la gran versatilidad para este ión, es la alta y controlada compartimentalización de todos los sistemas que almacenan o conducen  $\text{Ca}^{2+}$ . Además, esta organización es especialmente compleja, a juzgar por los datos que se siguen obteniendo entorno a la cuestión de las vías de activación por agonista de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Un dato interesante, es que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por canales SOC, puede estar a veces, conducida hacia compartimentos específicos del retículo sin pasar por el medio citosólico, dependiendo del receptor que ha activado el canal (Flemming et al., 2002).

También se ha descrito, ampliamente, el papel de SOCE en la función de permeabilidad en endotelios vasculares y pulmonares. Existe una la relación entre influjo de calcio capacitativo estimulado por trombina y el aumento de la permeabilidad del endotelio pulmonar (Freichel et al., 2004)). Se están investigando la relación entre SOCE y la reorganización del citoesqueleto en estos tipos celulares, y cómo ciertos cambios en la forma o en el estado contráctil de la célula pueden formar gaps intercelulares que harían más permeable la capa de células (Freichel et al., 2004;Norwood et al., 2000). Pero la implicación de SOCE y la permeabilidad del endotelio parece depender también del tipo celular y esto se explicaría por las diferencias entre los citoesqueletos de cada tipo (Chetham et al., 1999).

La presencia de SOCE en células de músculo liso también ha motivado distintos estudios para relacionar la activación de estos canales en el proceso de contracción de estas células. Así en células de aorta pulmonar, la contracción inducida por hipoxia o regulada por agonista son inhibidas si bloqueamos el influjo de calcio capacitativo (Ng and Gurney, 2001). Al parecer, la vía de calcio dependientes de voltaje (canales de calcio dependientes de voltaje, tipo L) junto a la vía CCE, podrían funcionar en paralelo aportando la cantidad de calcio necesaria para iniciar la contracción, y especialmente en la vasoconstricción por hipoxia, la vía CCE sería incluso más relevante (Ward et al., 2005). Actualmente se ha hallado SOCE en diferentes líneas de músculo liso y esquelético pero el papel fisiológico en cada caso no está claro aún (Kurebayashi and Ogawa, 2001).

Para células excitables, dónde los canales de calcio dependientes de voltaje y los receptores ionotrópicos son tan mayoritarios, parecía que los SOCC no debían actuar en funciones concretas y que en todo caso se verían relegados a una función de recaptación de calcio para los depósitos. Pero la evidencia de SOCE en multitud de células excitables incluido neuronas han alterado esta versión (Akbari et al., 2004). Para estas células el influjo de calcio capacitativo podría ser también mediado por receptores de rianodina (Emptage et al., 2001). Se ha relacionado SOCE con la regulación del crecimiento de neuritas (Mattson et al., 2000), en la función de los receptores del gusto (Perez et al., 2003) o en la potenciación a largo plazo y por lo tanto en desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer (Yoo et al., 2000).

## **Mecanismos de activación de la SOCE**

Al menos, 3 hipótesis, han sido ideadas en vistas de los resultados, tan dispares obtenidos sobre los factores o mecanismos de activación de los SOCC. Una de las teorías apuntaba a la existencia de un cierto factor desconocido, llamado factor de influjo de calcio (CIF), que difundía desde el retículo donde se formaba, por el citosol hasta llegar a las inmediaciones de la membrana para actuar sobre la fosfolipasa independiente de  $Ca^{2+}$  (iPLA<sub>2</sub>), fosfolípidos derivados de la reacción serían los encargados de activar la 'compuerta' de los canales SOC en la membrana (Smani et al., 2004). No existe un camino específico para el  $Ca^{2+}$  entrante, sino la dispersión del ión por el citosol (Putney, Jr., 1990) y de ahí, se administraría para la recuperación del contenido basal del retículo tras sufrir una pérdida, por la estimulación vía IP<sub>3</sub> o mediante el bloqueo de la bomba de recaptación de  $Ca^{2+}$  del retículo (SERCA) con TG o con quelantes de  $Ca^{2+}$  citosólico (BAPTA-AM), es decir, cualquier modo de descarga de  $Ca^{2+}$  del retículo.

Se sugirió que este mensajero podría ser cGMP (Xu et al., 1994) o el ácido araquidónico o sus metabolitos (Rzagalinski et al., 1999). Pero en posteriores investigaciones se perfiló que en realidad esos canales activados por esas sustancias eran otros distintos a los SOCC (Mignen et al., 2005; Thompson, 1997). El candidato que mejor caracterizaba la hipótesis y armonizaba con los resultados en distintos estudios fue lo que se llamó factor de influjo de calcio (CIF), con una estructura desconocida, no se consiguió aislar plenamente la sustancia en cuestión (Csutora et al., 1999; Randriamampita and Tsien, 1993).

Otra hipótesis es la del acoplamiento conformacional en la señalización por PLC, entre los SOCC y los receptores de IP<sub>3</sub>, por analogía con el acoplamiento bien conocido entre los receptores intracelulares de rianodina de descarga de calcio (en el retículo sarcoplasmático) (RYRs) y los receptores dihidropiridina, canales de calcio dependientes de voltaje), estructuras propias de músculo esquelético. La disminución de Ca<sup>2+</sup> en el retículo induciría un cambio conformacional en los IP<sub>3</sub>R, permitiendo la interacción proteína-proteína con los canales de entrada capacitativa. Existen pruebas que inducen a pensar en esta posibilidad, evidencias que mostraban la asociación espacial entre el retículo y la zona de entrada de calcio, o como que ciertas drogas despolimerizantes de actina periférica rompiendo la conexión entre el canal y el retículo, impidiendo así el influjo de calcio a través de los SOC (Jaconi et al., 1997).

La tercera posibilidad estudiada fue la del mecanismo de secreción vesicular. Los canales no estarían entonces en membrana y el estímulo promueve la secreción en paquetes vesiculares, los cuales en membrana forman los canales SOC (Somasundaram et al., 1995).

Además de los posibles mecanismos responsables de la SOCE, un elemento necesario a tener en cuenta es la arquitectura del citoesqueleto. La inhibición de la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) determina reorganización del citoesqueleto que de alguna forma impide la activación de la SOCE, quizás alterando el contacto entre estos canales y el ER (Chetham et al., 1999; Suplat et al., 2004).

## **Farmacología de la SOCE**

La forma de activar estas corrientes es conseguir la depleción de los depósitos de calcio intracelular, independientemente de la vía por la cual se llega, es decir, existen estímulos fisiológicos por la formación de IP<sub>3</sub>, o bien, no fisiológicos con agentes inhibidores de la bomba de recaptación de Ca<sup>2+</sup> del retículo (SERCA), o bien, por efecto pasivo, usando quelantes de Ca<sup>2+</sup> citosólico. La formación de IP<sub>3</sub> se da fisiológicamente, tras la activación de la PLC en sus diversas isoformas, en los procesos de acoplamiento agonista- receptor acoplado a proteína G (GPCR), por cada molécula de IP<sub>3</sub> aparece también DAG. La thapsigargina (TG) actúa como inhibidor de la SERCA (de forma irreversible) o también, el ácido ciclopiazóico (CPA) (de efectos reversibles). Activamos este tipo de corrientes, por ejemplo, también, usando quelantes de Ca<sup>2+</sup>, que desde el citosol impiden recuperar el calcio que se va perdiendo por las vías de leak de calcio del retículo (BAPTA-AM). En ocasiones, se han usado ionóforos de Ca<sup>2+</sup> (A23187 e ionomicina) como activadores de las SOC, pero éstos permeabilizan para el calcio la membrana del retículo a la vez que lo hacen para la membrana celular.

El grupo de los lantánidos es un grupo bien conocido como inhibidores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , de forma no selectiva (Weiss and Goodman, 1969). Por ejemplo, el lantano ( $\text{La}^{3+}$ ) mimetiza el ión  $\text{Ca}^{2+}$  y aunque son atraídos hacia el poro por su carga muy positiva, no consigue atravesar el canal, les acompaña una gran nube de moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , que le otorga un gran volumen. La concentración típica usada como bloqueante de la CCE está en el rango de las decenas de micromoles. A altas concentraciones puede tener efectos diversos, poco específicos, como por ejemplo el bloqueo de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana (Kwan et al., 1990; Reeves and Condrescu, 2003). El efecto de otro lantánido,  $\text{Gd}^{3+}$ , estudiado en células HEK293 y de músculo liso A7r5, donde concentraciones bajas, 1-10  $\mu\text{M}$ , conseguían inhibir las corrientes capacitativas y otras no-capacitativas, prácticamente del todo.

En general, parece que la relación de concentraciones o de inhibidores para CCE depende del tipo celular. En algunos casos, se miden inhibiciones significativas pero muy débiles, por ejemplo, se habla de coexistencia de canales SOC sensibles y no-sensibles a los lantánidos en un mismo tipo celular, como en hepatocitos tanto para la estimulación de la depleción del ER directamente (tapsigargina) como por vía receptor (vasopresina) (Fernando and Barritt, 1994). Es decir, la baja especificidad del  $\text{Gd}^{3+}$  no es relativa a que su efecto sea para corrientes puramente capacitativas o no-capacitativas, en ambos casos, es efectivo tan sólo en un porcentaje bajo.

Frente a los diversos resultados obtenidos con inhibidores inorgánicos, se diseñan inhibidores orgánicos. Un ejemplo de este grupo son los imidazoles como el SKF96365 (2–30  $\mu\text{M}$ ), inhibidor diseñado para canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto SOCs como canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (VOCs). Con la capacidad de actuar a nivel de membrana, en la fase de influjo de calcio mediada por receptor y no antes, o sea, en el procesos de descarga de calcio. Otros compuestos similares son L65158, SC38249, LU52396 y tetrandrina. A partir de concentraciones más elevadas, los imidazoles pueden producir otros efectos, como la elevación de calcio intracelular por descarga de los depósitos intracelulares (Harper et al., 1997; Harper and Daly, 2000).

Un inhibidor de los canales de calcio capacitativos muy popular, ampliamente usado, es el 2-aminoetoxidifenil borato (2-APB). Es un compuesto capaz de permear la membrana plasmática, con funciones distintas e incluso opuestas, porque originalmente se describió como un inhibidor de los receptores de  $\text{IP}_3$  (Maruyama et al., 1997; Takemura et al., 1989a) y a su vez, también podía bloquear la CCE en células HEK293 en las que se había expresado canales TRPC. Estudios electrofisiológicos mostraron que la acción de 2-APB en membrana es más potente que en el interior celular, al menos en células HEK293 intactas (Lievremont et al., 2005; Takemura et al., 1989a). Además, 2-APB se erigió como un bloqueador altamente específico de la CCE, para la activación de los canales TRP mediante DAG, este compuesto no inhibía el influjo de calcio resultante, en cambio sí lo hacía si el influjo se inducía mediante una agonista acoplada a PLC, o por la depleción de los depósitos independiente de  $\text{IP}_3$  (inhibidores de la SERCA o quelantes pasivos de calcio libre en el citosol). Y no tiene efectos sobre los canales VOCs.

La concentración de uso de 2-APB marca una diferencia de opuestos también, es decir, a concentraciones superiores a 50  $\mu\text{M}$  puede ocurrir que la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  de entrada aumente, al menos así se detectó en una línea celular de *Rat basophilic leukemia* (RBL-2h3 m1). En presencia de  $\text{Gd}^{3+}$  habiendo éste inhibido corrientes capacitativas, tras la aplicación de 2-APB (100  $\mu\text{M}$ ) se observó un incremento en el

Ca<sup>2+</sup> citoplasmático que no provenía de alteraciones en el 'buffering' intracelular o por la depleción de los depósitos, sino que se trataba de una entrada externa de Ca<sup>2+</sup> a través de unos 'supuestos' nuevos canales catiónicos, preferentemente monovalentes (Braun et al., 2003a; Takemura et al., 1989a). Pero también, a muy baja concentración de 2-APB puede aumentar la corriente capacitativa, hay datos que señalan el efecto de incremento de calcio citosólico a través de canales CRAC.

El 2-APB también puede regular canales dependientes de Mg<sup>2+</sup>, los Mg<sup>2+</sup>- or Mg<sup>2+</sup>-ATP- MagNum/MIC puesto que a concentraciones > 50 μM los inhibe, igual que para el caso de los CRAC (Hermosura et al., 2002).

### **TRPs y la entrada de calcio operada por los depósitos intracelulares (SOCE)**

Dentro del grupo de las corrientes SOC, la mejor caracterizada es la corriente CRAC (apartado 1c.1, Canales iónicos en las células TM) que se caracterizan por ser corrientes capacitativas de gran selectividad por el Ca<sup>2+</sup>, fuertemente rectificadoras de entrada, con un potencial de reversión cercano a +50 mV. Se les conocía electrofisiológicamente y un poco, farmacológicamente, pero hasta hace poco, nada se sabía sobre su identidad proteica.

A partir del descubrimiento de la familia de genes de *Drosófila trp* (*transient receptor potential*) esta familia de canales catiónicos, los TRP han inspirado multitud de trabajos con el objetivo de revelar que eran éstos los canales mediadores de la SOCE y de la CRAC, en concreto. Era muy prometedor que por ejemplo los TRPCs, subfamilia de TRPs, fueran estimulados en la cascada de señalización de la vía PLC ¿Son los SOCC agrupaciones homo/heteroméricas de proteínas TRPC?

El primer gen de esta familia de proteínas analizado fue primeramente en invertebrados, en *Drosófila*, y era requerido para la respuesta lumínica. La cascada de fototransducción empezaba con la luz activando el receptor de rodopsina acoplado a proteína G, la señalización continúa con la activación de la PLC-beta y un influjo de cationes en las células fotoreceptoras. Mutaciones en este gen significaron la disminución de la entrada de Ca<sup>2+</sup>, parecía que TRP permitía la activación de un canal para Ca<sup>2+</sup> o bien, que esta proteína formaba parte del canal de Ca<sup>2+</sup> en si (Hardie and Minke, 1992). Los homólogos de los TRP de *Drosófila* en mamíferos son siete proteínas TRP que se identificaron como: TRP-canónicos (TRPC1-7). Rápidamente, se procedió a la sobreexpresión y el knockout de estas proteínas y determinar su relación con la entrada de Ca<sup>2+</sup> capacitativa. Desde que en 1992, Hardie y Minke señalaran que era la vía de PLC por la cual se activaban los canales TRP, el link de identidad entre los SOCC y los canales TRP ha sido muy tentador; se iniciaron muchos trabajos entorno a esa hipótesis, sobreexpresando o eliminando estas proteínas en distintos tipos celulares y determinando si había cambios en la SOCE. Sin duda, los TRP eran los principales candidatos para la identidad de los canales SOC (Berridge, 1995; Birnbaumer et al., 1996).

Esta superfamilia de canales catiónicos, muestra una gran diversidad de mecanismos de activación y selectividades varias. En común tienen que todos ellos intervienen en la fisiología sensorial (visión, gusto, olfato, oído, tacto y en la sensación térmica y de presión. Aparecen en multitud de estímulos como integradores de señal. Se sabe que

las subfamilias TRPV, TRPM y TRPA son canales térmicos, TRPC, TRPV y TRPM están relacionados en procesos de exocitosis, permiten el paso de cationes y aparecen en la cascada de señalización ligada a PLC (Venkatachalam and Montell, 2007).

Del subgrupo de los TRPC (TRP canónicos, son los más parecidos al canal TRP original, en *Drosófila*) hay 7 variantes: TRPC1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. En humanos se expresan sólo 6 de estas proteínas (TRPC2 es un pseudogen en humanos, aunque no en otras especies mamíferas, para las que hay evidencias de que este canal funcionaría como canal SOC). Algún o algunos elementos derivados de la cascada de señalización de PLC activan a los 7 tipos de TRPCs, pero no está determinado. La complejidad aparece cuando se quiere determinar cuáles de ellos se activan por depleción de los depósitos sin presencia de InsP<sub>3</sub>, ni activación de los InsP<sub>3</sub>R, y cuáles se activan por la mediación de éstos. El caso de TRPC1 y 3, que aparecían como directamente activados por la depleción (Zhu et al., 1996) luego se determinó que en realidad estos canales mantenían una actividad constitutiva (Zhu et al., 1998).

En algunos laboratorios han sugerido que TRPC3 puede activarse por IP<sub>3</sub> y sus receptores (Kiselyov et al., 1998a), resultados distintos se obtienen en otros laboratorios, en los que se registra sólo actividad derivada de DAG (Hofmann et al., 1999).

Se asocia TRPC4 y TRPC5, proteínas similares, presentan evidencias de ser activados por depleción (Philipp et al., 1996) y de formar parte del mismo canal, al igual, que se considera que TRPC4 y 1 pueden formar complejos con más probabilidad, para estas combinaciones también existe polémica, puesto que hay evidencias de que pueden activarse por DAG (Philipp et al., 1996; Schaefer et al., 2000).

Los TRPC3, 6 y 7 podían ser activados por diacilglicerol sintéticos (oleylacetilglicerol, OAG) o por el DAG endógeno.

La expresión de algunas proteínas TRPCs parecía correlacionarse con parámetros funcionales como el de la proliferación, especialmente TRPC4, como se vió en células endoteliales de arteria pulmonar (Fantozzi et al., 2003) y TRPC6 en células de músculo liso de arteria pulmonar (Yu et al., 2003). El crecimiento celular se asocia a la SOCE, teniendo en cuenta la relación de estos subtipos de TRP como mediadores de entrada de calcio, ésta es otra prueba que sugiere que los TRPC están ligados a la función de entrada de calcio mediada por los depósitos de calcio o por la señal que induce descarga de calcio intracelular. También, para células hipocámpales H19-7 se probó la relación entre la expresión de TRPC1 y TRPC3 y la modulación de los procesos de proliferación y diferenciación (Wu et al., 2004; Yu et al., 2003).

Aunque la primera impresión tras conocer las vías de activación en las que se veían implicados los TRPCs era la de relacionar la corriente CRAC con las corrientes TRPC, pronto los resultados se mostraban confusos, cuando se expresan experimentalmente, los TRPC, no exhiben las propiedades de los CRAC, para empezar no son selectivos para el Ca<sup>2+</sup> y además, sus conductancias 'single-channel' eran de decenas de picosiemens, mucho mayores que para los CRAC (alrededor de 24 femtosiemens)

Por ahora, los resultados que relacionan proteínas TRPC con la SOCE son dispersos; no parece haber el consenso necesario entre laboratorios que permita la evidencia experimental para hablar de canales TRPC operados por los depósitos. Si a todo esto,

se le suman las novedades acerca de Stim1 y Orai, dos proteínas directamente relacionadas con la CCE, parece que aún será más complicado desvelar la cuestión: SOCE-TRPC (Putney, Jr., 2007a; Putney, Jr., 2007b).

### **CRAC: Orai y Stim1**

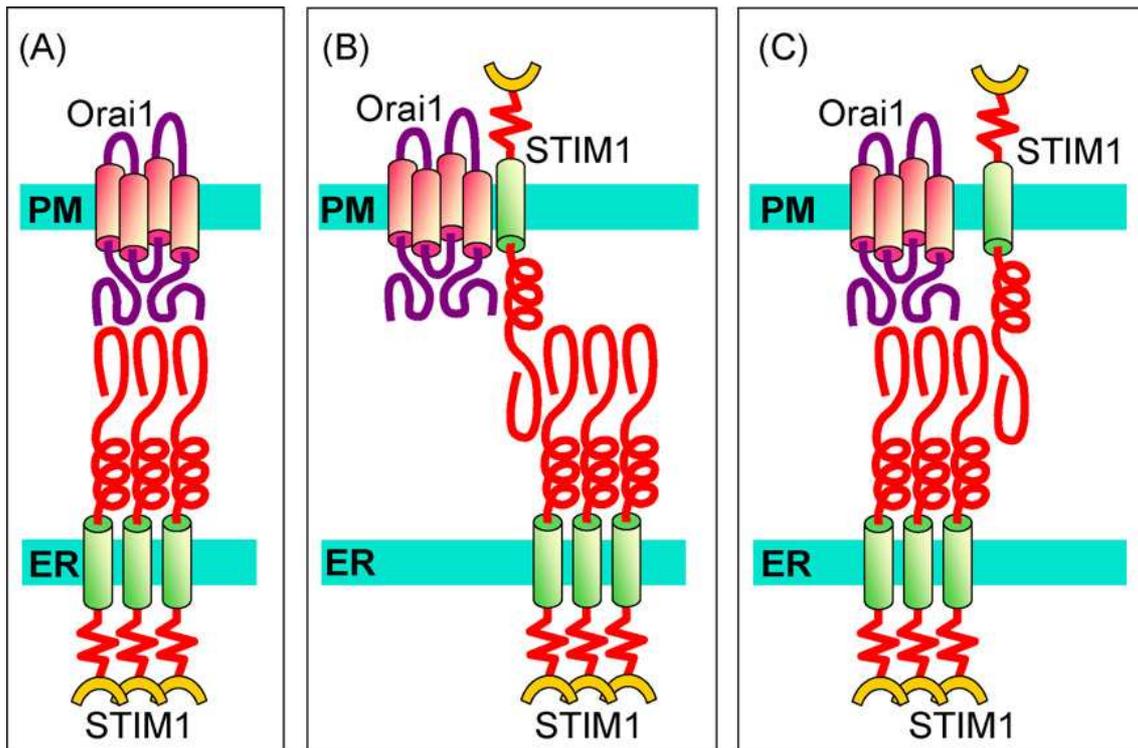
Del resultado de la combinación de estudios sobre el genoma (RNAi-screening) y análisis para enlaces modificados se logró identificar una mutación en Orai1 (R91W), una proteína 4 segmentos transmembrana, que causa una deficiencia inmune severa y la inhibición de la entrada de  $Ca^{2+}$  en células T (Feske et al., 2006; Zhang et al., 2006). También se estudió cómo la sobreexpresión en conjunto de Orai1 y otra proteína, llamada STIM1 ('stromal/interacting molecule'), en células HEK293, esta combinación da lugar a grandes corrientes de  $Ca^{2+}$  similares biofísica y farmacológicamente a las CRAC (Mercer et al., 2006; Soboloff et al., 2006). En los estudios de mutagénesis de Orai1, se probó que las alteraciones en los grupos residuales ácidos: Glu 106, Glu 190 en TM1 y 3 y los aspartatos de las posiciones 110, 112 y 114 en la zona de enlace entre los segmentos TM1 y 2 determinaban la selectividad de los canales CRAC (Yeromin et al., 2006). Eran algunas de las evidencias de que Orai1 forma parte del canal CRAC y es relevante para su selectividad. Además de tener un papel clave en la activación del canal mediante su interacción con STIM1 en el ER.

También se obtuvieron resultados acerca de STIM1, esta proteína es necesaria para la señal capacitativa (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). STIM1 funciona como sensor de  $Ca^{2+}$  en el retículo endoplasmático, para ello, posee un dominio ET-hand de enlace a  $Ca^{2+}$  en el terminal N de la porción luminal del ER. En respuesta a la depleción de los depósitos, esta molécula se recoloca en la membrana del ER en forma de agregados, en áreas localizadas, muy próximas a la membrana plasmática (Zhang et al., 2005).

Ambas proteínas son necesarias y suficientes para la funcionalidad de los canales CRAC, para sensar el contenido de  $Ca^{2+}$  del ER, la transducción de esta señal a la membrana plasmática (PM) y la apertura del canal de  $Ca^{2+}$  altamente selectivo.

El sensor de  $Ca^{2+}$  del ER, STIM1, inicialmente fue conocido como una proteína de la PM (Manji et al., 2000), y los datos hasta hoy indican que existe una interacción de STIM1 con la membrana celular y posiblemente una interacción directa entre su término-C con el dominio citoplasmático de la proteína Orai (Spasova et al., 2006).

La principal hipótesis es por ahora, la del acoplamiento entre ambas proteínas, los estudios de co-inmunoprecipitación apoyan la explicación de la interacción directa (Yeromin et al., 2006). Los esquemas propuestos hasta el momento son los que vemos en la Fig. 14, donde encontramos 3 modelos de posible interacción. Al igual que para STIM1, Orai parece que también cambia su distribución en la PM durante los procesos de depleción formando agregados en los espacios próximos a los de mayor densidad de STIM en el ER (Luik et al., 2006).



**Figura 16.** Modelos de acoplamiento entre STIM1 y Orai1 para la activación de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  capacitativa. (A) STIM1 agregado en el ER, interacciona con Orai1 en la PM, (B) lugar primario de enlace de STIM1 en la PM interacciona con Orai1, (C) STIM1 agregado en el ER activa canales de Orai1 por activación directa, como en (A), mientras que STIM1 en la PM ejerce un papel de regulador de la activación del canal interaccionando con el agregado de proteína STIM1 en el ER. Extraído de (Hewavitharana et al., 2007).

Así pues, ambas proteínas, STIM y Orai1, funcionan conjuntamente y son elementos cruciales en el complejo que forma los canales CRAC. En los tres últimos años, la identidad de estas corrientes ha sido por fin desvelada, al menos parcialmente.



## **2. OBJETIVOS**



## **2. OBJETIVOS**

Conocer la dinámica del calcio intracelular es fundamental para comprender los códigos de señalización de cualquier tipo celular. Diferentes estudios apuntan a que en el humor acuoso de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) se hallan valores elevados de sustancias vasoconstrictoras, como por ejemplo, la endotelina-1. Se sabe que este tipo de sustancias tienen un efecto contráctil sobre el tejido trabecular, efecto que va acompañado típicamente por la disminución del flujo de evacuación del humor acuoso a través del mismo tejido. Para estudiar el origen de la contracción del tejido y su relación con la movilización de calcio intracelular y extracelular, los objetivos principales para el trabajo de tesis doctoral son:

1. Caracterización de la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducida por sustancias vasoconstrictoras, en células trabeculares.
2. Estudio de la presencia de corrientes iónicas transmembrana que operan con los depósitos intracelulares, las llamadas 'Store-Operated Calcium Currents' (SOCC) o 'Capacitative Calcium Currents' (CCE).
3. Estudio de la posible función mecánica del calcio intracelular/extracelular en la contracción o relajación celular.



### **3. MÉTODOS Y MATERIALES**



### 3. MATERIALES y MÉTODOS

#### 3a. Cultivos primarios de células trabeculares bovinas (BTMs)

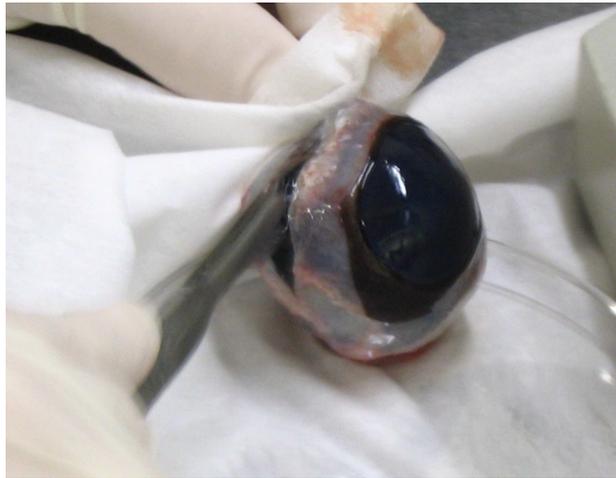
El cultivo de células trabeculares bovinas (BTM) se realiza a partir de ojos de ternera obtenidos en el matadero. En un tiempo no superior a 2 horas tras la muerte del animal se procede a la extracción del tejido en el laboratorio. Las edades de estas vacas comprenden de los 3 a 6 meses.

En recipientes con PBS sin calcio ni magnesio y con concentraciones de antibiótico de 100 U.I./ ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 2.5 µg/ml anfotericina B se conservan los globos oculares recién extraídos de la cabeza del animal por un tiempo no superior a 1.5h a 4°C (Stamer et al., 1995).

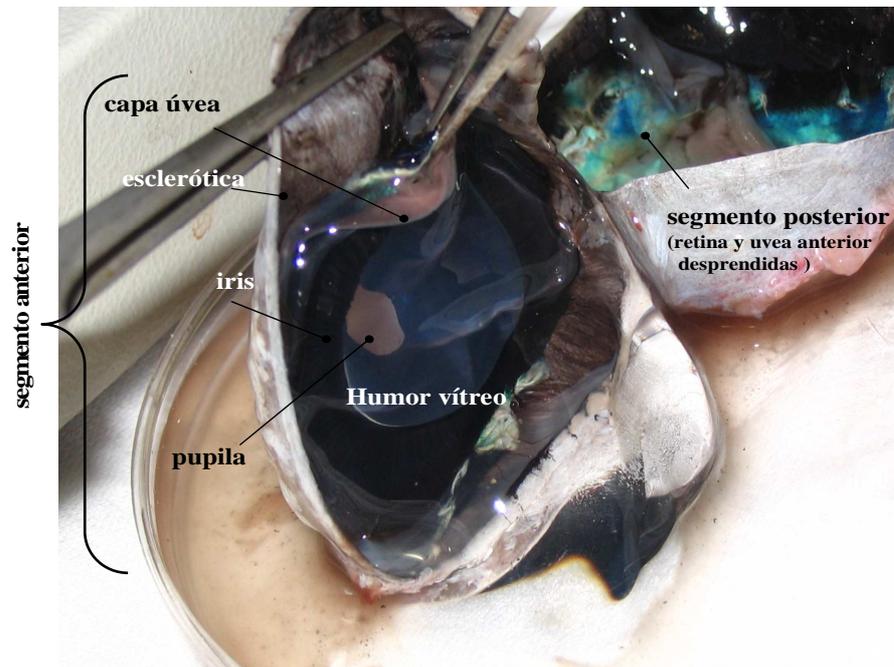
Como se ha descrito en varias publicaciones (Llobet et al., 1999b) se procede a la extracción del tejido trabecular, en forma de anillo, bajo lupa y en una campana de flujo horizontal, manteniendo las condiciones de esterilidad adecuadas para los instrumentos quirúrgicos utilizados. Limpiamos los restos de tejido adiposo y muscular adheridos al globo ocular y lo bañamos en alcohol 70°, apenas unos segundos, hasta ver cómo la transparencia de la córnea se torna blanquecina debido a la deshidratación; justo entonces, procedemos a la inmersión del ojo en un recipiente con PBS y antibióticos, de 5 a 10 minutos, dos veces. Seguidamente, procedemos con un corte meridional, hacia la mitad del globo ocular, como vemos en la **imagen 1**, separando el segmento anterior (córnea, iris, etc.) del segmento posterior que desecharemos (retina). Manipulamos el segmento anterior, de forma que con unas pinzas, atravesando el humor vítreo (gelatina transparente), podamos empezar a estirar desde un punto en la raíz del iris, con mucho cuidado, arrastrando de esta manera, los tejidos del iris, cuerpo y músculo ciliares y el cristalino, prácticamente de una sola vez. Otra posibilidad, como vemos en la **imagen 2**, es estirando con la pinza desde la capa uveal (tono marrón), arrastrando así, la raíz del iris, el cuerpo ciliar, el cristalino y el vítreo, también de una sola vez. De esta forma, despejamos la zona del trabéculo o red trabecular (TM) para su extracción.

La TM es un anillo, muy fino, que se encuentra justo entre la córnea y los restos del músculo ciliar (CM) cuando se inserta, éste, en la esclerótica. Eliminados los tejidos circundantes y bajo una lupa podremos ver el anillo trabecular en tonos blanco y gris (**imagen 3**). Para facilitar la extracción del tejido, primero hacemos cortes paralelos al anillo de la TM, en su círculo externo e interno, con un bisturí y limpiamos la zona alrededor del tejido para no contaminar con tejido del CM, del cual pueden quedar restos. También es conveniente sacar el ligamento peptídico, de color negro y que rodea a TM en su radio interior, con cuidado de no romper o perder parte de la TM.

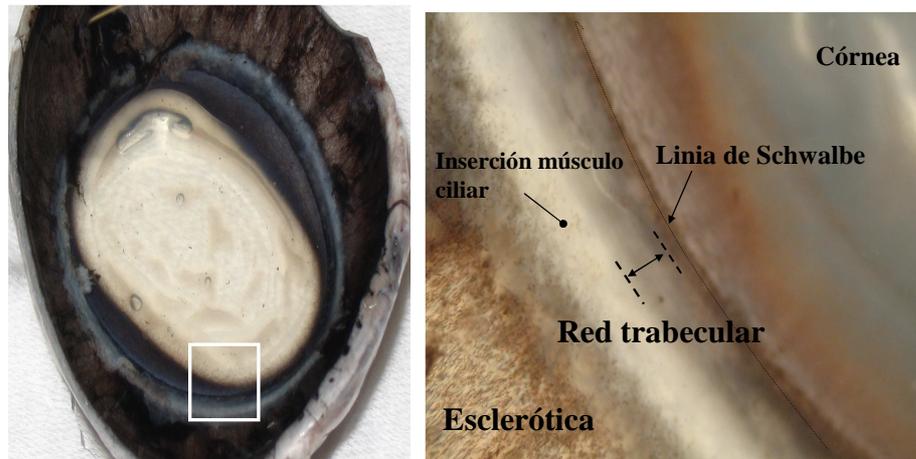
Finalmente, extraemos con pinzas el anillo trabecular intentando llevarnos el tejido en tiras.



**Imagen 1.** Corte meridional de globo ocular bovino (segmento anterior y posterior), una vez extraídos restos de tejido adiposo externo y tras cortar el nervio óptico, en la parte posterior (no visible en la imagen). En primer plano, se observa la córnea y la esclerótica.



**Imagen 2.** Vista interna de segmento anterior de ojo bovino. Extraemos el iris, vítreo, cristalino y músculo ciliar con pinzas esterilizadas en una llama tipo 'bunsen'.



**Imagen 3** Imagen de segmento anterior y detalle de la red trabecular. Detalle de la zona circundante a TM, donde se ve parte del fino anillo de la red trabecular (TM), en tono gris y semitransparente, entre la línea de Schwalbe, junto a la córnea, y la zona de inserción del músculo ciliar.

El tejido se limpia con PBS sin calcio ni magnesio, 100 U.I./ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 2.5 µg/ml anfotericina B, durante 10 min, por 3 veces. Finalmente, el tejido es digerido químicamente en 1-2 mg/ml de colagenasa (tipo Ia) y 0.5 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) a 37°C y durante 1h 15min, en PBS con calcio y magnesio. Pasado este tiempo, procedemos a la digestión mecánica del tejido con pipetas pasteur a 4 grosores diferentes (pulidas con llama) y con un recubrimiento interno de silicona (Sigmacote) para evitar que se pierda tejido adherido en el vidrio. Una vez disgregado correctamente el tejido, paramos la reacción enzimática con un exceso de albúmina 10 mg/ml, en PBS con calcio y magnesio. A continuación, y durante 10 min a 1000 r.p.m. centrifugamos el preparado y descartando el sobrenadante, resuspendemos el 'pellet' en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 100 mg/ml L-glutamina, 100 U.I./ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina y 2.5 µg/ml anfotericina B. Los cultivos primarios crecen en flascos de cultivo estériles y se mantienen a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en un incubador. La confluencia de células en los flascos se da entre los 10 y 14 días posteriores al cultivo. Para los experimentos se usan células de diferentes pases del cultivo, hasta un máximo de 3, para levantar células usamos tripsina-EDTA durante aproximadamente 1 min o menos, a 37°C.

Los productos usados en todo el proceso de cultivo fueron obtenidos en Sigma (Madrid, España).

Los ensayos con células humanas de la línea TM5 fueron posibles gracias a la donación hecha por el laboratorio de la Dra. Melanie Kelly del Depto. de Farmacología, Universidad Dalhousie, NS, Canadá. Esta línea se obtuvo por la transfección de células trabeculares primarias de un donante de ojo sano de 18 años, con el virus mutante SV40 (Pang et al., 1994).

### 3b. Medidas de calcio intracelular y óxido nítrico

Para las medidas de calcio intracelular mediante fluorescencia sembramos células trabeculares en cubres redondos de 25 mm de diámetro (VWR Scientific Inc., Philadelphia, PA) y permanecen en el incubador de 2 a 5 días, antes del experimento, en medio de cultivo.

Los preparativos del experimento se inician lavando el medio de los cubres y sustituyéndolo por una solución salina fisiológica (mM): 140 NaCl, 4.3 KCl, 1.3 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 glucosa, 10 HEPES, pH 7.4 con NaOH. La solución usada en algunos experimentos, para medio libre de calcio, mantiene las mismas concentraciones de sales pero sin calcio y con 1 mM EGTA.

Tras 2 o 3 lavados, introducimos el buffer fisiológico con 5 μM de Fura-2/AM (Calbiochem, San Diego, CA) disuelto previamente en DMSO (Sigma, Madrid). La incubación del fluoróforo sucede durante 40 min a 37°C, en ausencia de luz.

Acabado el periodo de incubación procedemos al lavado del excedente de Fura-2 con solución fisiológica, de 2 a 3 veces, y colocamos el cubre en una cámara de flujo abierto de 1ml en un microscopio invertido Olympus IX70. La fuente de luz es un monocromador. Se tomaron fotografías con una cámara CCD refrigerada (Orca II-ER, Hamamatsu Photonics, Japón). Los datos son almacenados y digitalizados en un PC mediante el software Aquacosmos (Hamamatsu Photonics). El mismo equipo se utiliza para los registros de otro fluoróforo, el DAF-FM. Aunque, para los registros de calcio también se usó un microscopio invertido de epifluorescencia Diaphot 300 (Nikon, Tokio, Japan) con un objetivo de inmersión UV-F20 (20x) (Nikon, Tokio, Japón). Con este equipo se usó para la captación de las imágenes de fluorescencia, una cámara CCD CH250 (Photometrics, Tucson, AZ). Y los datos se almacenaron y analizaron en un ordenador Apple Macintosh 840AV (Apple Inc, Cupertino, CA).

Una vez elegido el campo de células adecuado se tomaban fotos cada 4 o 5s, exponiendo la muestra a 340 y 380 nm (filtros con ancho de banda de 10 nm), puesto que el fluoróforo Fura-2/AM es un fluoróforo ratiométrico. El complejo Fura-2 enlazado al calcio libre emite luz a 510 para 340 y si el complejo no se forma (no hay calcio libre), Fura-2 a solas, emite luz a 510nm para una excitación de 380 nm. Tras un basal de al menos 1 min se aplicaban las diferentes sustancias ensayadas y se registraron los cambios de intensidad de la luz emitida en las 2 longitudes de onda de excitación, F<sub>340</sub> y F<sub>380</sub>. Típicamente, se utiliza el parámetro ratio (R):  $R = F_{340}/F_{380}$  para representar los resultados. O bien también, calculamos los valores absolutos de concentración de Ca<sup>2+</sup>, usando la fórmula tras determinar experimentalmente alguno de sus parámetros (Q, R<sub>min</sub> y R<sub>max</sub>):

$$[Ca^{2+}] = Kd * Q * (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

**Kd** es la constante de disociación de Fura-2/Ca<sup>2+</sup> y es además un valor dependiente de la marca del fluoróforo.

Siguiendo un protocolo de calibración determinamos los valores de fluorescencia (F) y ratio R máximos y mínimos en células trabeculares bovinas en condiciones

saturantes de calcio (5-10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) y o  $\text{Ca}^{2+}$  (+10 mM EGTA), en el medio extracelular. Así calculamos:

$$Q = F_{\min} / F_{\max}, \text{ a } 380 \text{ nm}$$

**$R_{\max}$  y  $R_{\min}$** , ratios máxima y mínima registradas (saturación de calcio en la célula y mínimo contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente).

Para la aplicación de las diferentes drogas tratamos de mantener la relación de 20  $\mu\text{l}$  solución droga /ml volumen total de medio en la cámara usada en el microscopio, reduciendo así la variabilidad en los tiempos de respuesta debidos a la difusión de la sustancia.

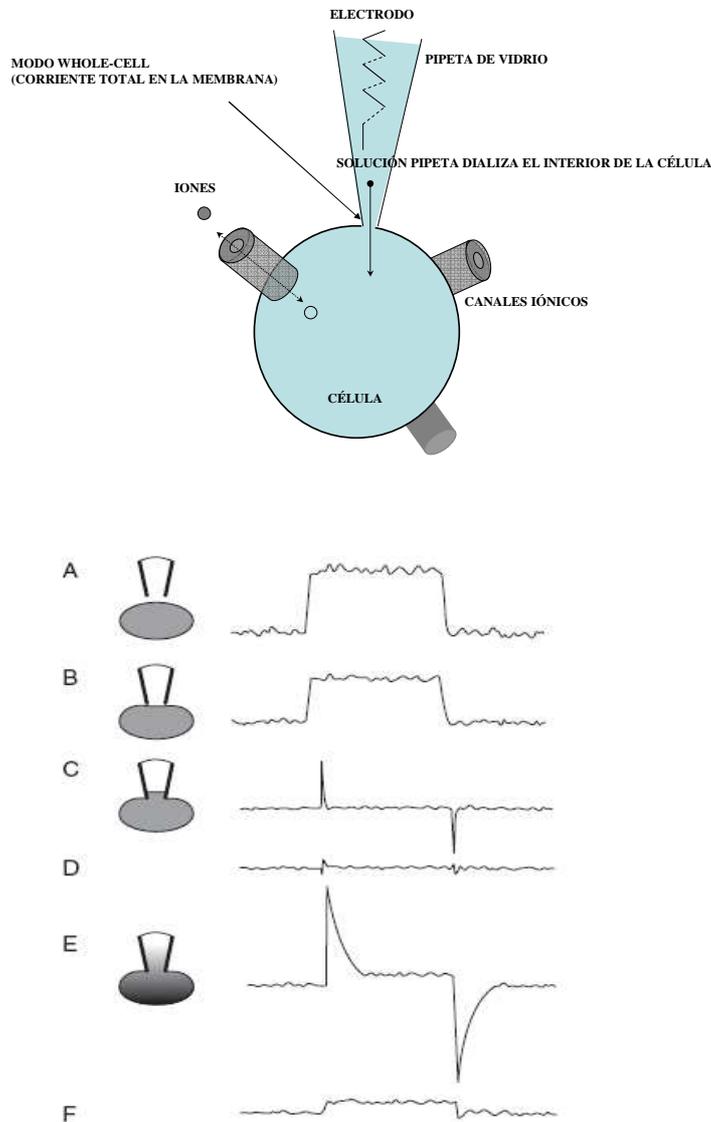
Los cambios de solución se realizaron mediante distintos sistemas, con bombas de motor eléctrico que realizaban el *switch* para el cambio de solución, o bien, por gravedad, las soluciones fluían desde jeringuillas a un nivel superior hacia la cámara con la muestra, abriendo y cerrando manualmente las llaves de paso, para cambiar de solución perfusora.

Los experimentos para la medición de óxido nítrico (NO) se llevaron a cabo con la ayuda del fluoróforo 4-amino-5-metilamina-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM, Molecular Probes). El DAF es insensible a los cambios de pH intracelulares, forma un complejo con la forma activa de NO en su proceso espontáneo de oxidación a  $\text{NO}^2$  (Kojima et al., 1998). Excitando en 488 nm, el complejo emite luz en 520 nm. El proceso de incubación, 5  $\mu\text{M}$  (rango típico: 1-10  $\mu\text{M}$ ) es de aproximadamente 30 min, 37°C y a oscuras. Tras varios lavados, se dejaba reposar la muestra de 10 a 15 min antes del inicio del experimento. Las soluciones para la incubación y el experimento contenían 100 $\mu\text{M}$  L-Arginina, sustrato de la sintasa de óxido nítrico (NOS) (Sigma). Tras un basal de no menos de 1 min procedimos a la aplicación de las drogas ensayadas, tomando fotos cada 5s. Las medidas de óxido nítrico se tomaban simultáneamente a los cambios de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , por ello usamos un cubo de filtros adecuado para la luz de ambos fluoróforos. Para el control negativo preincubamos las muestras con  $\text{N}^\omega$ -nitro-L-Arginina metil ester (L-NAME, 1 mM), minutos antes del inicio del registro (Connors et al., 2006). Para los controles positivos usamos un donador de NO, el DETA-NONOate (NOC-18, 500 $\mu\text{M}$ ) (Calbiochem) (Seccia et al., 1996).

### **3c. Medidas electrofisiológicas de corrientes de membrana**

Las células plantadas en coverslips/cubre se mantuvieron de 1-3 días antes del experimento. Los coverslips se mantenían en solución fisiológica con glucosa y se pasaba a la nueva solución en el momento preciso de inicio del experimento, momento en el cual se transfiere el cubre a una cámara (0.2 ml) en un microscopio de inversión (Nikon diaphot, Tokyo, Japan). Los registros electrofisiológicos se realizaron a temperatura ambiente, 25°C, y transcurrían durante varios minutos, normalmente sin exceder la media hora. Las soluciones externas se perfundían por gravedad.

Las corrientes de membrana se midieron en condiciones de fijación de voltaje, usando la técnica de *patch-clamp* descrita por Hamill (Hamill et al., 1981) y usando la configuración de *whole-cell* con parche perforado (Falke et al., 1989) o *whole-cell*. La técnica de 'voltage clamp' mide corrientes a través de la membrana celular mientras se controla el voltaje de membrana.



**Figura 1.** En la configuración *whole-cell* de *voltage-clamp*, se forma primeramente un gigasello entre la punta de una pipeta que contiene una solución intracelular determinada y un electrodo, como vemos en la figura (B) la pipeta entra en contacto directo con la membrana de la célula formando el sello cada vez mayor (R sello) y aislando el circuito del electrodo y el amplificador asociado (señal de corriente eléctrica disminuye hasta hacerse prácticamente nula). En la figura C, aparece tan solo, los transitorios de los capacitivos una vez formado el gigasello del circuito que pueden compensarse (D) y seguidamente, se procede a la apertura o rotura por succión del trozo de parche sellado, manteniendo el sello y la célula intactas. Así se accede al interior de la célula, controlando su contenido iónico y potencial eléctrico, aunque con la desventaja de dializar moléculas existentes en la solución intracelular propia de la célula, figura E, donde aparecen los transientes del circuito resistor/capacitivo de la célula y el amplificador, que pueden ser compensados, figura F.

En el modo de parche-perforado no rompemos la membrana sino que la nistatina permeabiliza la membrana en la zona parcheada, de forma que se logra el acceso eléctrico al interior celular pero sólo la sustitución parcial de la solución citosólica.

Las pipetas de patch, fabricadas de borosilicato (Harvard Apparatus, Kent, U.K.) de 1.5 mm y 0.86 mm de diámetro externo e interno respectivamente, se fabricaban al momento en un *puller* o estirador de pipetas de vidrio horizontal (Sutter instruments, Novato, CA); las pipetas en la solución debían tener una resistencia entre 3 a 7 MΩ. El electrodo de Ag/AgCl, reciclable, se cloró sucesivamente por inmersión en lejía.

Las soluciones de registro extracelulares o del baño contenían (mM): 145 NaCl, 2.8 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 CsCl, 10 glucosa, 10 Hepes; pH 7.4 ajustado con NaOH. En ciertos experimentos se usó una solución libre de iones divalentes basada en sodio (DVF) (mM): 145 NaCl, 2.8 KCl, 10 CsCl, 2 EGTA, 10 glucosa, 10 Hepes; pH 7.4 ajustado con NaOH. La solución intracelular o de pipeta contenía (mM): 145 CsMethanesulfonate, 8 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 6 MgATP (preparado en el momento del experimento), 0.2 EGTA, 10 Hepes; pH 7.2 ajustado con CsOH. Para algunos experimentos el valor de EGTA variaba hasta 10 mM, como se indica en la sección de *Resultados*.

Los registros de parche perforado requerían del ionóforo nistatina (150µg/ml; Sigma, Madrid). La solución con nistatina se preparaba al momento, de una solución madre de 50 mg/ml en DMSO, que se sonicaba (sonicador Franke en631 1/4; P-Selecta, Barcelona) antes de su utilización para disolverla adecuadamente, al menos durante 15 minutos (una vez la nistatina se introducía en la solución intracelular, la solución se vuelve a sonicar por 5 min). Todos estos procesos se daban en condiciones de mínima incidencia de luz sobre la nistatina, puesto que es altamente degradado por luz y temperatura, por lo que además, manteníamos la solución final a 4°C. Para evitar que se formaran poros en el momento de formación del sello de la pipeta con la membrana se sumerge la punta de la pipeta, apenas 1 o 2 s en solución libre de nistatina, para luego rellenar el contenido de la pipeta con la solución con nistatina.

Se analizaron parámetros básicos de la estabilidad del sello que nos permitían descartar registros defectuosos, por ejemplo con 'leak' de corriente elevado debido a la rotura parcial o total del sello. Las corrientes macroscópicas se registraron mediante un amplificador de patch clamp L/M-EPC7 (Heka, Alemania) a una velocidad de adquisición de 4KHz. La adquisición y el control de parámetros eléctricos del sello se realizaron con el software libre WinWCP3.2 (John Dempster, University of Strathclyde, U.K.) y se utilizó una *interface* CED1401 (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, U.K.). Para los registros de parche perforado se usó un amplificador de patch clamp Heka L/M-EPC7 (Heka, Germany). Los datos adquiridos, su análisis así como el comando de los potenciales fijados se controlaron con el software pClamp9 y el convertidor digital Digidata 1320A (Axon Instruments, Sunnyvale, CA). Para el inicio del registro en parche perforado hacemos un seguimiento constante de los transientes, y su crecimiento, durante los primeros minutos del gigasello, hasta indicar el acceso eléctrico al interior de la célula.

Las corrientes fueron registradas a una velocidad de adquisición de 10 kHz y el potencial de fijación fue de 0 mV. El protocolo estándar usado fue el de rampas de 500 ms, cada 5 s, y desde valores de -100 a +100 mV. Los datos fueron corregidos para el valor del potencial dependiente de las soluciones usadas (Junction Potential

Calculator, pClamp9 software, Axon Instruments, Sunnyvale, ecuación de Henderson). En algunos casos, se usó adicionalmente un protocolo de pulsos de potencial negativo (-80 mV).

Los datos se valoran obteniendo la amplitud de corriente para el potencial de -80mV, en cada rampa. Las primeras 3 rampas del protocolo previas a la aplicación de la droga se usan, en promedio, como el valor a sustraer o *leak*, para los valores siguientes al estímulo.

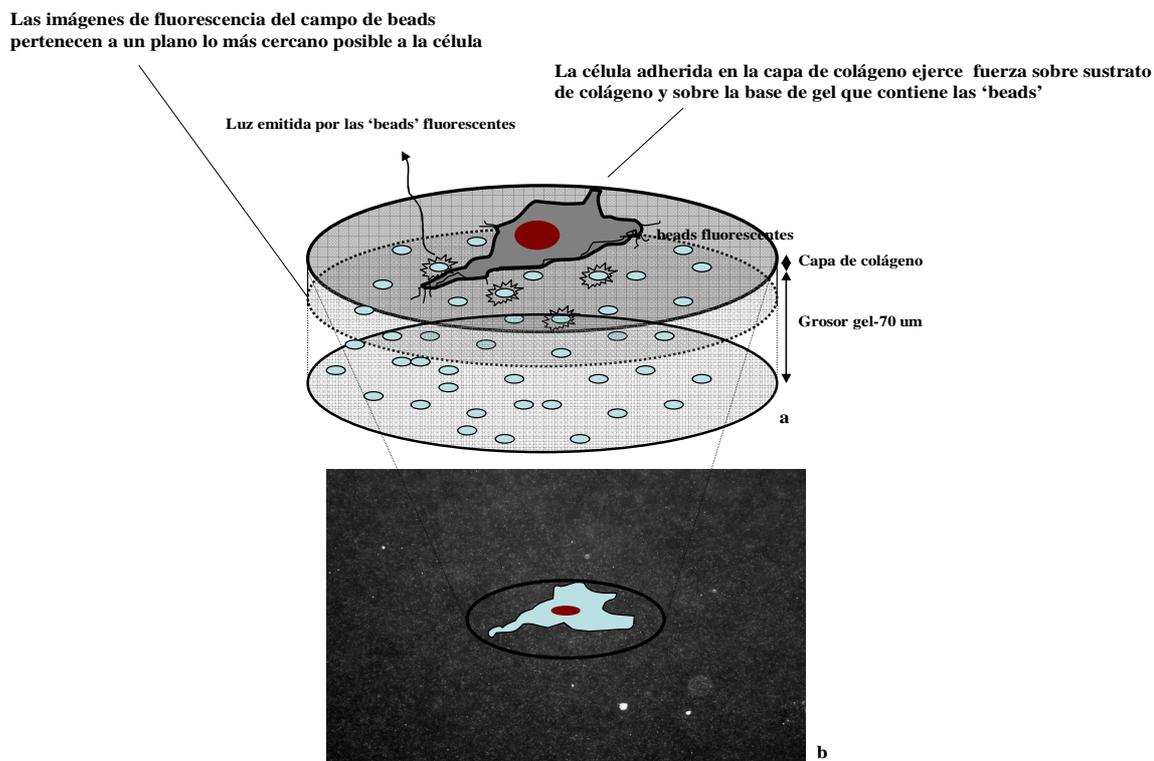
### **3d. Microscopía de tracción para medidas de contracción celular**

Las medidas de contracción celular se midieron con la técnica de microscopía de tracción, descrita previamente en (Butler et al., 2002; Gavara et al., 2006). Las células a baja densidad se plantan en una fina capa de un gel de poliacrilamida recubierto con colágeno, como se describe en el artículo de (Pelham, Jr. and Wang, 1997). Los geles de poliacrilamida contenían: acrilamida 2%, bis-acrilamida 0.3% y persulfato de amonio de Bio-Rad (Hercules, CA) en agua. Los geles elásticos contenían esferas o *beads* fluorescentes en luz verde, de látex ( $\Phi=0.2 \mu\text{m}$ ) de Molecular Probes (Eugene, OR) que están embebidas en el gel (1:125 vol/vol solución de beads en el volumen de la mezcla de acrilamida). El gel es elástico y bajo la fuerza de tracción de las células se deforma. Las células se encuentran en una cubierta de colágeno sobre el gel. Se disponen de 5-10  $\mu\text{l}$  de la solución 'gel-beads' en el centro de un coverslip con un vidrio circular, ocupando un espacio de aproximadamente 70  $\mu\text{m}$  de grosor y un diámetro de 8 mm. Finalmente, se coloca encima una capa de colágeno I (200- 400  $\mu\text{g/ml}$ ; *rat tail*) de Upstate (Lake Placid, NY) sobre el gel. Seguidamente, los geles se mantuvieron en la nevera a 4°C durante 3 h y tras varios lavados con PBS, el gel estaba preparado para plantar células en el medio: DMEM, 10% FBS, 1% estreptomycin/penicilina, 1% anfotericina B y 1% L-glutamina.

Los *coverslips* que contenían el gel con las células se montaron en un microscopio de fluorescencia invertido (Eclipse TE2000, Nikon) colocado en una mesa de aislamiento para vibraciones (Isostation, Newport, Irvine, CA). Las imágenes en campo brillante y las de fluorescencia se adquirieron con una cámara refrigerada de resolución de 12 bits (Orca, Hamamatsu Photonics). El tamaño aparente del pixelado después de la magnificación con el objetivo X40 fue de 0.16  $\mu\text{m}$  con un campo visual final de 161 x 161  $\mu\text{m}^2$ . Primero se toma una imagen en campo brillante de la célula aislada elegida para determinar su perfil. Seguidamente, se enfoca el gel con los *beads* fluorescentes, seleccionando un plano lo más cercano al plano de la célula. Los *beads* de los planos más próximos a la célula proporcionan información más exacta sobre la deformación del gel debido a la tracción de la célula en cuestión. Se toman fotos cada minuto de la imagen de fluorescencia de los *beads*, durante el experimento.

Tras un basal de 3 min, añadimos la droga ensayada. Finalmente, las células se extraen del gel, por exposición con tripsina 10X. Una vez la célula registrada desaparecía de la imagen, tomábamos una foto del mismo trozo de gel/beads, esta imagen sirve como referencia del gel 'relajado' (sin célula) y es la foto respecto de la cual se comparan el resto usando un software adecuado (Labview, Matlab) para determinar los desplazamientos de las *beads* durante el experimento tras el estímulo (imagen de referencia). En ciertas ocasiones, las células se desenganchan

parcialmente del sustrato, estos registros se descartaron.



**Figura 2** (a) Diagrama esquemático de la célula sobre el gel de poliacrilamida. (b) Esquema de la célula sobre imagen real del gel con las 'beads' o esferas fluorescentes.

Mediante un software especializado se procesaron cada una de las imágenes del campo de beads respecto la imagen de referencia, según el 'Método de Correlación de Imágenes' (Pelham, Jr. and Wang, 1997; Tolic-Norrelykke et al., 2002). La imagen se divide en ventanas cada vez más pequeñas, de forma iterativa, aumentando a cada iteración la resolución. Cada ventana se compara con su homóloga de la imagen de referencia, y se calculan las coordenadas del máximo de la función de correlación-cruzada o covarianza, que mide la similitud entre 2 señales de imagen para cada ventana. La tracción  $T(x, y)$  o fuerza ejercida por la célula sobre el sustrato en un plano de 2 dim  $(x, y)$ , depende del desplazamiento de los beads transformados mediante la *constrained Fourier Transform traction cytometry* (cFTTC) (método de cálculo basado en el análisis de Fourier, trata la observación del desplazamiento de un punto en  $\mathbf{r}$  en una superficie, debido la tracción generada en otro punto  $\mathbf{r}'$ , es una función que depende de la  $(\mathbf{r}-\mathbf{r}')$ ) (Butler et al., 2002) y del módulo de Young ( $E$ ) del gel; siendo éste, un parámetro característico del gel, que se puede considerar constante en todos los geles, y que en nuestros experimentos fue de  $6.609 \pm 942$  Pa (media  $\pm$  desviación estándar). La constante  $E$  se determinó mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) (Alcaraz et al., 2003; Rico et al., 2005). La magnitud fuerza total ( $F$ ) se calculó integrando  $T(x, y)$  sobre el área proyectada de la célula (Gaudet et al., 2003) aunque la fuerza vectorial total es cero, el módulo no es nulo y se ofrece como un índice útil para la medida de fuerza contráctil. Otro índice útil es el de la tracción media de la célula, calculado como  $F/\text{área célula}$ .

El resultado del parámetro F (nN) es en forma de escalar y la información para la tracción es vectorial, hay un vector calculado tras las iteraciones de resolución T(x, y)  
La resolución espacial del mapa de vectores de desplazamiento y de tracción fue de 1.3  $\mu\text{m}$ .

### **3e. Western-blots**

SDS-PAGE se realizaron usando el método Laemmli. Las muestras fueron electroporadas en geles 10% de sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide y transferidas en membranas de TBS; 20 mM Tris-HCl [pH 7.4] y 137 mM NaCl (TBT-BSA) durante 1 h. Las membranas, entonces, se incubaron con rabbit anti-TRPC<sub>1, 3, 4, 5, 6</sub> IgG (Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel) a 1:200 en TBT-BSA durante 1 h. Pasado este tiempo, las membranas se lavaron 3 veces con TBT-BSA e incubadas con anticuerpos IgG anti-rabbit con nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) siguiendo el procedimiento estándar. Los puntos de enlace de proteínas no específicas se bloquearon con una solución que contenía 2% de BSA y 0.1% Tween-20 en un buffer salino de Tris. Peroxidasa de rábano (HRP) a 1:2500 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) en TBS-T (0.1% Tween-20 en TBS) durante 1 h. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces en TBS-T y 2 veces en PBS. Para la detección de las bandas se usó el método de quimioluminiscencia con Immuno-HRPTM Star Substrate (Bio-Rad).

### **3f. Análisis estadístico**

Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar (media  $\pm$  sem). En los datos mostrados en gráficos vs tiempo, se utilizan ejemplos de trazas características del promedio o en otros casos, cada punto es un valor promedio de un número específico de 'n' experimentos. Las comparativas entre 2 grupos se analizaron según los tests de la 't' de Student, del software Prism 4.0 (Graphpad, CA). El análisis de la varianza (ANOVA, tests *Two-tailed*) se usa con el criterio de significancia de al menos  $p < 0.05$ . Las diferencias significativas se establecieron en  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*). Para la medida de relaciones lineales entre 2 variables se utilizó el coeficiente *r de Pearson* [-1,+1];  $r = \pm 1$  denota una correlación lineal perfecta positiva o negativa,  $r = 0$  denota ausencia absoluta de correlación lineal.

### **3g. Perfusión de segmentos anteriores *in vitro***

Para los experimentos de perfusión a presión constante se utilizó la técnica descrita por Erickson-Lamy y modificada posteriormente en nuestro laboratorio (Erickson-Lamy et al., 1988;Gual et al., 1997).

Esta técnica perfunde segmentos anteriores de ojo a presión constante en condición de cultivo de órganos con medio de cultivo y se mide la facilidad de evacuación a través de la vía convencional.

Se utilizaron ojos de ternera de 3 a 6 meses de edad procedentes del matadero local. Desde la muerte del animal a la enucleación transcurrió un tiempo de entre 0.5 y 2 horas y los ojos fueron mantenidos en tampón salino (PBS) a 4°C durante el proceso de transporte, de alrededor de 1.5 horas.

Se diseccionaron los ojos para obtener los segmentos anteriores que se colocaron y fijaron en una cámara de perfusión fabricada en polimetilsiloxane, especialmente diseñada mediante un anillo que ejercía presión por debajo del limbo esclerocorneal, permitiendo de esta manera la evacuación de medio únicamente por la vía trabecular.

La cámara de perfusión está diseñada de manera que los segmentos anteriores bovinos encajan perfectamente sin existir distorsiones en la posición de la esclerótica. La cámara está abierta por dos conductos de pequeño calibre situados en la base que mediante un sistema de tubos de polietileno que permiten la difusión de gases (O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>), los cuales se usan para ensamblar el espacio del segmento perfundido a un reservorio de medio y a un transductor de presión respectivamente. El espacio comprendido entre la cámara y el segmento anterior semeja la cámara anterior del ojo y permite un volumen de 1.8 ml de medio aproximadamente.

El reservorio de medio de perfusión está situado a cierta altura para mantener dentro del segmento anterior una presión de aproximadamente 10 mmHg durante todo el experimento. Este reservorio de medio se encuentra acoplado a un transductor de fuerza (Letica, Barcelona), el cual se conecta a un amplificador AMP 016/2 (Letica, Barcelona). Mediante una *interface* LE60-100 L/4 (Letica, Barcelona), el amplificador se conecta a un ordenador IBM-PC, que utiliza un software especial diseñado por Letica para la obtención de los datos. De esta manera se controla el volumen de medio que entra en el ojo, que será directamente proporcional a la disminución de peso del reservorio de medio. Por otro lado, la cámara de perfusión donde se encuentra el segmento anterior, también se halla conectada a un transductor de presión (Maxxim Medical, Athens, TX, USA) que mide a lo largo del tiempo la presión en el interior de la cámara.

Los segmentos anteriores fueron perfundidos con Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) con 5 mg/ml glucosa, 50 IU/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina, 5 µg/ml anfotericina B y 10 mM HEPES a 300 mOsm/Kg y pH 7.4 que fue preparado en condiciones estériles. Los experimentos se realizaron dentro de un incubador (P-Selecta, 4000602, Barcelona) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

El parámetro estudiado en estos experimentos fue la facilidad de evacuación (medida como la razón:  $F/F_{\text{basal}}$ , donde F: flujo a través de la malla trabecular). Los valores obtenidos de flujo de evacuación (µl /minuto) en un espacio de tiempo concreto fueron corregidos con los valores de presión en dicho periodo obteniendo valores de facilidad de evacuación (µl/min/mmHg). La facilidad de evacuación se obtuvo como un valor medio de las facilidades en periodos de 15 minutos haciendo el promedio de 180 puntos. Durante el periodo basal descartamos aquellos ojos que no mostraban una evolución estable (en los primeros 90 min de perfusión basal); es decir observamos que los valores de facilidad oscilaran en el rango de 0.4 y 1.3 µl/min/mmHg; descartando los que fuesen superiores o inferiores en un 10%.

Cuando se añadía una droga al medio de perfusión, todo el sistema de tubos y la cámara anterior artificial se vaciaba y se rellenaba con el nuevo medio. Esto se hacía

abriendo la aguja de salida de la cámara y permitiendo el paso de un volumen mayor del 200% (5 ml). Este cambio de medio se realizaba siempre a una presión inferior a 10 mmHg.

## **4. RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

### 4a. Señalización del Ca<sup>2+</sup> intracelular en células trabeculares por estímulo de sustancias vasoconstrictoras: bradiquinina y endotelina-1

Bradiquinina (BK) y endotelina-1 (ET-1) son péptidos activadores de receptores de membrana acoplados a proteína G<sub>q</sub>, la cual, a su vez, actúa sobre la enzima fosfolipasa C (PLC). BK y ET-1 inducen la descarga de calcio intracelular producida por la cascada de señalización de la PLC; esta enzima produce una molécula pequeña que se difunde rápidamente por el citosol, inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y una molécula de diacilglicerol (DAG) que permanece en membrana. El IP<sub>3</sub> activa los receptores-canal de IP<sub>3</sub> de los depósitos intracelulares como el retículo endoplasmático (ER) de forma que por difusión pasiva el calcio almacenado en el ER sale de este compartimento hacia el citosol. Los últimos estudios revelan que el incremento del calcio citosólico para este tipo de estímulos es de carácter bifásico, es decir, a la descarga inicial de calcio intracelular le sigue un influjo o entrada de calcio desde el medio extracelular (entrada 'capacitativa' de calcio; CCE). El valor neto del nivel de calcio citosólico que observamos resulta del balance entre los ritmos de descarga del calcio intracelular, el ritmo de su recuperación parcial hacia los depósitos nuevamente (ER y mitocondrias) y del ritmo de extrusión del ión hacia el medio extracelular por los intercambiadores de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> y la bomba Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, de la membrana plasmática.

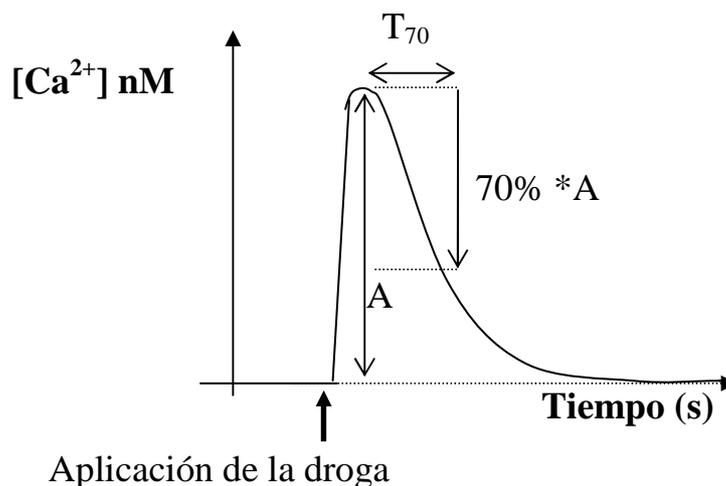
Las sustancias vasoconstrictoras, como la BK y la ET-1, son producidas en el endotelio y permiten la contracción de las paredes de los vasos sanguíneos y otras estructuras vasculares, en oposición a las sustancias vasodilatadores.

#### 4a.1 Calcio intracelular y extracelular en células trabeculares

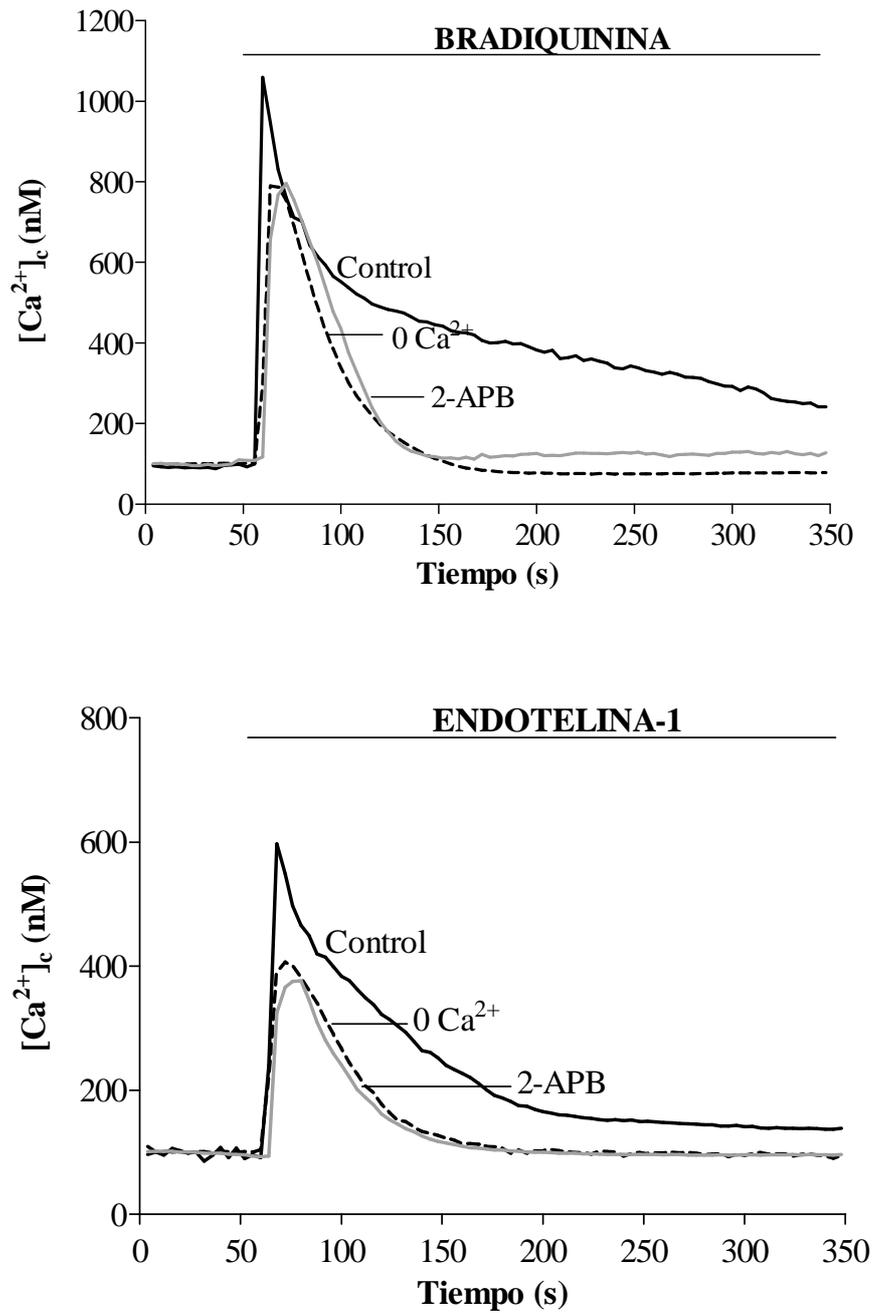
Para iniciar el estudio de la señalización de Ca<sup>2+</sup>, tras un tiempo (aprox. 1 min) de registro basal estimulamos células trabeculares bovinas con BK (1μM) y ET-1 (0.1μM) como vemos en la **fig. 1a**, aplicando la droga sobre el medio extracelular de células en cultivo. Tenemos un grupo control, en el cuál las células se hallan en un medio extracelular cuyo contenido de Ca<sup>2+</sup> es de 1.5mM (valor fisiológico), otro grupo de células en un medio libre de calcio, con EGTA 1.5mM (quelante de Ca<sup>2+</sup>) y otro, en un medio 'control' pero en presencia de 2-aminoetoxy difenilborato (2-APB) (50μM), preincubado de 2 - 3 min previos a la aplicación de la droga. El 2-APB es un bloqueante típico para la detección de canales dependientes de depósitos de calcio intracelular, los llamados: 'store-operated Ca<sup>2+</sup> channels' (SOCC). Además, las sustancias inhibitoras o bloqueantes de estos canales no son específicos para todo tipo celular. Bajo el nombre de SOCC se agrupan posiblemente, más de un canal con mecanismos de activación comunes y que permiten el paso de Ca<sup>2+</sup> (canales catiónicos selectivos y no-selectivos) pero con naturalezas proteicas distintas (grupos homoméricos y/o heteroméricos de una familia de proteínas extensa, las proteínas *TRP*, además de otras proteínas como las *Orai* que pueden también, formar parte del complejo estructural de estos canales). Esto puede explicar la variedad en los resultados de los estudios farmacológicos para determinar inhibidores o bloqueadores SOCC.

Vemos que en las tres situaciones ensayadas se dan variaciones en la concentración de calcio citosólico a modo de *pico o transitorio*. En la **fig.1b**, mediante el parámetro  $T_{70}$ , definido como el tiempo necesario para que el valor máximo o amplitud del pico, disminuya en un 70%. La amplitud se mide respecto a la concentración basal para cada célula.

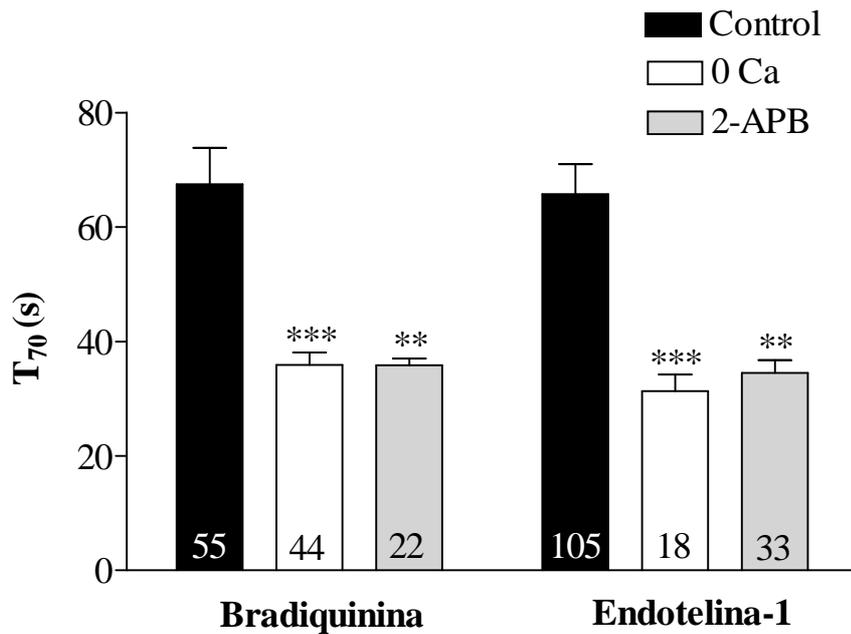
Observamos que existían diferencias significativas en el tiempo  $T_{70}$  (le podemos llamar también, tiempo de relajación) entre los dos grupos ensayados respecto al control, tanto con BK como con ET-1. El valor de calcio libre citosólico por encima del nivel basal, durante el proceso de relajación del pico, perdura más en el tiempo para el caso control que para los grupos experimentales. Es decir, el valor de  $T_{70}$  para el control es superior al valor de los grupos en ausencia de calcio extracelular (o Ca) o en presencia de 2-APB (**ver Tabla 1**). Mientras  $T_{70}$  asciende a casi 1 minuto en el control, los otros dos grupos mostraban valores alrededor de los 30 s, sugiriendo la presencia del influjo de  $Ca^{2+}$  extracelular por vía SOC y la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular, de los propios depósitos de la célula, tras el estímulo con BK y ET-1.



**Fig.1** Parámetros básicos de estudio: amplitud o valor máximo del transitorio o pico de  $[Ca^{2+}]$  (A) y  $T_{70}$ , intervalo de tiempo en el que  $[Ca^{2+}]$  disminuye un 70% de A.



**Fig. 1b** Variaciones del  $Ca^{2+}$  citosólico versus tiempo, en BTM estimuladas por bradiquinina ( $1\mu\text{M}$ ) y endotelina-1 ( $0.1\mu\text{M}$ ); control (traza continua), o calcio extracelular (discontinua) y en presencia de 2-APB (gris) (bloqueante conocido de algunas corrientes SOC).



**Fig. 1c** Estadística del parámetro T<sub>70</sub> (tiempo de relajación, 70% valor del pico), media ± sem (s). Existen diferencias significativas con el control, p < 0.0001 (\*\*\*) y p < 0.05 (\*\*). El número de células promediadas (n) se muestra en el interior de cada columna.

En la siguiente tabla vemos el resumen del resultado de las barras de la estadística **fig. 1c**, para T<sub>70</sub> (media ± sem.):

**Tabla 1.**

Parámetro T <sub>70</sub> [s]	Control 1.5 mM Ca	o Ca	2-APB
<b>Bradiquinina</b>	70 ± 7	35 ± 2	35 ± 1
<b>Endotelina-1</b>	65 ± 5	28 ± 3	34 ± 2

En relación a las amplitudes o valores máximos asumidos, la siguiente tabla muestra los promedios (media ± sem) de los 3 grupos comparados para ambas sustancias. El valor de Ca<sup>2+</sup> en el citosol se eleva por encima de 6 veces el valor de la concentración en reposo, o basal, (normalizada a 100 nM) tras el estímulo con las sustancias ensayadas. Para BK encontramos amplitudes menores en ausencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio, o bien, en presencia de 2-APB, para el caso de ET-1 no obtuvimos diferencias significativas entre el grupo control y el grupo o Ca (el incremento de Ca<sup>2+</sup> proviene exclusivamente de los depósitos intracelulares estimulados por IP<sub>3</sub>) pero sí hay diferencias a destacar en la comparativa entre control y 2-APB donde se observa la significativa disminución de la amplitud del pico, este efecto podría estar reflejando la habilidad de 2-APB para permeabilizar la membrana de la célula y bloquear el funcionamiento de los receptores de InsP<sub>3</sub>, o al menos un número significativo de éstos, el efecto está descrito en la literatura (**ver Introducción, aptdo 1.d.2**):

**Tabla 2.**

Amplitud [nM]	Control 1.5 mM Ca	0 Ca	2-APB
<b>Bradiquinina</b>	922 ± 72	654 ± 59	677 ± 61
<b>Endotelina</b>	613 ± 24	683 ± 105	360 ± 26

#### 4a.2 Sustancias bloqueadores de la entrada de calcio extracelular estimulado por bradiquinina o endotelina-1: 2-APB, La<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup> y SKF96365

Para determinar si existía efectivamente entrada de calcio externo, estimulada por bradiquinina, ensayamos otro protocolo, el llamado ‘Ca<sup>2+</sup> add-back protocol’, usado típicamente para distinguir y aislar el aporte de calcio intracelular del calcio que entra desde el exterior de la célula. Se trata de producir el estímulo en un medio extracelular libre de calcio. Una vez se ha movilizado el contenido de calcio intracelular (A1), y se han recuperado los niveles basales, se devuelve al medio su composición de calcio fisiológica para así observar la entrada de calcio desde el medio extracelular (A2):

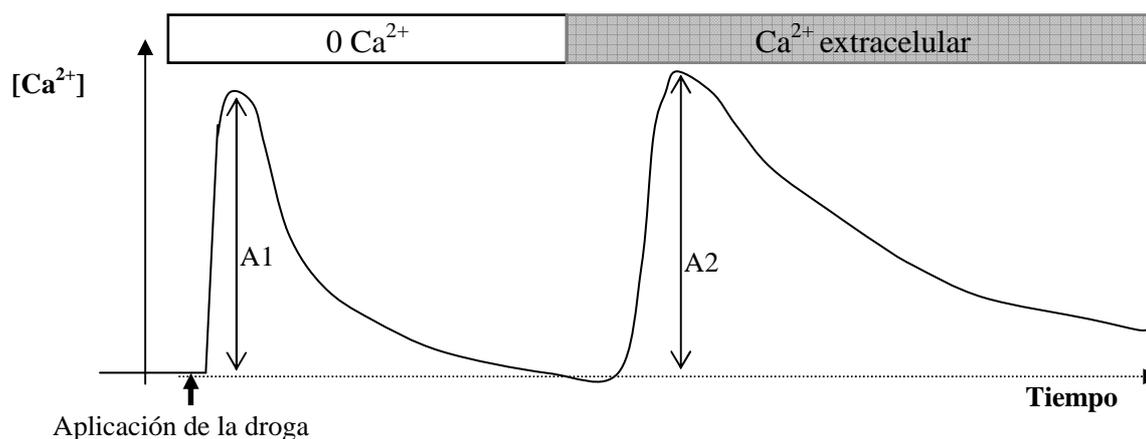
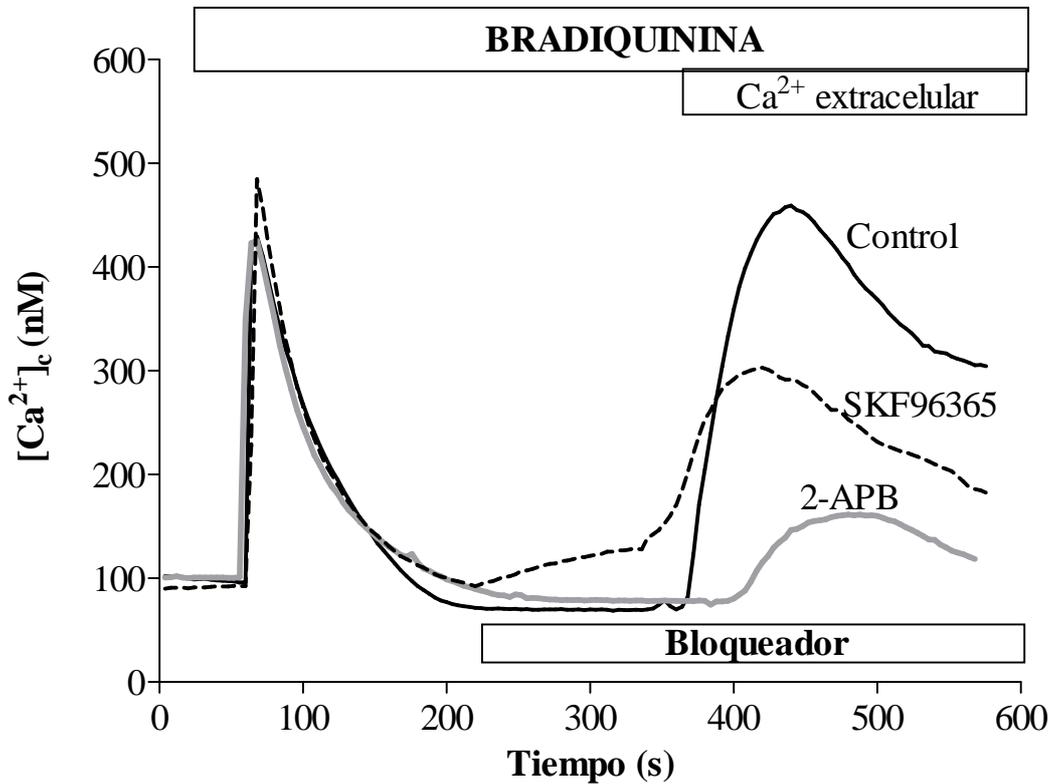


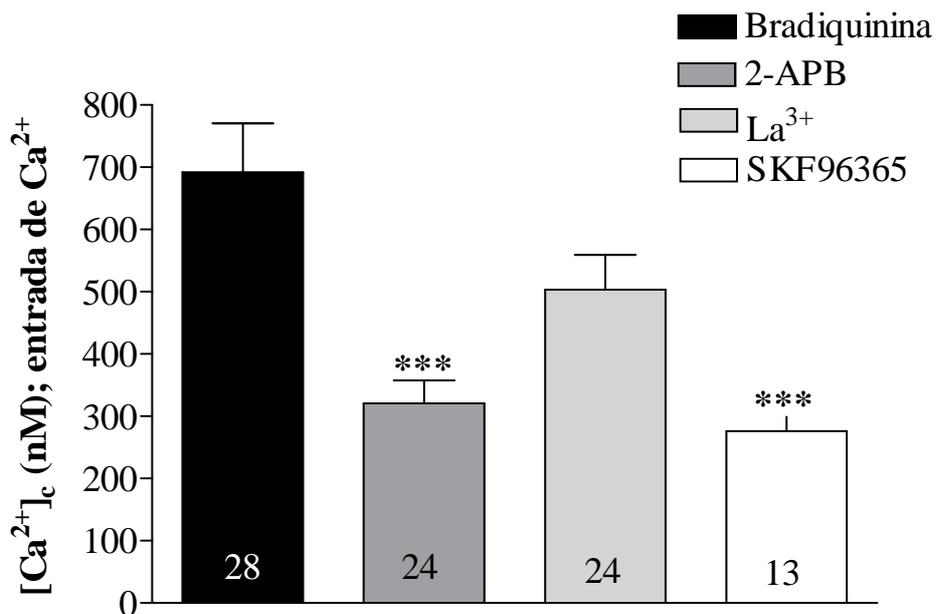
Figura 2. Protocolo de reintroducción de Ca<sup>2+</sup> al medio extracelular.

En la **fig.2a**, vemos como BK (1µM) produce una elevación del calcio en el citosol que proviene de los propios depósitos intracelulares con receptores para IP<sub>3</sub>. Tras la relajación del pico y recuperación de los valores basales, reintroducimos calcio al medio (1.5 mM) para así observar el incremento en el citosol de calcio del medio externo (control, traza de color negro). Para el estudio farmacológico de esta entrada de calcio, procedimos a la preincubación con diferentes bloqueadores conocidos de canales de calcio SOCC (*Store-Operated Calcium Channels*) como el 2-APB (50 µM), nuevamente, específico de los canales de calcio que operan con los depósitos de calcio, el lantano La<sup>3+</sup> (50 µM) menos específico, y que en este caso mostró menos capacidad de bloqueo y SKF96365 (10 µM), un bloqueador no específico de canales de calcio, pero que ha resultado ser más efectivo para los SOCC. Los valores máximos o amplitudes de concentración de calcio, en la segunda fase, propiamente la ‘entrada de calcio’, fueron comparados y se

muestran los valores y diferencias significativas respecto al control (**Fig. 2b**). Para el caso de 2-APB y SKF96365 la entrada de calcio se inhibió parcialmente (54% y 60% respectivamente;  $p < 0.001$ ). Para el lantano, la inhibición fue menor y no significativa respecto al control (27 %,  $p > 0.05$ ). Resultados similares se registraron estimulando con ET-1 (datos no mostrados).

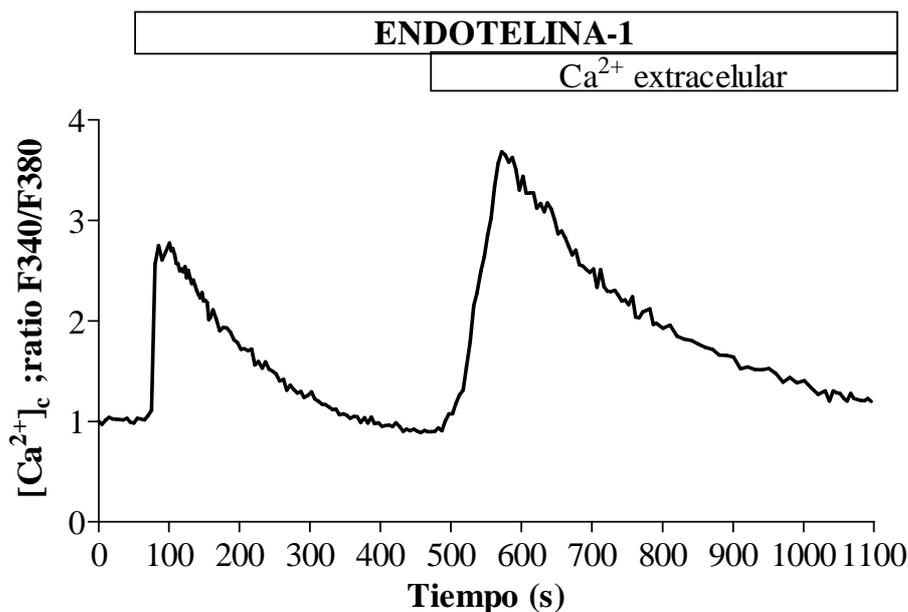


**Fig. 2a** Movilización de calcio intracelular por efecto de la BK en un medio libre de calcio y reintroducción posterior de calcio al medio (traza en negro, control); efecto de las sustancias preincubadas 2-APB (50 $\mu$ M) y SKF96365 (10 $\mu$ M), sobre la entrada de calcio (trazas gris y discontinua).

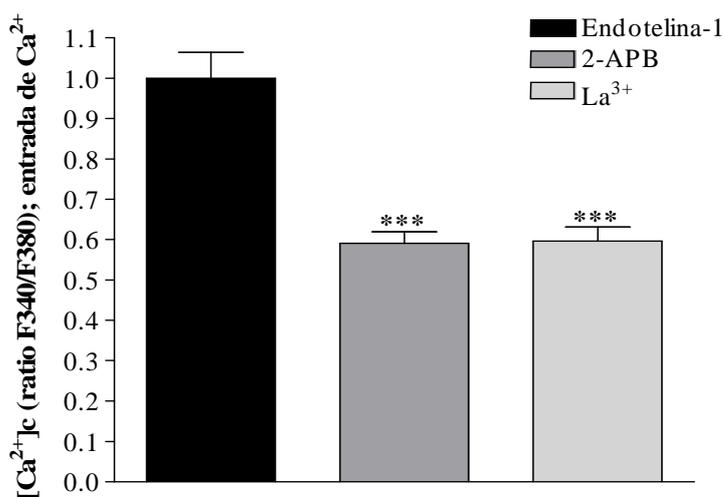


**Fig. 2b** Resumen estadístico (media  $\pm$  sem) del valor máximo de concentración de la entrada de calcio; sin aplicar sustancias bloqueantes, control (negro) y en presencia de sustancias bloqueantes de canales de calcio (2-APB, La<sup>3+</sup> y SKF96365). Observamos diferencias significativas del orden de  $p < 0.0001$  (\*\*\*) para 2-APB y SKF96365, y diferencias no significativas para la aplicación de La<sup>3+</sup>.

Resultados similares se obtienen en células trabeculares humanas de la línea hTM5. Siguiendo el mismo protocolo de reintroducción de Ca<sup>2+</sup> a posteriori, tras la aplicación de la droga, estudiamos el efecto producido por Et-1 (10 nM) en ausencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio y la reintroducción de calcio posterior. Y observamos que tanto 2-APB (50  $\mu$ M) como lantano (20  $\mu$ M) inhibían parcialmente el influjo de calcio extracelular. En la **fig. 2c**, observamos un ejemplo de variaciones de la concentración de Ca<sup>2+</sup> citosólico, en unidades arbitrarias, mediante las ratios de fluorescencia a 340 y 380 nm, normalizadas al basal. El esquema de barras resume la estadística de los valores promedio normalizados al valor control, de las amplitudes del pico de entrada de calcio en el control (barra en negro) y preincubando con 2-APB y La<sup>3+</sup> (**Fig. 2d**).



**Fig. 2c** Ejemplo de movilización de calcio por efecto de la Et-1 en un medio libre de calcio (1<sup>er</sup> pico) y reintroducción posterior de calcio al medio (2<sup>o</sup> pico) en hTM5.



**Fig. 2d** Diferencias significativas (\*\*\*) ( $p < 0.0001$ ) en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol (2<sup>o</sup> pico) respecto al control (barra en negro) por la preincubación de las sustancias: 2-APB ( $50\mu\text{M}$ ) y  $\text{La}^{3+}$  ( $20\mu\text{M}$ ), incorporadas al medio 2 min antes de la reintroducción de calcio extracelular.

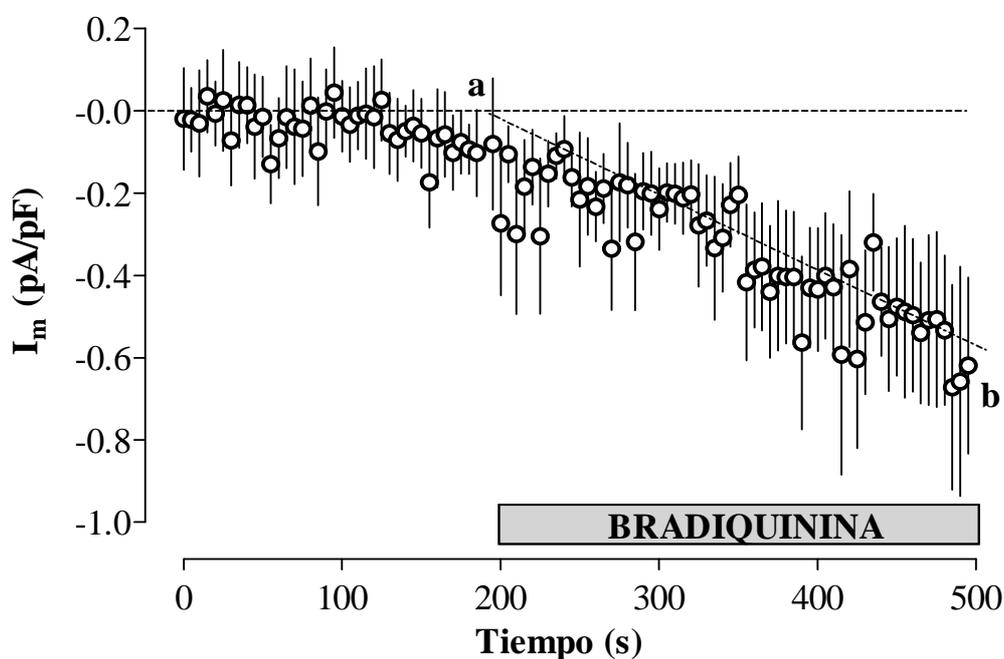
Observamos cómo la presencia de sustancias bloqueadores típicos de las corrientes SOC impiden la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  siguiente al estímulo con ET-1.

#### 4a.3 Corrientes activadas por bradiquinina: $I_{\text{BK}}$

Para medir corrientes iónicas transmembrana de forma directa, y confirmar la entrada de calcio externo al citosol, usamos la técnica de 'patch-clamp', en la configuración de 'parche perforado'. Aplicamos un protocolo de voltaje de rampas de  $-100$  a  $+100$  mV, cada 5s y mantenemos un  $V_{\text{holding}}$  de 0 mV, de esta forma

evitamos la activación de otras corrientes, como por ejemplo, de potasio. La solución interna (pipeta) contenía nistatina que produce ‘poros’ en la membrana que permiten sólo la diálisis de iones monovalentes, de forma que evitamos la pérdida de moléculas de la señalización intracelular del proceso activado. La solución de la pipeta contenía además Cs<sup>+</sup> como sustituto del K<sup>+</sup>.

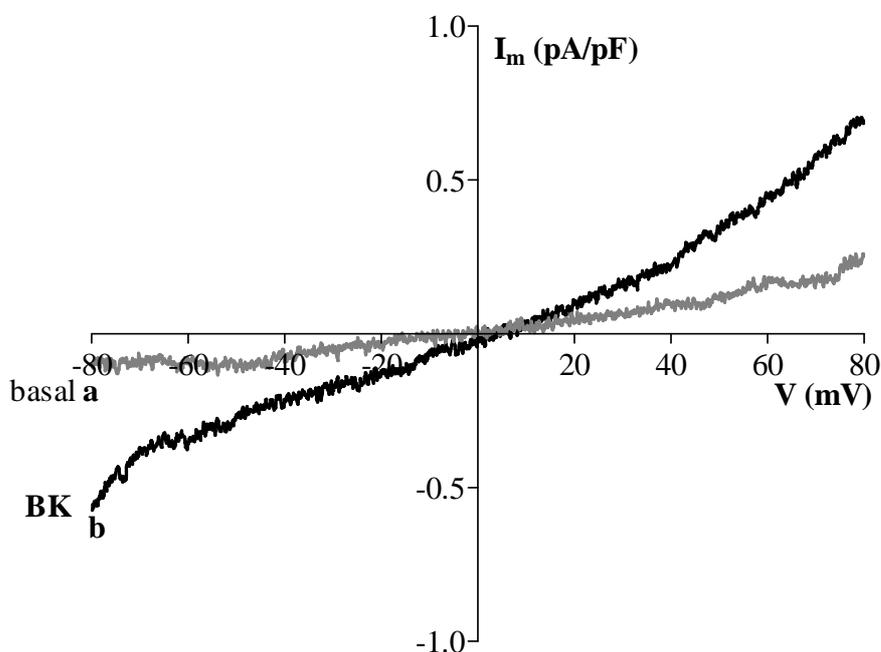
Obtuvimos registros ‘whole-cell’ de corrientes activadas por bradiquinina como los que se muestran en la **fig. 3a** (promedio para n= 10). En éstos se observa después de un periodo basal estable de unos 200 s, un incremento progresivo de las corrientes de entrada a la célula, de densidad:  $-0.53 \pm 0.18$  pA/pF, a -80 mV, tras la administración de BK (1 $\mu$ M) al medio extracelular (Ca<sup>2+</sup>, 10 mM). En nuestros registros, canales de potasio como los BK<sub>Ca</sub>, (Soto et al., 2004) podrían ser activados por depolarización o incluso por incrementos en el Ca<sup>2+</sup> citosólico y mezclarse con las corrientes SOCE que buscamos. Aunque la diálisis sustituye el K<sup>+</sup> por Cs<sup>+</sup>, según la solución intracelular que nosotros usamos, podría ocurrir que en los primeros instantes del registro aún permanecieran iones residuales de potasio, por lo que al medio extracelular añadimos tetraethylamonium (TEA, 10 mM), un bloqueador no específico de canales de K<sup>+</sup> (Liu et al., 2007). Los resultados con TEA mostraron la disminución de corrientes a potenciales positivos de K<sup>+</sup> o Cs<sup>+</sup>, en comparación con los registros para los que no se añadió TEA, quizás por una deficiente dialización teniendo en cuenta los valores de las corrientes que pretendemos aislar ( $I_{\text{SOCE}} \sim 1$  pA/pF). Sin embargo, los valores de corriente a potenciales negativos, es decir, la entrada de calcio estimulada por BK ( $I_{\text{BK}}$ ) en presencia de TEA no mostró cambios significativos (datos no mostrados).



**Fig. 3a** Densidad de corriente transmembrana vs tiempo ( $I_m = \mathbf{b} - \mathbf{a}$ , donde a: corriente basal) a -80mV, tras la aplicación de bradiquinina (**a**, t=200s) y registro durante 300s (**b**) (n=10, promedio  $\pm$  sem).

En la **fig. 3b** observamos la relación I vs V antes (a) y 300s después (b) de la aplicación de BK. Tanto a potenciales hiperpolarizantes como a depolarizantes, las

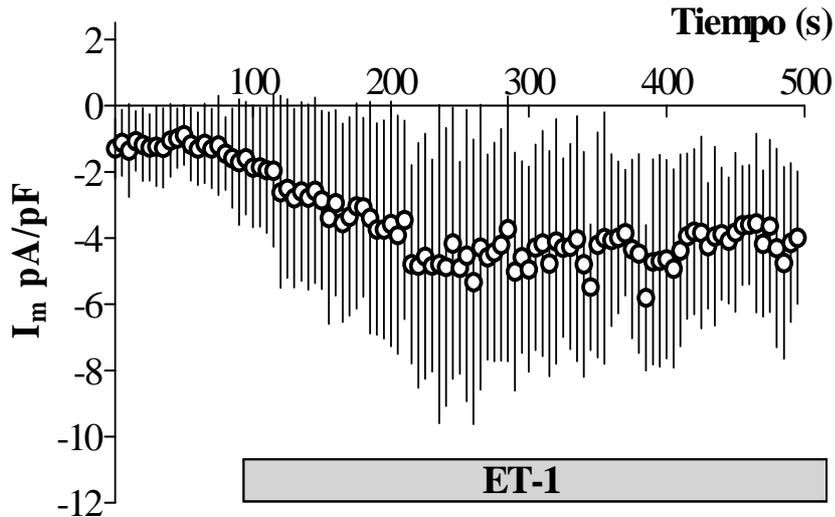
corrientes activadas aumentaron en relación al basal. Sólo a los potenciales más negativos se aprecia una ligera rectificación de entrada y el potencial de reversión es ligeramente positivo, de aproximadamente +6 mV.



**Fig. 3b** Promedio de la relación corriente  $I_m$  vs voltaje  $V$ , antes de la aplicación de Bk (a) y 300s después (b). Se observa un aumento de  $I_m$  tanto a potenciales negativos como positivos.

BK estimula el vaciamiento de los depósitos con receptores para  $IP_3$ , por lo que cabría esperar activación de corriente de tipo 'store-operated' (SOC o  $I_{soc}$ ) o también llamada corriente de calcio capacitativa (CCE o  $I_{CCE}$ ) y por otra parte, la producción de DAG (vía de señalización de BK y ET-1, Fig.11, aptdo. 1d. Introducción) puede activar la entrada de calcio 'no-capacitativa' (NCCE o  $I_{NCCE}$ ) o llamada también, corriente de calcio activada por receptor (RACC). La primera  $I_{SOC}$  activada por la descarga de calcio intracelular que mejor fue caracterizada se conoce por su nombre en inglés: *Calcium Release-Activated Calcium Currents* o corrientes CRAC, y son fuertemente rectificadoras de entrada, con potenciales de reversión de +60 mV, cercanos al potencial de reversión del calcio. Recientes estudios muestran que las corrientes CRAC no suelen activarse aisladamente, sino que a su vez se mezclan con otras corrientes, no-selectivas para el calcio, que desplazarían el potencial de reversión cerca del 0, enmascarando la pequeña porción selectiva ('Dissecting  $I_{crac}$ , a store-operated calcium current', Patrick G. Hogan and Anjana Rao (2007); Biochemical Sciences).

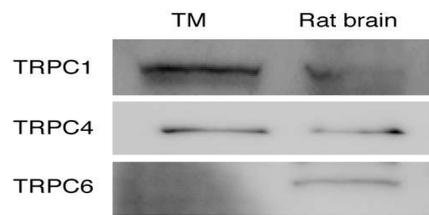
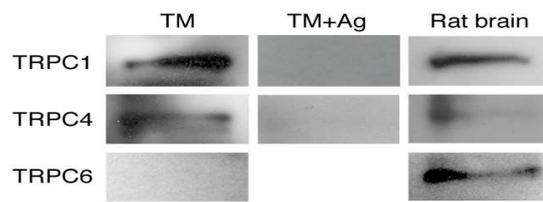
Resultados preliminares, aplicando el mismo protocolo que para BTMs, muestran las corrientes de entrada inducidas por ET-1 (10 nM) en hTM5. Obtuvimos registros (n=3) que determinaban una corriente transmembrana catiónica hacia el interior de la célula, entre -3 y -4 pA/pF, a partir de la aplicación de la droga (t=100s) (**fig.3c**)



**Fig. 3c** Densidad de corriente transmembrana vs tiempo ( $I_m$ ) a -80 mV, tras la aplicación de ET-1 (10nM) (a,  $t = 100s$ ) y registro durante 400s ( $n=3$ , promedio  $\pm$  SD).

#### 4a.4 Proteínas de canal TRPC identificadas en células trabeculares

Ciertas proteínas de la familia de proteínas *transient receptor potential* (TRP), en concreto las pertenecientes a la subfamilia TRPC o 'canónicas', han sido propuestas para la identidad de los canales dependientes de los depósitos intracelulares o SOCC. Hemos testado mediante 'western-blot' en células TM la presencia de algunas de estas proteínas TRPC1, 3, 4, 5 y 6. En células trabeculares bovinas se detectaron bandas específicas para TRPC1 y 4, mientras que para TRPC6 los niveles de proteína eran indetectables (**Fig. 4**). Se procedió a los controles con antígenos, observando que las bandas para esas proteínas desaparecían. Por otra parte, como controles positivos, se usaron extractos de cerebro de rata, donde es conocida la expresión de estas proteínas. Con los anticuerpos utilizados para TRPC3 y TRPC5, no se obtuvieron bandas claras en los tamaños moleculares correspondientes, pero no se descarta definitivamente su presencia.



**Fig. 4** Western-blot de las proteínas TRPC halladas en células trabeculares bovinas en cultivo (imagen superior) y en tejido (imagen inferior). En ambos casos, los resultados determinantes son para las bandas de TRPC1 y 4, indicando su presencia en BTMs.

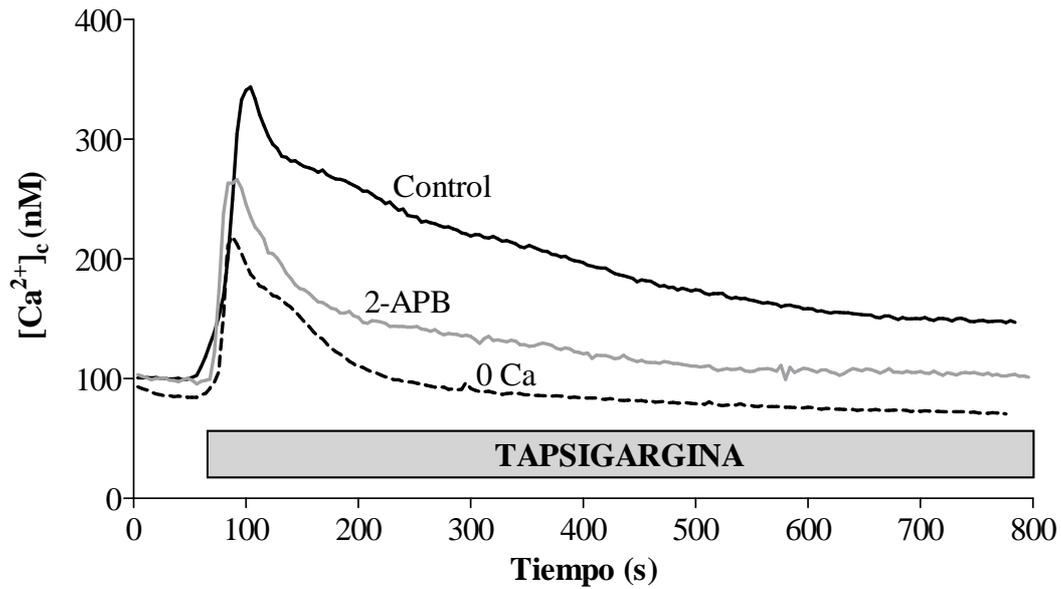
#### **4b. La depleción de los depósitos de calcio intracelulares activa la entrada ‘capacitativa’ de calcio (*store-operated calcium channel*, SOCC)**

La llamada, originalmente, entrada de calcio ‘capacitativa’ o dependiente de los depósitos intracelulares ha sido una cuestión difícil de resolver, pero después de más de una década de estudio intenso ya empieza a concretarse. No se sabía cómo los depósitos de calcio de la célula dan la o las señales para que ciertos canales de calcio, en la membrana, se activen. Recientemente, se ha determinado que es una proteína con afinidad al calcio, las *stromal interaction molecule* (STIM) contenida en el ER, las responsables primeras de la cadena de señalización hasta la membrana. Las STIM serían sensores del contenido de calcio de los depósitos, en una situación de bajo contenido de calcio, estas proteínas cambiarían su forma y posición para activar la entrada de calcio extracelular, mediante la interacción física con otras proteínas de la membrana (Orai1 y proteínas TRPC) que formarían los canales de calcio ‘capacitativos’ (*store-operated calcium channels*, SOCC).

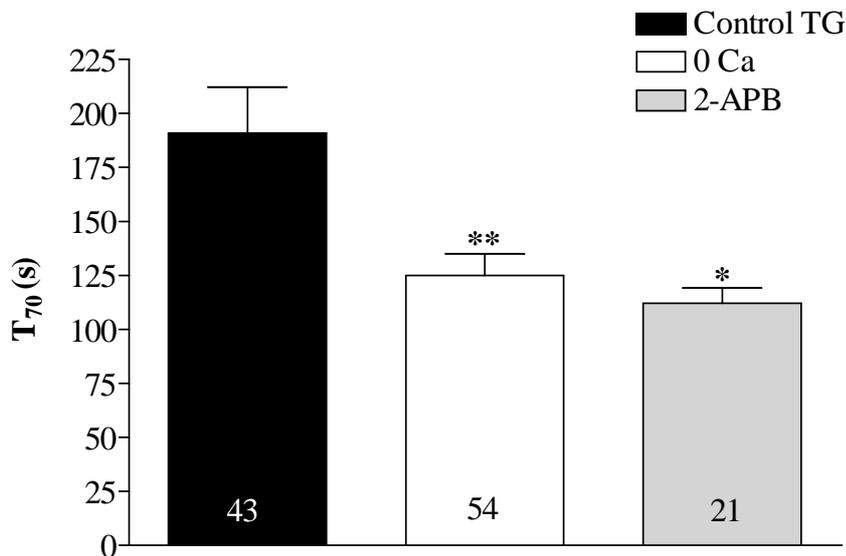
Para estudiar esta corriente de entrada de calcio, promoviendo directa y únicamente la depleción de calcio en los depósitos, se usan típicamente sustancias como la tapsigargina (TG) y el ácido ciclopiazónico (CPA). Estas sustancias bloquean la actividad de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (SERCA) del retículo endoplasmático (ER) para que de forma pasiva, por canales de leak de calcio, comunes en el retículo, se vacíe el depósito sin poder recuperarse. En este experimento no se ven implicadas la activación de receptores, la vía PLC, ni ninguno de sus productos derivados.

##### **4b.1 Señalización de calcio activada por tapsigargina**

Estimulando con tapsigargina (TG,  $1\mu\text{M}$ ) las células en cultivo, según el mismo protocolo que el utilizado para BK y ET-1 (apartado 4a.1), obtuvimos transitorios o picos de calcio de larga duración (varios minutos). El parámetro  $T_{70}$  reveló que para condiciones control o fisiológicas, el tiempo de relajación del pico era significativamente mayor ( $190 \pm 21$  s) al tiempo promedio necesario en un medio libre de calcio ( $125 \pm 10$  s;  $p < 0.01$ ) o en presencia de 2-APB ( $50 \mu\text{M}$ ) ( $112 \pm 7$  s;  $p < 0.05$ ) (**fig. 5a y 5b**). Estas diferencias sugerían nuevamente como en el caso de la BK y la ET-1, que la simple descarga de calcio del ER o el bajo nivel de contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en el ER activa la entrada de calcio extracelular.



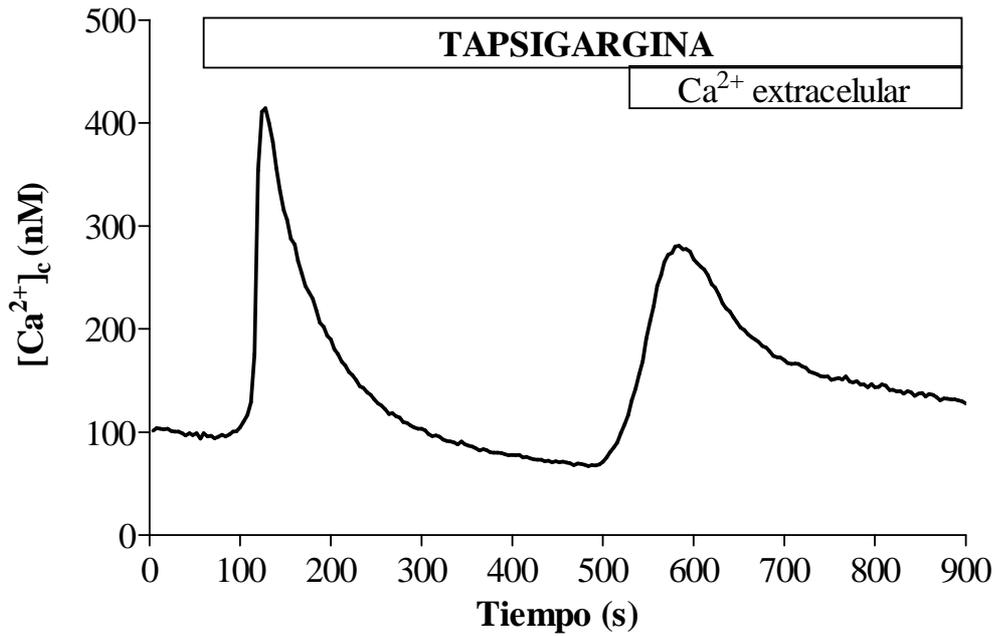
**Fig. 5a**



**Fig. 5b**

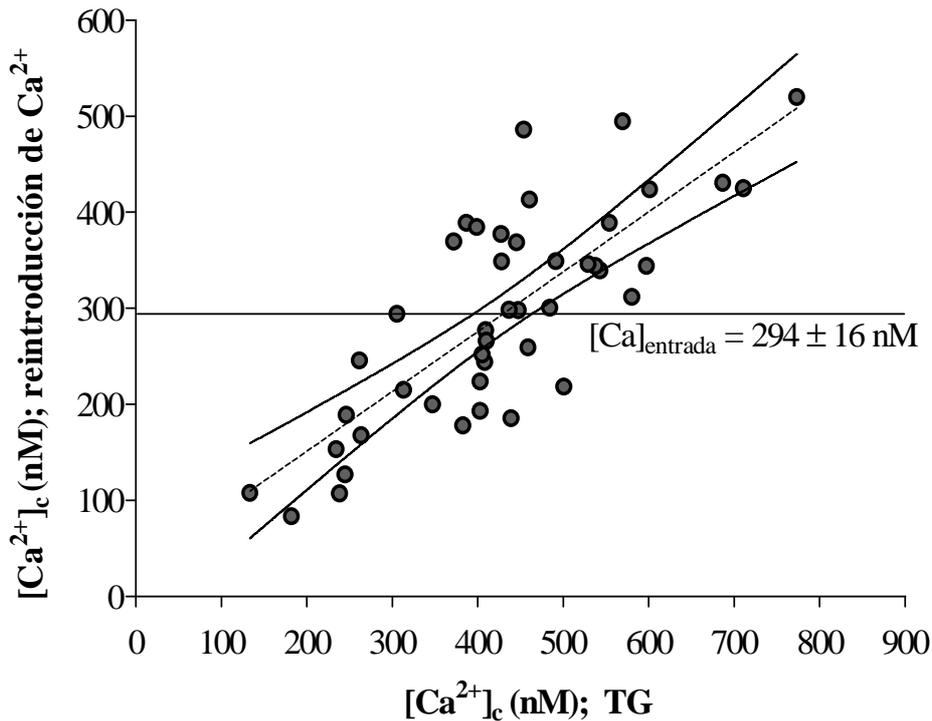
**Fig. 5a y 5b** Variaciones del calcio citosólico vs tiempo en BTM estimuladas por tapsigargina, control (traza continúa), o calcio extracelular (discontinua) y en presencia de 2-APB (gris); **b**, estadística del parámetro T<sub>70</sub>, media ± sem.

El segundo protocolo, de reintroducción de calcio al medio (*Ca-add back protocol*), aislamos la componente de calcio proveniente del medio extracelular de la componente intracelular. En las células tratadas (n=40) después de un pico de calcio inicial tras la estimulación con TG, en un medio libre de calcio, obteníamos un segundo pico inmediato, al reintroducir calcio (**fig.6a**).



**Fig. 6a** Tras la estimulación con TG en un medio libre de calcio, observamos la salida de calcio intracelular hacia el citosol; una vez se retorna a los niveles basales se reintroduce calcio (concentración fisiológica) e inmediatamente se registra un incremento rápido pero que disminuye de forma más lenta; es calcio que proviene del medio externo.

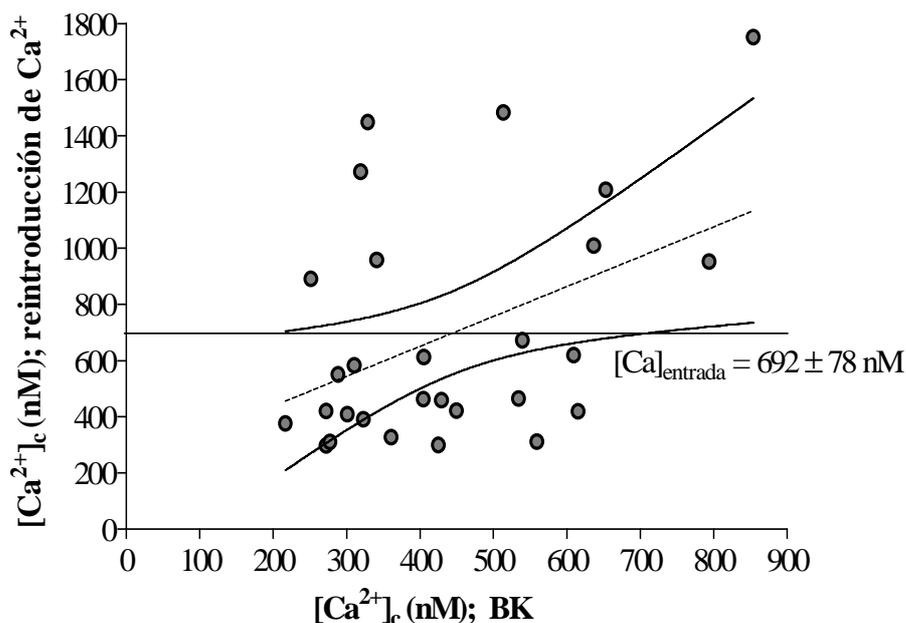
Por otra parte, existía una relación proporcional y directa entre el primer pico o descarga de calcio intracelular desde el ER y el valor máximo de concentración de calcio que se alcanzaba en correspondencia en el segundo pico, o entrada de calcio. Apreciamos esta relación en la **fig.6b**, el resultado de correlación lineal es significativo (Pearson  $r = 0.788$ ,  $p < 0.0001$ ). A mayores valores de calcio descargado desde los depósitos intracelulares mayor es la entrada de calcio. El valor promedio del máximo de calcio intracelular en ausencia de calcio es de:  $420 \pm 20$  nM, y para el calcio entrante tras el estímulo:  $294 \pm 16$  nM.



**Fig. 6b** Observamos que existe alta correlación lineal (Pearson  $r = 0.788$ ) entre el máximo del pico de descarga inicial (eje x) y el máximo del segundo pico tras la reintroducción de calcio al medio (eje y).

Esta relación no se conserva para el estímulo con BK (de los experimentos del apartado 4a.2, relación de amplitudes de la traza control de la fig. 2a). Vemos en la **fig. 6c**, como la amplitud del pico inicial, o descarga de calcio intracelular, no es tan determinante para el valor del máximo del segundo pico o entrada de calcio. A diferencia de la TG, el influjo de calcio estimulado por BK no depende del grado de vaciamiento de los depósitos de calcio, puesto que no existe correlación lineal significativa (Pearson  $r = 0.432$ ). El valor promedio del máximo de calcio intracelular en ausencia de calcio es de:  $439 \pm 32$  nM, y para el calcio entrante tras el estímulo:  $692 \pm 78$  nM.

El promedio de  $\text{Ca}^{2+}$  movilizado desde los depósitos es similar entre ambos grupos (TG y BK), de hecho, no son estadísticamente distintos. En cambio, los valores máximos para la entrada de calcio sí muestran diferencias significativas entre ambos grupos ( $p < 0.0001$ ).



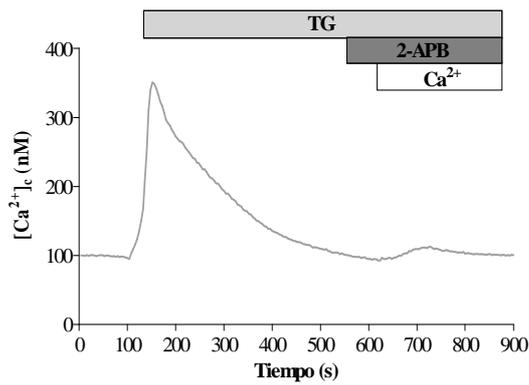
**Fig. 6c** Baja correlación (Pearson  $r=0.43$ ) entre los valores máximo del primer pico estimulado por Bk (eje x) y el máximo del segundo pico tras la reintroducción de calcio al medio (eje y).

Los ensayos con ET-1, al igual que para el estímulo con BK, no mostraron correlación entre los valores de descarga y la entrada posterior de calcio, tras su reintroducción al medio (datos no mostrados).

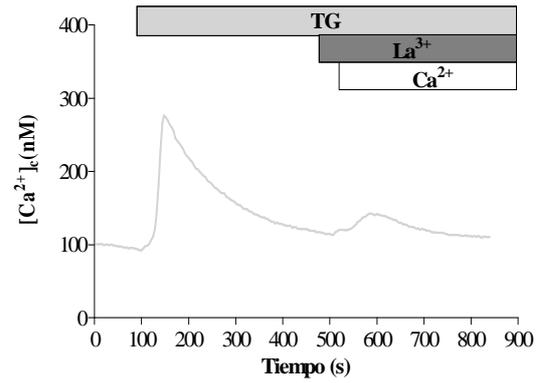
Estos resultados sugieren que la entrada de calcio estimulada por sustancias vasoconstrictoras podría producirse a través de canales capacitivos (SOC), a la vez que, por otros canales de calcio, activados por receptor (*receptor-activated calcium channels*, RACC) que no son dependientes de los depósitos intracelulares.

#### **4b.2 Sustancias bloqueadoras de la entrada de calcio estimulada por tapsigargina: 2-APB, $\text{La}^{3+}$ , $\text{Gd}^{3+}$**

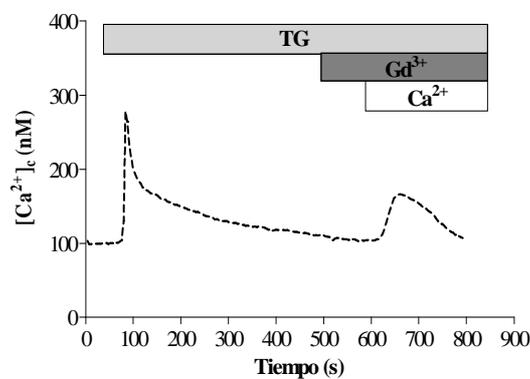
Para la caracterización farmacológica con bloqueadores conocidos de corrientes de tipo capacitivas usamos las sustancias 2-APB (50  $\mu\text{M}$ ),  $\text{La}^{3+}$  (20  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{Gd}^{3+}$  (20  $\mu\text{M}$ ), según el protocolo '*Ca-add back*'. Las sustancias bloqueadoras, ensayadas en 3 grupos distintos, son preincubadas de 2 a 3 minutos, antes de añadir el calcio. Vemos en la **figura 7a**, el efecto bloqueador de 2-APB (62.1%;  $p < 0.001$ ;  $n=18$ ). Para los iones trivalentes, en **fig. 7b y 7c**,  $\text{La}^{3+}$  (51.7%;  $p < 0.001$ ;  $n=60$ ) y  $\text{Gd}^{3+}$  (44.6%;  $p < 0.001$ ;  $n=17$ ) se registraron también inhibiciones altamente significativas respecto al valor de entrada de calcio 'control', es decir, sin bloqueadores. En el diagrama de barras (**fig. 7d**) aparecen los valores de amplitud del segundo pico o entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , en presencia de los distintos bloqueadores comparados respecto al valor control (barra en negro).



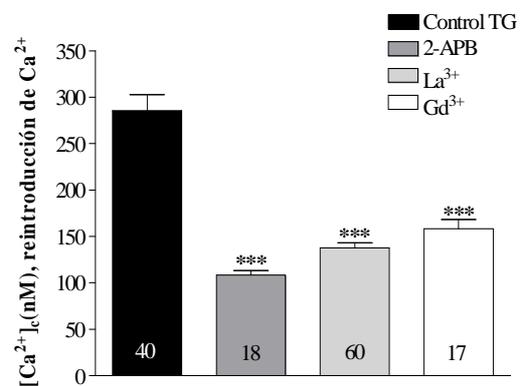
7a



7b



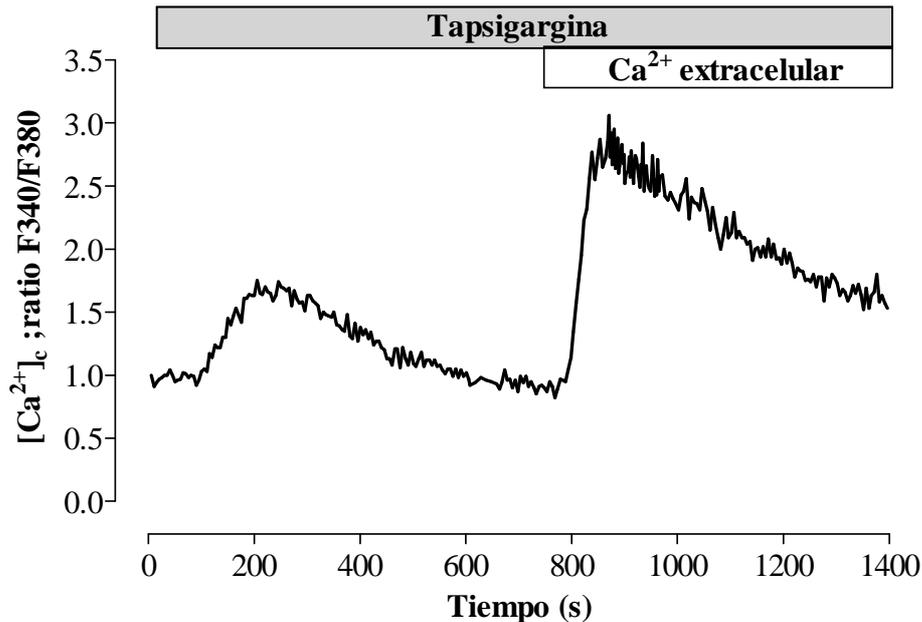
7c



7d

**Fig. 7a, 7b y 7c** Trazas ejemplo de la movilización de calcio tras el bloqueo de la SERCA con TG en un medio libre de calcio, y la posterior reintroducción de calcio en presencia de diferentes bloqueadores de la entrada de calcio, (a) 2-APB (50  $\mu$ M), (b) La<sup>3+</sup> (20  $\mu$ M) y (c) Gd<sup>3+</sup> (20  $\mu$ M) (preincubación de 2 min); **Fig. 7d** resumen estadístico del máximo de entrada de calcio (segundo pico) en presencia de 2-APB, La<sup>3+</sup> y Gd<sup>3+</sup>.

Estudios en la línea hTM5, muestran que el estímulo con TG permite la entrada de calcio (CCE) (**fig. 7e**; resultados análogos a las trabeculares bovinas) y su inhibición en presencia de 2-APB, en más de un 50% (datos no mostrados).



**Fig. 7e** Ensayos en hTM5 muestran un comportamiento muy similar al observado en BTM, se aplica la TG en un medio libre de calcio y se produce un incremento del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Una vez se recupera el contenido basal nuevamente, se devuelve el calcio extracelular y se observa un segundo incremento de la concentración citosólica de este ión, proveniente del exterior celular. En el gráfico vemos una traza ejemplo para la ratio de las fluorescencias a 340 y 380, normalizada al valor basal inicial del experimento.

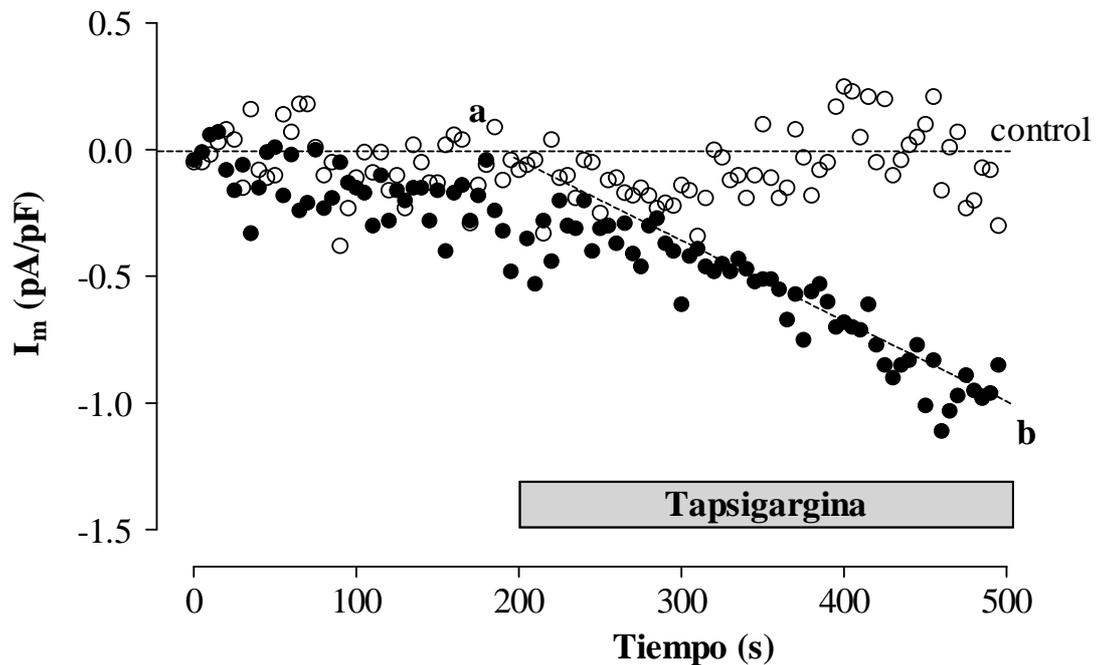
### 4b.3 Corrientes activadas por depleción de los depósitos intracelulares de calcio: tapsigargina y $\text{IP}_3$

#### 4b.3a Tapsigargina (TG)

Nuevamente, para medir directamente corrientes iónicas transmembrana necesitamos registros de patch-clamp, en la configuración de 'whole-cell'. Para estudiar la CCE, en BTMs, puesto que se ha descrito que la activación de la corriente CCE ( $I_{\text{CCE}}$ ) sólo depende del estado de depleción de los depósitos celulares de su contenido basal de  $\text{Ca}^{2+}$  (principalmente, ER), utilizamos dos protocolos diferentes de 'vaciado', aplicando TG al medio o mediante la diálisis de  $\text{IP}_3$  (+EGTA) en la solución de la pipeta/intracelular.

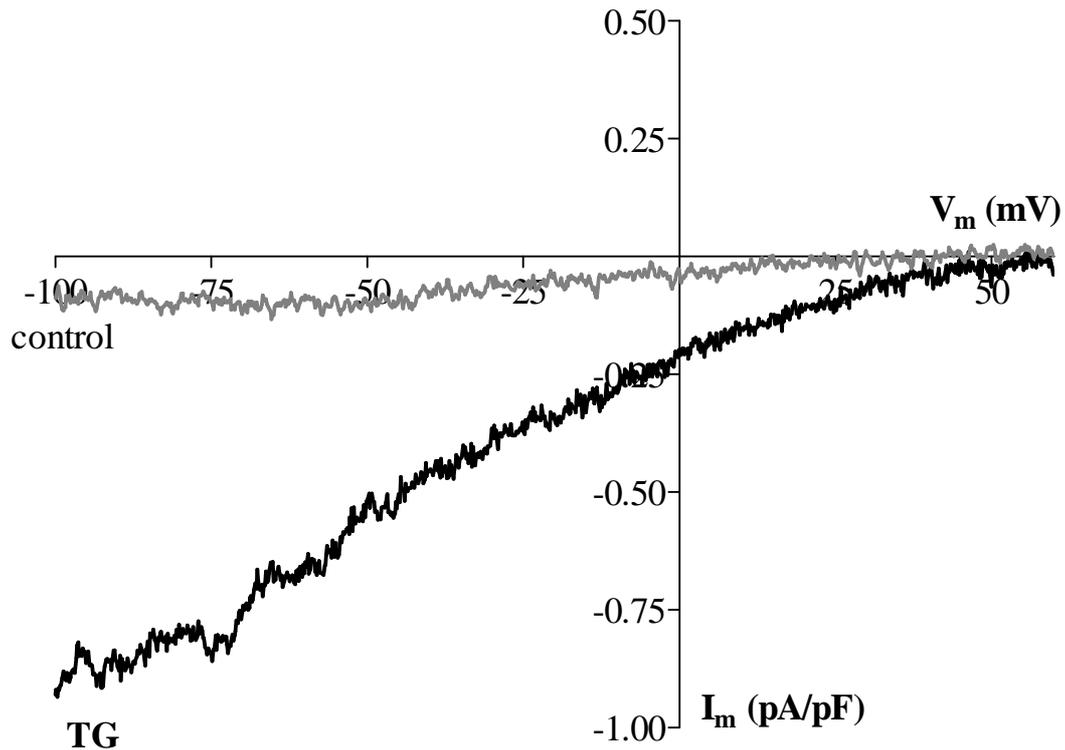
Usando el mismo protocolo de voltaje que en la fig. 3a, vemos en la **fig. 8a**, el incremento lineal de corrientes de entrada de calcio tipo CCE tras la aplicación de TG ( $1\mu\text{M}$ ) a la solución externa ( $\text{Ca}^{2+}$ , 10 mM). El ER no recupera su contenido basal de calcio debido a que el efecto de la TG, irreversible y persistente, consiste en el bloqueo de la bomba de ER para la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol hacia el lumen de ER (SERCA). La solución intracelular contiene 0.2 mM EGTA, para mantener un nivel de 'buffering' de  $\text{Ca}^{2+}$  en el rango fisiológico.

La corriente CCE alcanza un valor de  $-1.11 \pm 0.20$  pA/pF a -80 mV, pasados 300 s después de la aplicación de la TG (n=6), frente al control (sin estímulo).



**Fig. 8a** Densidad de corriente transmembrana vs tiempo ( $I_m=b-a$ , a: corriente basal) a  $-80\text{mV}$ , tras la aplicación de tapsigargina (**a**,  $t=200\text{s}$ ) y registro durante  $300\text{s}$  (**b**) ( $n=6$ , círculos negros). Control, en ausencia de estímulo (círculos blancos,  $n=4$ ).

Asimismo, estos registros muestran una relación I-V de la corriente estimulada por TG rectificadora de entrada, que corta en el eje de potenciales a valores cercanos a  $+60\text{ mV}$ , característica propia de las corrientes CRAC ( $V_{\text{reversión}} = +60\text{ mV}$ ). Podemos ver la traza promedio en la **fig. 8b**:

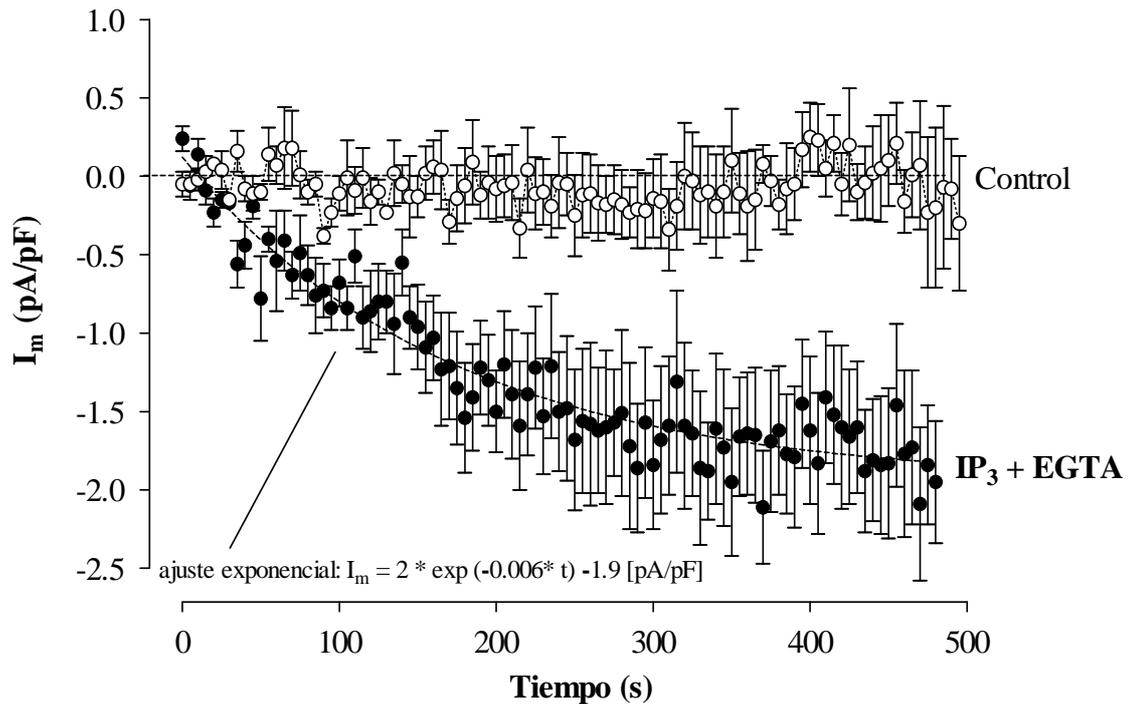


**Fig. 8b** Promedio de la relación corriente vs voltaje, tras la aplicación de TG durante 300s (traza en negro). Rectificación de entrada que muestra el corte del potencial de reversión cerca de +60 mV. Control, sin estímulo (traza en gris).

#### 4b.3b 1, 4, 5 inositol-trifosfato (IP<sub>3</sub>)

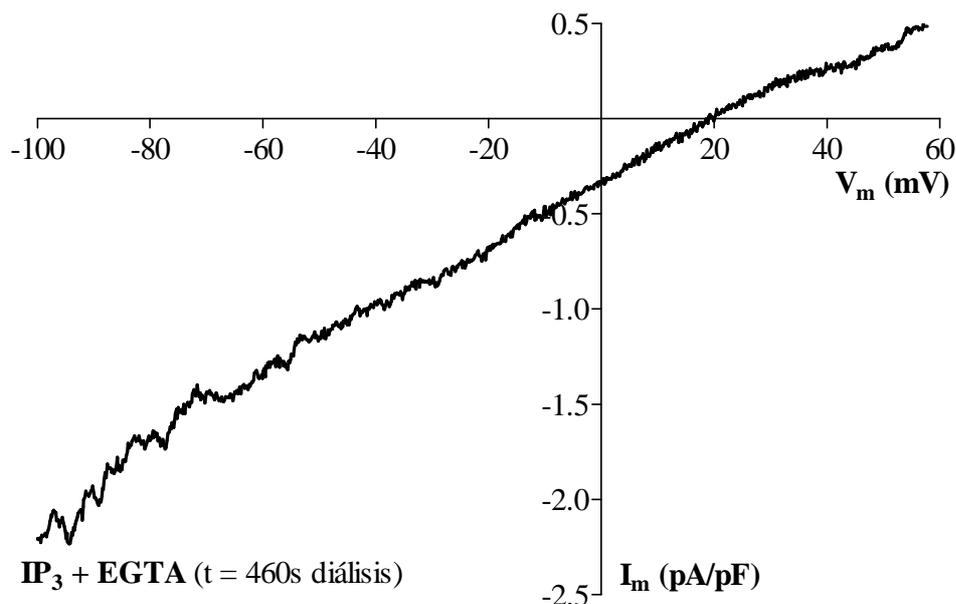
El otro grupo de experimentos, usando IP<sub>3</sub> (30 μM) en la solución intracelular que dializa la célula, es un estímulo más fisiológico que la estimulación por Tg, la descarga de calcio intracelular por estímulo de IP<sub>3</sub> (activa y abre los canales/receptor IP<sub>3</sub>R que permiten la salida de Ca<sup>2+</sup> del lumen del retículo hacia el citosol, de forma pasiva, por la gran diferencia de gradiente) forma parte de la cascada de señalización de aquellos receptores de la membrana plasmática acoplados a proteína G (activación de la PLC).

Estas condiciones estimulan una corriente de entrada, cuyo valor es de  $-1.77 \pm 0.53$  pA/pF (n=6) pasados 460 s desde el inicio de la diálisis (whole-cell), a un potencial de -80 mV (**fig. 9a**). El incremento es mayor y más rápido en comparación a los valores obtenidos para la corriente de entrada estimulada con TG. Además, el contenido elevado de EGTA (10 mM) de la solución intracelular que el calcio liberado en el citosol, de forma que el ER no recupera su estado basal, potenciando el efecto del vaciado y manteniendo por más tiempo la corriente capacitativa generada por IP<sub>3</sub> (I<sub>IP<sub>3</sub></sub>); con este protocolo potenciamos la corriente y facilitamos su registro e identificación, ya que siendo una corriente pequeña, del orden de pocos pA/pF, resulta siempre difícil de aislar y medir. En la misma figura, se muestra el promedio de registros control ( $-0.16 \pm 0.20$  pA/pF; n=5) en los que no se dializa IP<sub>3</sub> ni EGTA. Observamos que la evolución de I<sub>IP<sub>3</sub></sub> se ajusta perfectamente a una exponencial (vida media:  $t_{1/2} = 117$ s).



**Fig.9a** Densidad de corriente transmembrana vs tiempo estimulada por la diálisis de IP<sub>3</sub> + EGTA (n=6, círculos negros) y ausencia de estímulo, control (n=5, círculos blancos). Los valores del gráfico están corregidos al promedio de las primeras 3 rampas iniciales (promedio  $\pm$  sem).

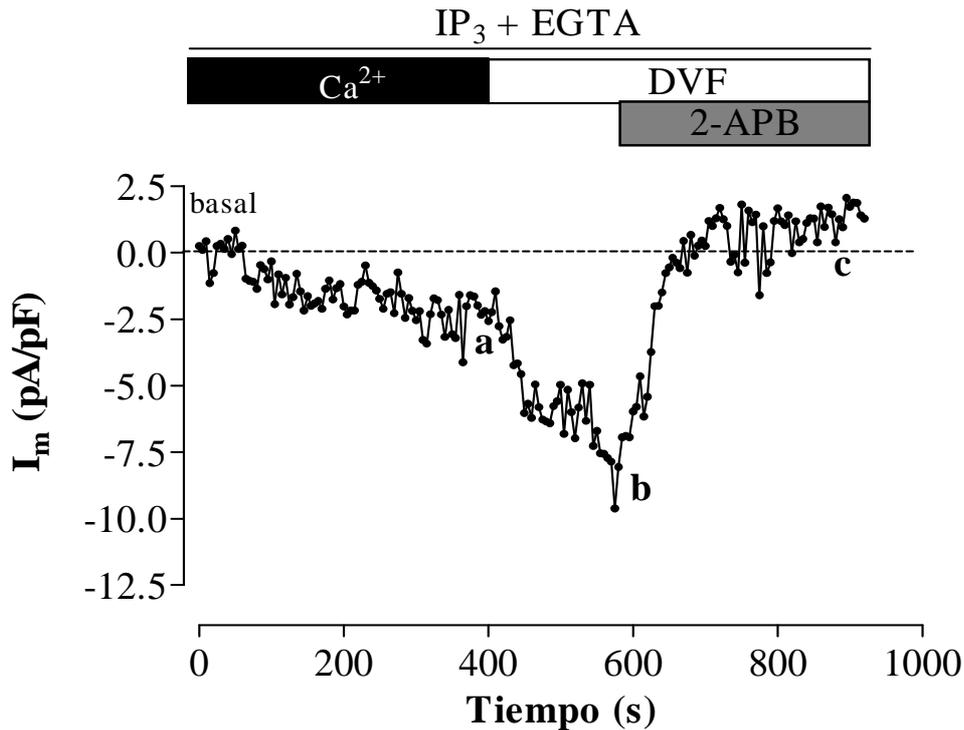
La **figura 9b**, muestra la relación I-V, que es sólo ligeramente rectificadora de entrada, a diferencia de lo que habíamos visto con TG. La curva corta a un potencial positivo cercano a +19 mV, es decir se observaba una corriente de salida importante a potenciales depolarizantes y por lo tanto, no es selectiva para Ca<sup>2+</sup>. La relación I-V de IP<sub>3</sub> es similar a la que observamos para corrientes activadas por BK (apartado 4a.3, **figura 2b**). Esto sugiere la posibilidad de que IP<sub>3</sub> sucede a través de canales SOC pero que no son del tipo CRAC, al menos, parcialmente. En la literatura las corrientes catiónicas SOC aparecen descritas en diferentes tipos celulares y podrían estar mediadas por canales catiónicos TRP que no son selectivos para el calcio.



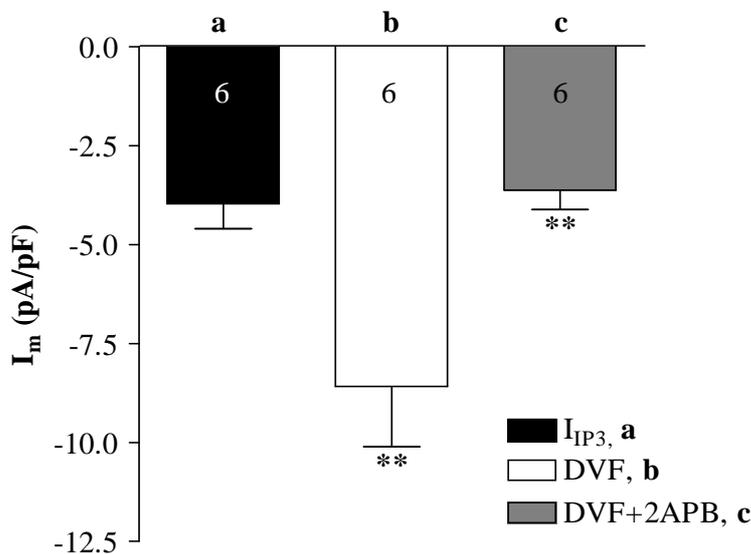
**Fig. 9b** Promedio de la densidad de corriente estimulada por la diálisis de  $\text{IP}_3$  + EGTA. Mostrando un potencial de reversión ligeramente positivo, cercano a +20 mV.

#### **4b.4 Selectividad de las corrientes inducidas por $\text{IP}_3$ + EGTA: solución libre de cationes divalentes (y bloqueadores de la corriente $\text{IP}_3$ + EGTA)**

Para determinar la naturaleza no-selectiva de los canales activados con  $\text{IP}_3$  (+10 mM EGTA) y ver si los iones monovalentes como el  $\text{Na}^+$  también pueden permear el poro del canal, usamos una solución libre de iones divalentes basada en  $\text{Na}^+$  (ver *Materiales y Métodos*). El protocolo de activación es el mismo que en el anterior apartado (dializando  $\text{IP}_3$  + EGTA). Aproximadamente 400 s después de la rotura ‘whole-cell’ (inicio de la diálisis) y una vez activada la corriente SOC, cambiamos la solución externa de  $\text{Ca}^{2+}$ , para perfundir con una solución libre de cationes divalentes (DVF) y basada en  $\text{Na}^+$ . Vemos en la **figura 10a** (ejemplo de una célula), la aparición inmediata de una corriente de entrada de  $\text{Na}^+$ , que adquiere un valor de 2.2 veces del máximo registrado en la solución previa, con calcio. La aplicación al medio extracelular de 2-APB (100  $\mu\text{M}$ ) bloquea esta corriente en un 58% ( $p < 0.01$  respecto al valor máximo de la corriente monovalente). El resumen estadístico en el diagrama de barras (**fig. 10b**) muestra las diferencias significativas del incremento de corriente monovalente en relación al valor máximo alcanzado en la solución de calcio así como la corriente residual una vez aplicamos 2-APB, al medio extracelular.



**Fig. 10a** Densidad de corriente estimulada por diálisis con IP<sub>3</sub> + EGTA durante 400s (**a**), cambio de solución extracelular con calcio (10 mM) a una solución libre de iones divalentes basada en Na<sup>+</sup> (DVF, **b**). Efecto del bloqueador de canales de calcio SOC, 2APB (100 μM) (**c**). En el gráfico vemos una traza ejemplo de los cambios en la corriente transmembrana estimulada; los valores están corregidos al basal de los primeros segundos de diálisis, primeras rampas tras la apertura del sello ( $I_m = I - I_{\text{basal}}$ ).

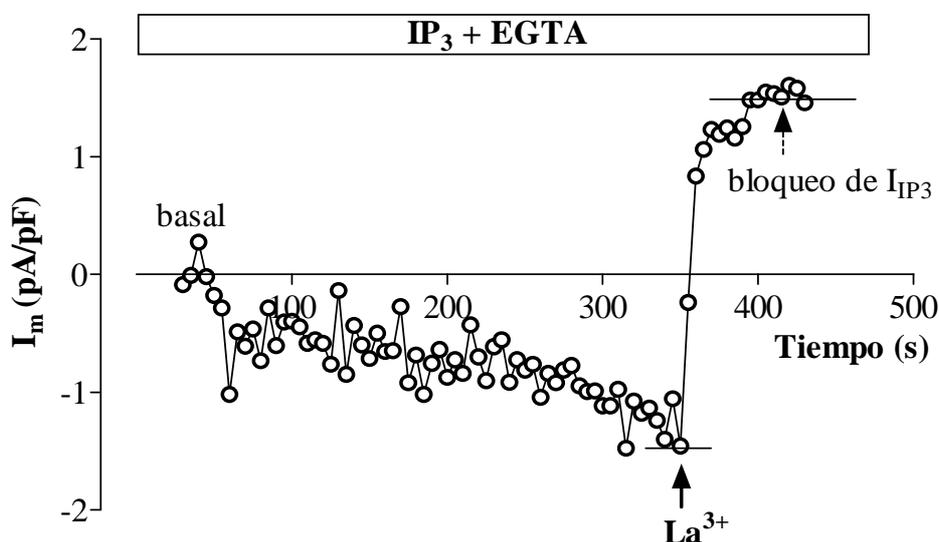


**Fig. 10b** Resumen estadístico de la entrada de calcio capacitativa estimulada por IP<sub>3</sub>+EGTA (control, **a** en el gráfico), en una solución libre de iones divalentes tras la activación de la entrada capacitativa (**b** en el gráfico) y efecto bloqueador del 2-APB (**c**, en el gráfico).

Por lo tanto, los canales activados por IP<sub>3</sub> + EGTA, en ausencia de iones divalentes, conducen iones monovalentes como el Na<sup>+</sup>. Observamos además una rápida inactivación de esta corriente. Estos resultados coinciden con las características

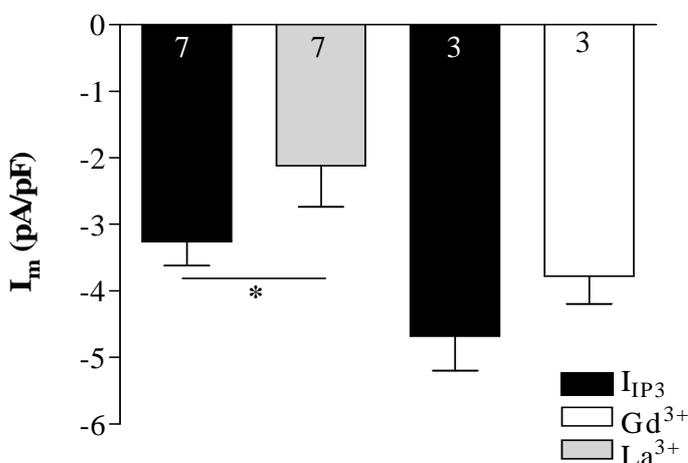
descritas para las corrientes monovalentes de  $\text{Na}^+$  a través de  $I_{\text{CRAC}}$  (Kerschbaum and Cahalan, 1998).

Probamos, también, el bloqueo de la corriente de calcio  $I_{\text{IP}_3}$  aplicando  $\text{La}^{3+}$  (100  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{Gd}^{3+}$  (100  $\mu\text{M}$ ), una vez activada, aproximadamente, a los 400 s de la apertura del sello (**Fig. 11a**, ejemplo para el lantano).



**Fig. 11a** Ejemplo de registro diálisis  $\text{IP}_3 + \text{EGTA}$  y aplicación de  $\text{La}^{3+}$  (100 $\mu\text{M}$ ) en el baño. El gráfico muestra la corriente corregida por su valor basal en los primeros momentos de apertura del sello (inicio de la diálisis de la solución intracelular). El incremento de  $I_m$  es del orden de -1 pA/pF, en  $t=350\text{s}$ , aplicamos el lantánido ( $\text{La}^{3+}$  o  $\text{Gd}^{3+}$ ) y observamos la disminución rápida de la corriente hasta valores positivos denotando un efecto bloqueador para  $I_{\text{IP}_3}$  y otras corrientes de entrada basales.

En la **figura 11b** se muestra el resultado estadístico del bloqueo por lantánidos (\*,  $p < 0.05$ ). La inhibición por parte del  $\text{La}^{3+}$  se ve en un 70% de los casos y reduce un 38% el valor de  $I_{\text{IP}_3}$  activada; menos efectivo es el caso del  $\text{Gd}^{3+}$  con una reducción del 19%.



**Fig. 11b** Resumen estadístico de los efectos de bloqueo de los iones trivalentes,  $\text{La}^{3+}$  y  $\text{Gd}^{3+}$ , en las corrientes de calcio capacitativas inducidas por  $\text{IP}_3 + \text{EGTA}$  ( $I_{\text{IP}_3}$ ).

## **4c Participación del calcio intracelular y extracelular en la contracción celular estimulada por bradiquinina y endotelina-1**

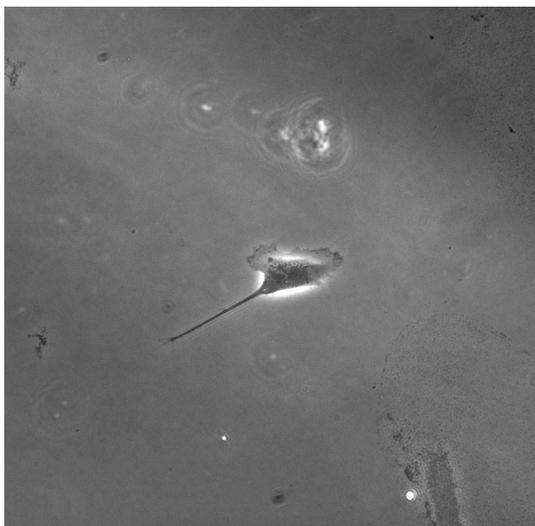
### **4c.1 Contracción activada por bradiquinina y endotelina-1**

Está descrito que sustancias como la BK, la ET-1 o el carbacol provocan la contracción del tejido trabecular, hay también estudios sobre el efecto de tales sustancias a nivel celular, y sus consecuencias sobre la función de drenaje del tejido, la cual disminuye significativamente (Llobet et al., 1999b; Rosenthal et al., 2005).

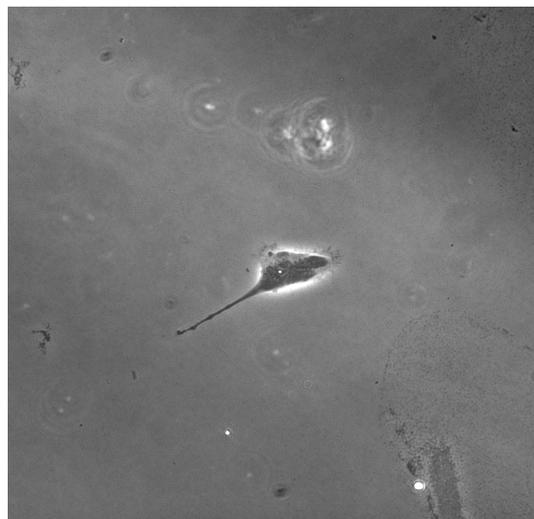
Para estudiar la contracción celular en el transcurso del tiempo estimulada por BK y ET-1 y cuánto o de qué manera podía depender del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular debido al influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por ambas sustancias.

Para este estudio, utilizamos la técnica de microscopía de tracción (ver Materiales y métodos) para medir los cambios en la fuerza que ejerce la célula trabecular sobre un sustrato deformable de colágeno, que simula un entorno parecido al de la matriz extracelular. Este parámetro es una medida de la contracción celular (Gavara et al., 2006).

Obtenemos una imagen de una célula aislada en campo claro, y como vemos en la **figura 12**, es posible detectar cambios en la forma de la célula debido a la retracción o contracción. Formaciones de tipo lamelipodio, necesarias para el movimiento y la fagocitosis celular son afectadas significativamente por la aplicación de BK ( $1\mu\text{M}$ ). También pudimos observar las delgadas proyecciones de membrana o filopodios, formaciones que al igual que los lamelipodios son estructuras compuestas por agrupaciones de filamentos del citoesqueleto de actina.

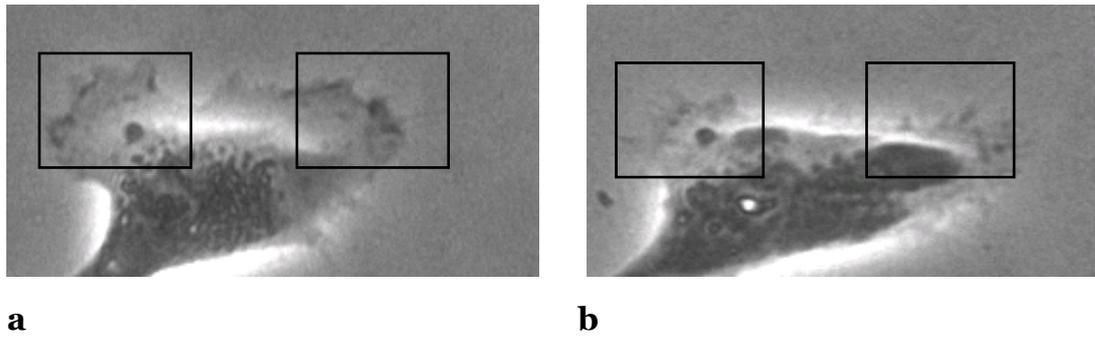


**a**



**b**

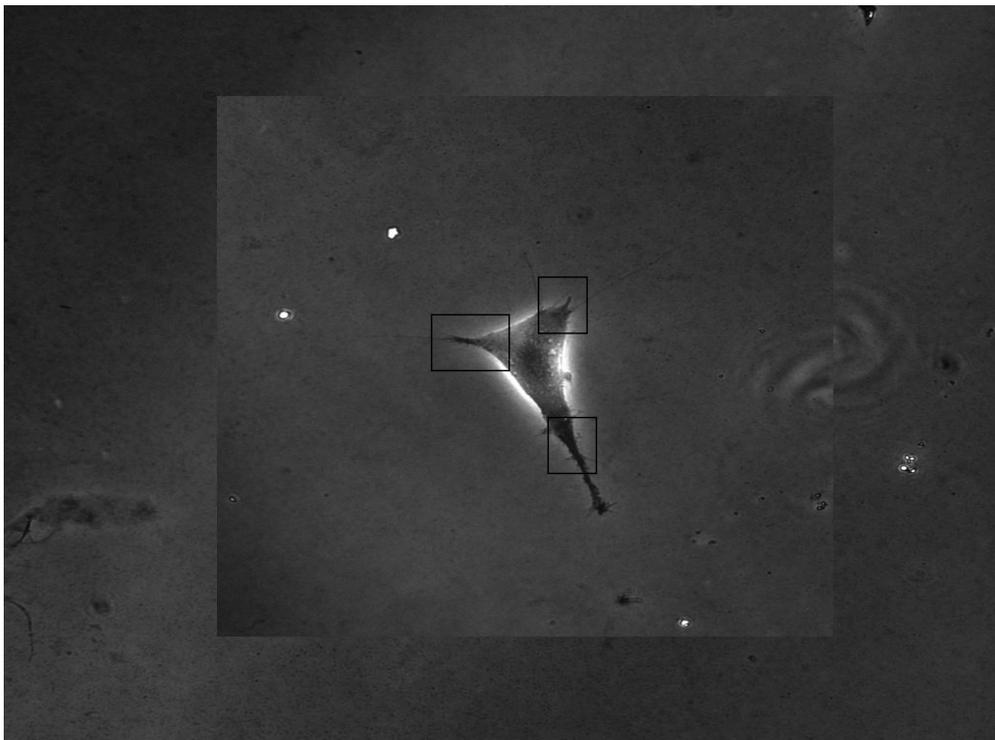
**Fig.12** (continua pág. siguiente)



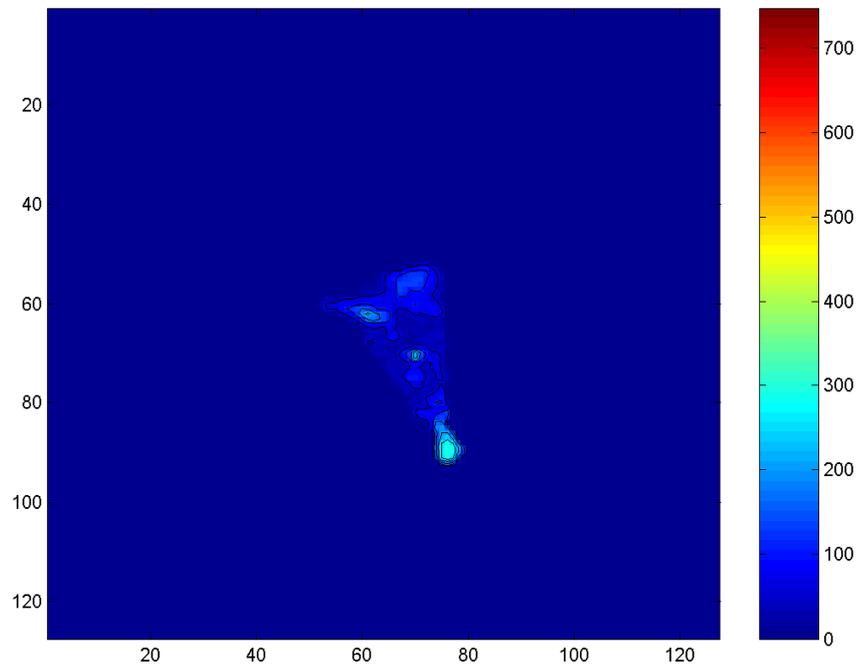
**Fig. 12.** Imágenes en campo claro de una célula BTM aislada en un gel de poliacrilamida (antes **(a)** y después **(b)** de aplicar BK al medio). Imágenes ampliadas de la misma célula, detalle de una región con lamelas (enmarcadas); **(a)** antes de la aplicación de BK en el medio extracelular y **(b)**  $t= 4$  min después de la aplicación de la droga. Observamos la retracción de los lamelipodios en las imágenes de ampliación.

En la **figura 13a**, vemos un ejemplo para una célula del campo de tracción o fuerza, en escala pseudocolor del azul al rojo (nN), donde los tonos hacia el rojo son zonas de mayor intensidad de la fuerza de tracción en ejercida por la célula.

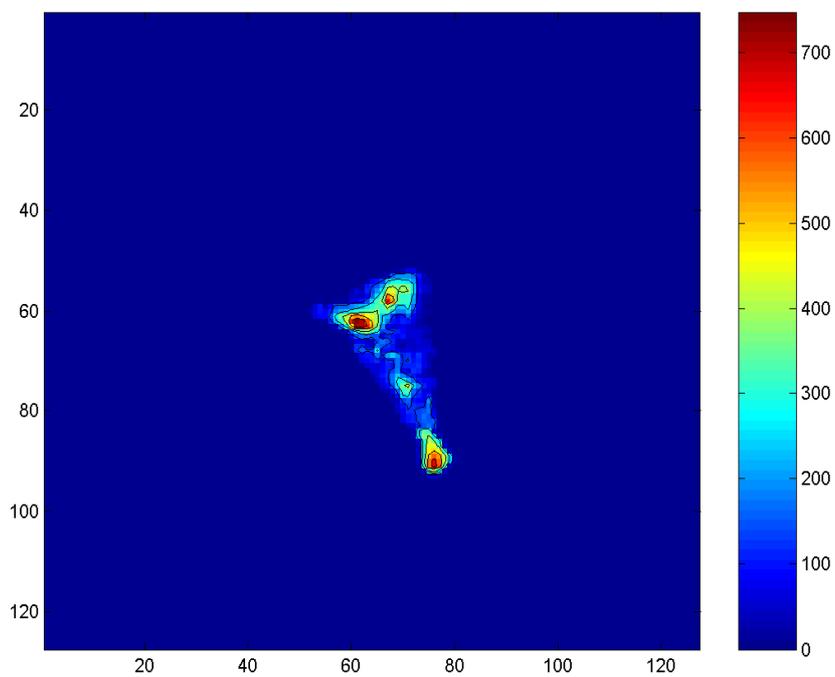
Observamos cualitativamente cambios hacia el rojo en el mapa **(b)** en relación al mapa **(a)** en un tiempo anterior a la aplicación de BK (a) y en un tiempo 4 min posterior.



**Fig. 13a** Imagen en campo claro de una célula BTM aislada en un gel de poliacrilamida. Los cuadros señalan zonas de anclaje de la célula al gel (lamelipodios y filopodios).

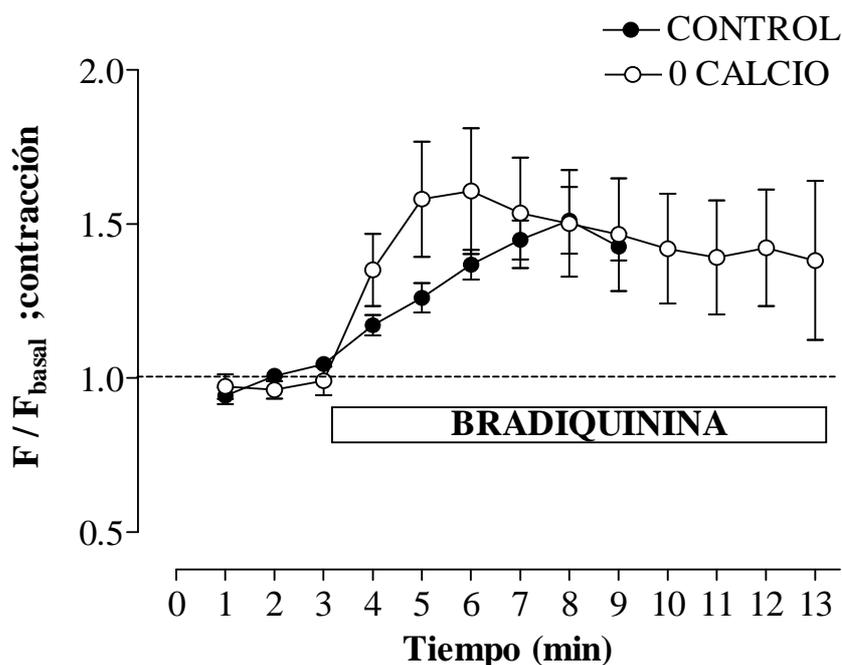


**Fig. 13b** Mapa de tracción de la célula de la imagen superior (**13a**), en un tiempo previo a la aplicación de BK (basal). Se aprecia el mapa de la célula según la intensidad de fuerza o tracción que ejerce sobre el sustrato (gel) según valores de la escala en pseudocolor. Observamos tonos más intensos en las zonas que enmarcamos en la imagen (a) de anclaje.



Mapa de tracción de la célula (**13a**), 4 min después de la aplicación de BK. Se aprecia el cambio de color en las zonas más intensas del mapa basal (**13b**), donde se produce un incremento de la fuerza de tracción ejercida por la célula (contracción).

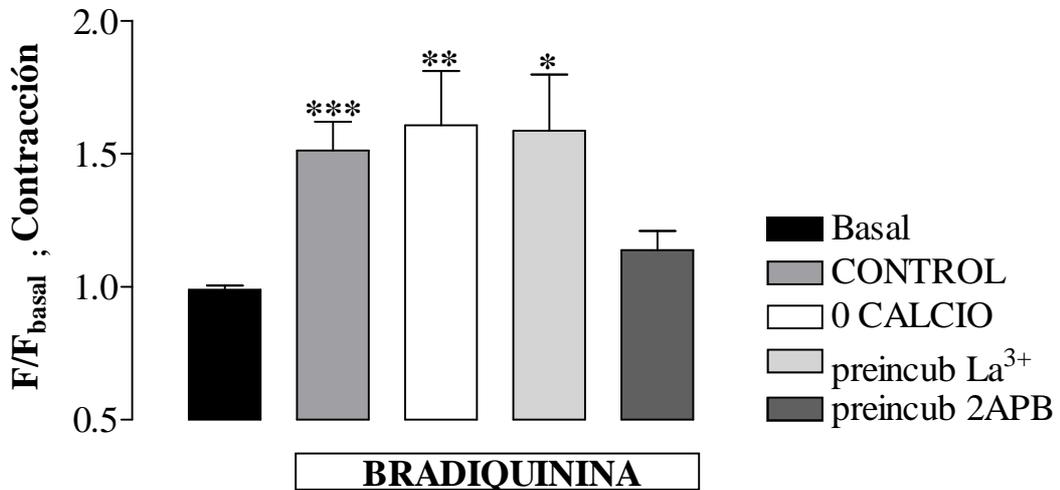
En la **figura 14a**, vemos la evolución en el tiempo del parámetro  $F/F_{\text{basal}}$  (promedio) que mide la variación de la fuerza de tracción ( $F$ ) de la célula sobre el sustrato, respecto a  $F_{\text{basal}}$  o fuerza de tracción ejercida antes de la aplicación de la droga. De manera, que en los primeros minutos de basal (2 min) la relación es de 1, una vez aplicamos BK ( $1\mu\text{M}$ ), la célula se contrae y ejerce más fuerza sobre el sustrato. La contracción es progresiva y en 5 minutos el incremento es del 53% vs basal ( $p < 0.001$ ). Observamos, además, que la evolución es más rápida durante los primeros minutos de incremento en el grupo de células en el medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (o Ca). En ambos grupos, control y o Ca, hubo respuesta contráctil, tras la aplicación de la droga, en un 70% de los experimentos.



**Fig. 14a** Evolución de la contracción para células TM tras la aplicación de BK en un medio fisiológico (CONTROL, círculos negros,  $n=7$ ) y en ausencia de calcio extracelular (o CALCIO, círculos blancos,  $n=6$ ). Los valores de la fuerza total ejercida por la célula,  $F$ , se normalizan al valor de la fuerza en condiciones basales,  $F_{\text{basal}}$ , antes de la aplicación de la droga (media  $\pm$  sem).

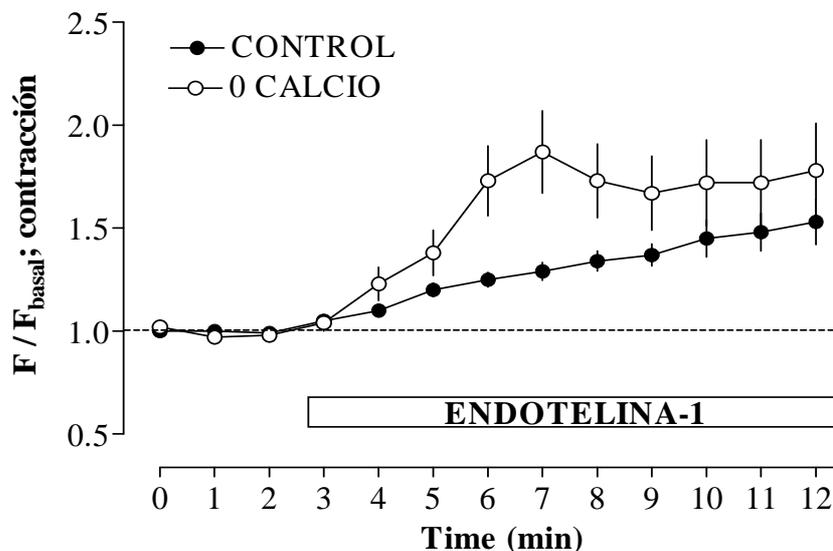
En la **figura 14b**, se muestran las diferencias significativas de los valores máximos de contracción ( $F/F_{\text{basal}}$ ) por efecto de la BK en los grupos control (CONTROL,  $[\text{Ca}^{2+}] = 1,5 \text{ mM}$ ), en ausencia de calcio externo (o CALCIO) y en presencia de los bloqueadores de la entrada capacitativa de calcio (CCE),  $\text{La}^{3+}$  y 2-APB. Se produce contracción en los grupos control, en ausencia de calcio extracelular y también en presencia de  $\text{La}^{3+}$  ( $100 \mu\text{M}$ ) pero la célula no se contrae en presencia de 2-APB ( $50 \mu\text{M}$ ). Esta molécula, puede tener efectos inhibidores sobre los receptores para  $\text{IP}_3$  de la célula impidiendo su activación total y la consiguiente descarga de calcio al citosol, que parece ser relevante para el inicio del proceso de contracción. Cabe la posibilidad de que el mecanismo contráctil precise de un valor mínimo de calcio liberado al citosol, a partir del cual se inicia el proceso de contracción ( $[\text{Ca}^{2+}]_c = 360 \pm 26 \text{ nM}$ , ver la **tabla 2**, del apartado 4a.1). El bloqueo por  $\text{La}^{3+}$  sobre la entrada de calcio ( $I_{\text{BK}}$ ) no tiene efectos inhibidores, en correspondencia con los resultados observados para la contracción en ausencia de calcio extracelular. La preincubación con  $\text{La}^{3+}$  (bloqueador de las corrientes CRAC) no disminuye significativamente la entrada de

Ca<sup>2+</sup> estimulada por BK (**fig. 2b**) aunque sí lo hace para la corriente inducida por IP<sub>3</sub> o TG (**Fig. 11b y 7b**). En conclusión, la contracción inducida por BK depende de Ca<sup>2+</sup> intracelular y no del influjo de Ca<sup>2+</sup> estimulado.



**Fig. 14b** Estadística de los valores máximos de contracción tras la estimulación con BK respecto al valor basal, en condiciones fisiológicas (n=7, CONTROL, 2.5mM Ca<sup>2+</sup>), en ausencia de calcio extracelular (n=6, 0 CALCIO) y en presencia de La<sup>3+</sup> o 2-APB (n=6) (media ± sem).

El mismo protocolo, aplicando ET-1 (0.1 μM) (**Fig.15a**), muestra un efecto similar que para BK, un incremento progresivo de la contracción celular al aplicar la droga, tras un periodo de 3 min de basal; en 5 minutos, el incremento es del 70% vs basal (p<0.001). Nuevamente, observamos diferencias en el ritmo de contracción, entre el grupo control (CALCIO) y el grupo, en ausencia de calcio extracelular (0 CALCIO) (**Fig.15b**). Las células del grupo control, medio fisiológico, se contraen más lentamente, en cambio, las células en ausencia de calcio, tienden a contraerse de forma más intensa y rápida. Las velocidades de contracción son significativamente diferentes inicialmente, la fuerza de tracción es claramente superior para 0 CALCIO respecto el grupo control, en t=3 y 4 min (\*\*!).

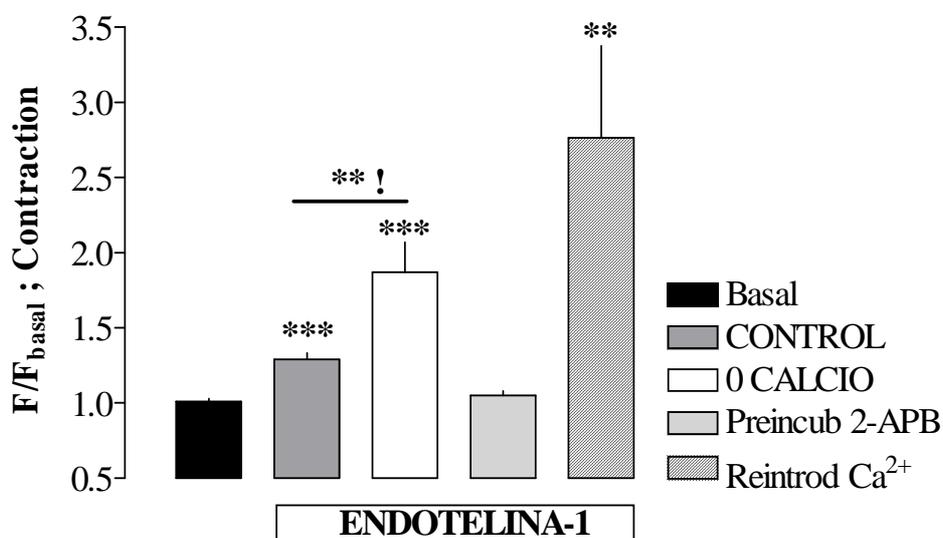


**Fig. 15a** Evolución de la contracción para células TM tras la aplicación de ET-1 en un medio fisiológico tras un basal de 3 min (n= 11, CONTROL, círculos negros) y en ausencia de calcio extracelular (n=10, o CALCIO, círculos blancos) (media  $\pm$  sem).

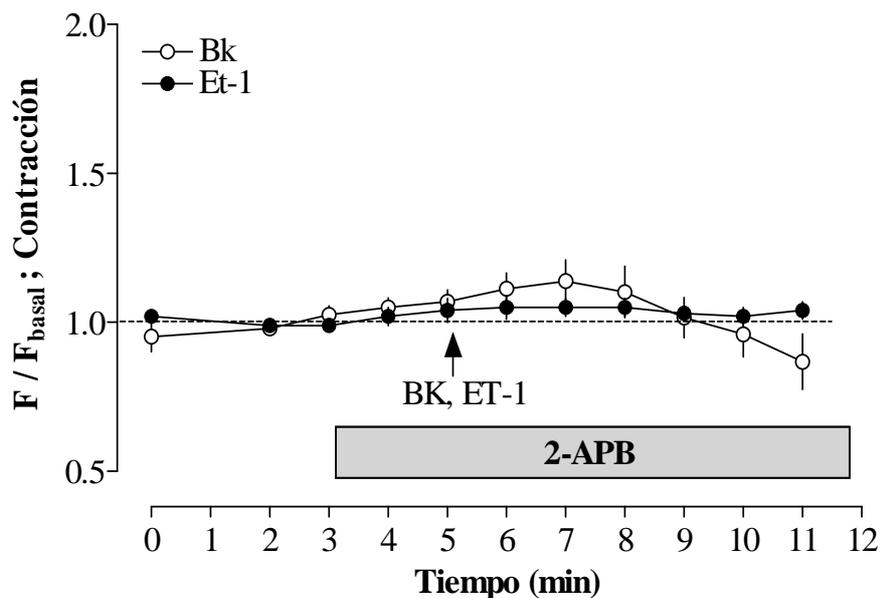
Cuando se omite el  $\text{Ca}^{2+}$  del medio, ET-1 induce contracción igualmente, aunque observamos comportamientos irregulares en las fuerzas de tracción en este grupo (mayor dispersión), por otra parte, la velocidad de contracción es mayor en los primeros minutos respecto al grupo control. En relación al efecto contráctil, la respuesta para ET-1 resulta ser más intensa que para BK, induce contracciones de hasta el 200% de incremento sobre el nivel de contracción basal ( $p < 0.001$ ;  $n=11$ ). El grupo control muestra respuesta contráctil tras la aplicación de la droga en el 61% de los experimentos y el grupo o Ca, lo hace en un 66% de los casos.

El 2-APB (50  $\mu\text{M}$ ) inhibe nuevamente la contracción en la totalidad de las células ensayadas, es decir, tras la aplicación de ET-1, en el 100% de los experimentos realizados no hubo respuesta contráctil, al igual que ocurre con BK (**Fig. 15c, 15b**).

En otro grupo de experimentos, tras provocar la contracción en ausencia de calcio procedimos, 9 minutos después, a la reintroducción del calcio y el nivel de contracción se mantuvo sin cambios significativos (barra rayada, **Fig. 15b**); lo mismo sucedía con BK (resultados no mostrados).

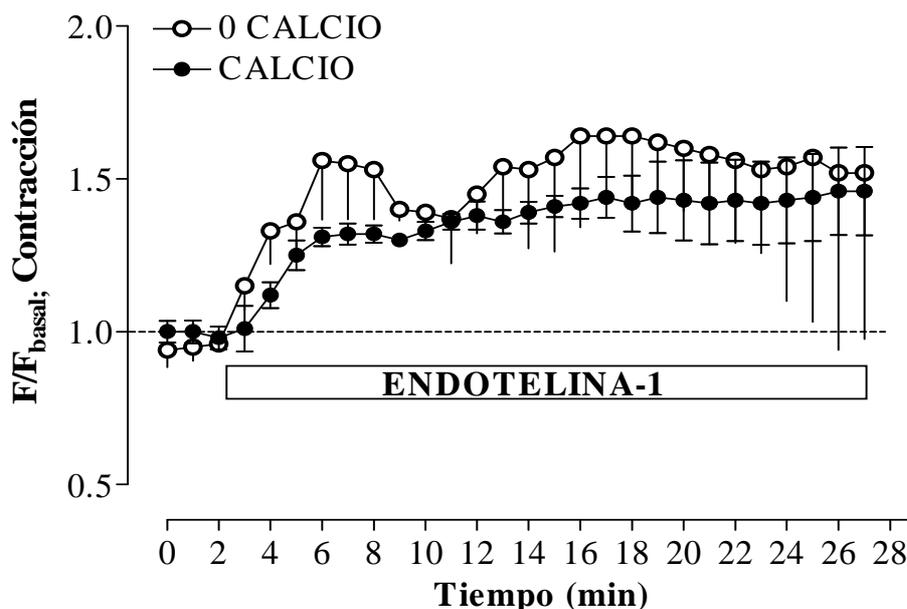


**Fig. 15b** Estadística de los valores máximos de contracción tras la estimulación con ET-1 respecto al valor basal (Basal;  $n=11$ ) en condiciones fisiológicas (2.5mM  $\text{Ca}^{2+}$ , CONTROL;  $n=11$ ), en ausencia de calcio extracelular (o CALCIO;  $n=10$ ), en presencia de 2-APB ( $n=7$ ) y reintroducción de calcio 9 min después de la aplicación de la droga ( $n=6$ ) (media  $\pm$  sem).



**Fig. 15c** Evolución de la contracción para células TM inducida por ET-1 y BK, en presencia de 2-APB en un medio fisiológico (50  $\mu$ M, preincubación desde 2min antes) y un periodo basal de 3min (ET-1, círculos negros, n=7; BK, círculos blancos; n=8) (media  $\pm$  sem).

Para conocer cómo evolucionan las contracciones inducidas por Et-1 en el control y a 0 calcio, registramos los valores  $F/F_{\text{basal}}$ , de contracción relativa, a más tiempo, hasta 28 minutos en total (**Fig. 15d**). Mientras la fase inicial de incremento contráctil es diferenciable entre los grupos control y 0 CALCIO, a partir de los 10 min aproximadamente, los niveles son muy similares. Podemos observar no obstante, una tendencia irregular en la curva de contracción en ausencia de calcio y una dispersión sensiblemente superior al control. Vemos también como la contracción es sostenida, se prolonga hasta más de media hora (t=27 min: control,  $F/F_{\text{basal}} = 1.46 \pm 0.14$ ; 0 CALCIO,  $F/F_{\text{basal}} = 1.41 \pm 0.54$ ).



**Fig. 15d** Evolución de la contracción inducida por ET-1 a tiempos largos. Observamos como a tiempos superiores a 10min, los niveles de contracción para el grupo control-CALCIO (n=4, calcio fisiológico, círculos en negro) respecto al grupo 0 CALCIO (n=3, círculos blancos) no presentan diferencias significativas.

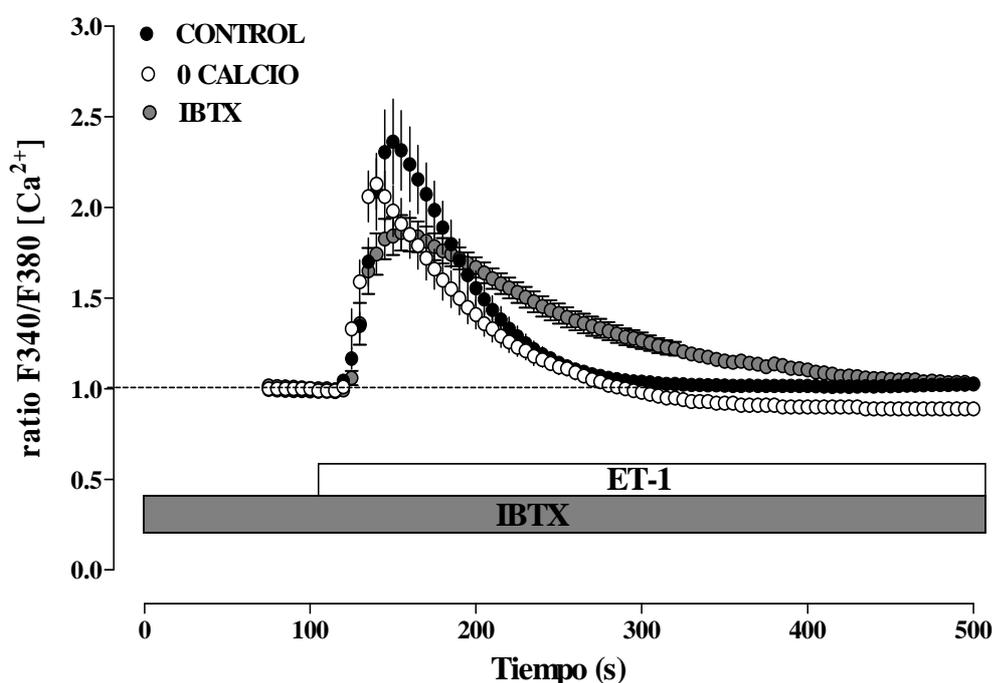
#### 4c.2 Posible relación entre los canales de potasio BK<sub>Ca</sub> y la entrada de calcio estimulada por ET-1

La ausencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio no impide la contracción celular por el estímulo con agonistas de receptores acoplados a proteína G<sub>q</sub>, al menos para células BTMs. Se detecta un desarrollo diferente entre la contracción control y en la contracción en medio libre de Ca<sup>2+</sup>, en este último caso, el efecto contráctil es más rápido e intenso en los primeros 5-6 min de la contracción. La causa es desconocida; quizás el Ca<sup>2+</sup> extracelular, por vía I<sub>BK</sub> e I<sub>ET-1</sub> (influjo de Ca<sup>2+</sup> activado por receptor), podría estar modulando el proceso de contracción de la vía MLCK, evitando su fosforilación, al activar mecanismos de relajación paralelos (quizás vía PKC) o bien, a través de la activación de canales de potasio de alta conductancia y dependientes de Ca<sup>2+</sup> (BK<sub>Ca</sub>), implicados en los procesos de relajación en muy diversos tipos celulares y que sabemos están presentes también, en la célula trabecular.

Cabe la posibilidad que el número de canales activados en condiciones de ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular sea menor y esto podría tener repercusión en el grado de contracción, es decir, que sin el efecto relajante de estos canales, el proceso contráctil puede ser mayor y más rápido. Para testar el papel de los BK<sub>Ca</sub> en esta cuestión, de forma indirecta, estimulamos la célula con ET-1 en condiciones control, en un medio libre de calcio y en presencia de iberiotoxina (IBTX, 100 nM; potente bloqueador de los BK<sub>Ca</sub>), la capacidad hiperpolarizante de estos canales de alta conductancia podría reflejarse en un aumento o disminución del calcio hacia el citosol (intra y extracelular), de manera que cuando estos canales se activan la deriva eléctrica favorece la entrada de calcio.

Podemos observar que el pico de  $\text{Ca}^{2+}$  preincubado con iberitoxina (IBTX, potente bloqueador de los  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , 100 nM, ~2 min) es significativamente menor que la cantidad máxima de calcio citosólico descargada por el mismo estímulo en condiciones control (calcio fisiológico) (\*\*,  $p < 0.005$ ). Pero además, observamos que esta disminución se mantiene para picos de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia de calcio extracelular (**Fig. 16**). No obstante, vemos en la figura 16, que la inhibición de IBTX sobre el pico de calcio control es superior (inhibición de los flujos de calcio intra/extracelular) sobre el pico de o CALCIO.

La salida de potasio de estos canales es elevada y su efecto hiperpolarizante es intenso de forma que la deriva eléctrica provocada produce mayor entrada de calcio hacia el citosol, pero si bloqueamos esta salida el máximo del transitorio de calcio es menor y más lento.



**Fig. 16** Respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por ET-1 en: CONTROL (n=59 células, círculos negros), ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (n=37, 0 CALCIO, círculos blancos) y en presencia de iberitoxina (n=26, IBTX, círculos grises) (media±sem).

Este resultado sugiere la activación de canales  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  por efecto de la ET-1 y la posible relación entre el aporte de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular necesario para la activación plena de los mecanismos reguladores de la contracción.

#### 4c.3 Posible relación entre la movilización de calcio inducida por ET-1 y la producción de óxido nítrico en células trabeculares

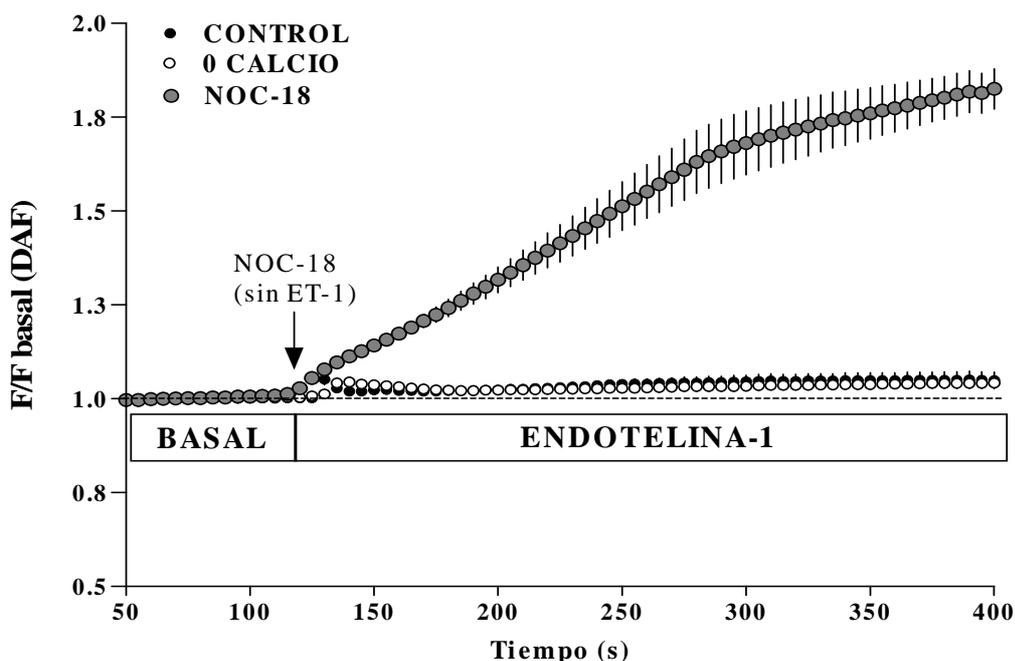
Existen evidencias que las células trabeculares con propiedades contráctiles, puedan producir óxido nítrico, NO, como molécula autoreguladora endógena de rápida difusión para procesos de relajación y que su producción es sensible a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Pensamos que podría existir un efecto de relajación o regulación de la contracción, más acusado en los primeros minutos, tras la aplicación de la droga, debido al influjo de calcio extracelular y su posible papel en la actividad

de la sintasa de NO (eNOS) (Moneer et al., 2003; Zhang et al., 2007a). Este efecto aparecería en los controles y no en los estudios en ausencia de calcio externo obteniendo así, un indicio sobre por qué las contracciones en ambos grupos son distintas en la fase inicial rápida (**Fig.15a y 15b**).

De esta forma, buscamos la relación entre el estímulo con ET-1 y la producción de NO y/o diferencias entre los grupos, control (calcio fisiológico) y o calcio extracelular.

Para ello, mediante fluorescencia con el marcador de NO, DAF y Fura-2 AM (marcador de  $Ca^{2+}$ ) registramos simultáneamente, el calcio citosólico y la producción de NO, estimulados por Et-1 (0.1  $\mu$ M). La señal de DAF debe contrastarse con un control positivo (NOC-18, donador de NO) (**Fig. 17a**) y uno negativo (L-NAME, inhibidor de la NO sintasa) (**Fig.17b**).

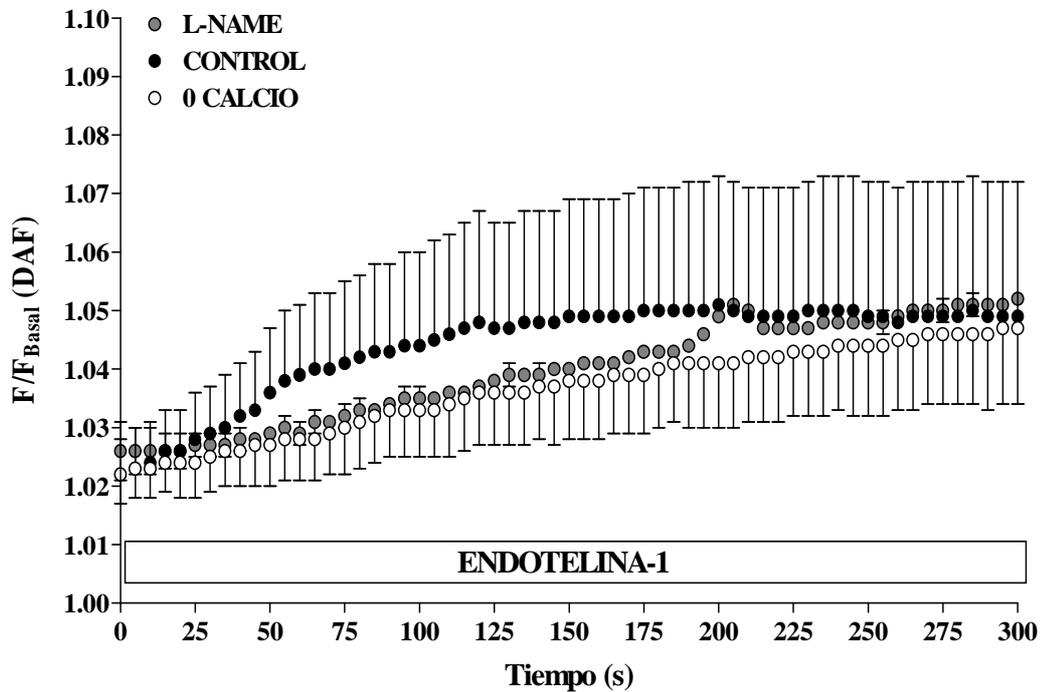
Mientras el donador NOC-18 (500  $\mu$ M) incrementa la señal de fluorescencia de DAF hasta prácticamente doblar el valor basal, indicando la presencia de NO en la célula, el efecto de la ET-1, está muy por debajo, y no observamos diferencias significativas entre los grupos, control y o calcio extracelular.



**Fig. 17a** La fluorescencia de DAF relativa al basal no incrementa tras la aplicación de ET-1, para ninguno de los dos grupos contrastados (CONTROL y o CALCIO). Observamos en la gráfica, la curva-respuesta del fluoróforo DAF ante un donador de NO (NOC-18) (media  $\pm$  sem).

A pesar de la débil señal de DAF para el estímulo con ET-1, contrastamos estos resultados con su efecto en presencia de un inhibidor de la eNOS (control negativo). Para ello preincubamos la muestra con L-NAME (1mM). La señal de DAF para el grupo con el inhibidor no presenta diferencias significativas con los dos grupos (control y o Ca) (**Fig.17b**). Esto pone de manifiesto que Et-1 no estimula de forma significativa la producción de NO endógeno en la célula trabecular. En la **figura 17b**,

vemos como las 3 señales de fluorescencia DAF se superponen. La distinta producción de NO no es una característica a tener en cuenta para explicar las diferencias contráctiles del grupo control y el grupo 0 Ca.

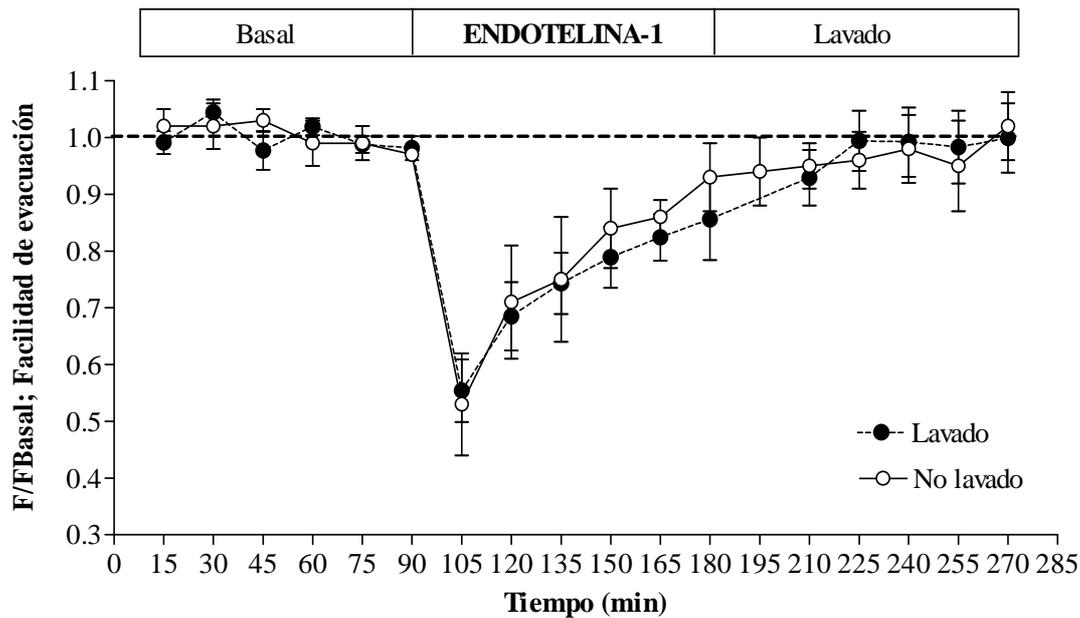


**Fig. 17b** La fluorescencia promedio relativa del fluoróforo DAF al basal ( $F/F_{\text{basal}}$ ) no incrementa tras la aplicación de ET-1 en el medio, para ninguno de los dos grupos contrastados (control y 0 Ca) respecto de la señal para ET-1 en presencia de un inhibidor de la sintasa de NO (L-NAME) (media  $\pm$  sem).

Por todo ello, descartamos la participación de NO endógeno, en el proceso de relajación o contracción de estas células inducido por ET-1.

#### 4d. Perfusión de segmento anterior de ojo bovino: disminución de la facilidad de evacuación de la malla trabecular por efecto de endotelina-1

Para comprobar el efecto de ET-1 en el tejido y las alteraciones en su función iniciamos los ensayos de perfusión de segmento de ojo anterior bovino. Conocíamos la literatura previa en relación al efecto de disminución de la facilidad de evacuación de la malla trabecular cuando el medio contenía bradiquinina (Llobet et al., 1999b). En nuestro caso, aplicamos ET-1 ( $0.1 \mu\text{M}$ ) en el medio perfundido, y observamos la disminución rápida (en apenas 15 minutos) de la permeabilidad del tejido (Facilidad de evacuación =  $\text{Flujo}/\text{Flujo}_{\text{basal}}$ ). Observamos, en el gráfico de resultados de la **figura 18**, cómo la disminución de flujo es de hasta la mitad del valor basal, además el efecto se recupera progresivamente, retornando al valor basal, aproximadamente 2 horas desde la aplicación de la sustancia vasoconstrictora, tanto para el grupo de experimentos eliminando la droga del medio (lavado, en el gráfico) como para el grupo sin eliminar la droga ( $t=210\text{min}$ : lavado,  $F/F_b = 0.929 \pm 0.049$ , sin lavado,  $F/F_b = 0.950 \pm 0.040$ ). De estos resultados concluimos que la ET-1 tiene efectos también sobre la función evacuadora del tejido y que pueden correlacionarse con el efecto contráctil observado a nivel celular (tensión contráctil inducida por ET-1  $> 30$  min, **fig. 15d**).

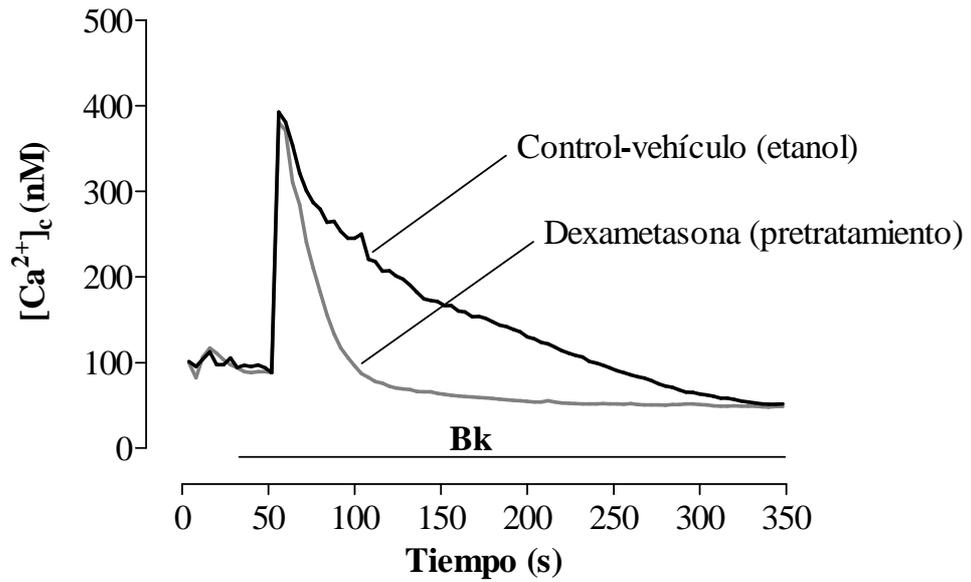


**Figura 18.** Efecto de ET-1 sobre la facilidad de evacuación del tejido trabecular de ojo bovino. La aplicación de la droga disminuye la facilidad de evacuación de flujo a través de la malla trabecular rápidamente hasta un valor de la mitad del basal (primeros 15min, tras la aplicación de la droga, t=90min). Este efecto decrece lentamente durante 2h (t=225min). El lavado de la droga 1h 30min después de su aplicación (n=4) no altera el proceso de recuperación de la facilidad respecto a la recuperación en presencia de la droga (n=8). Los receptores de ET-1 se insensibilizan tras el efecto de la droga.

#### 4e. Movilización de calcio y dexametasona (DEX)

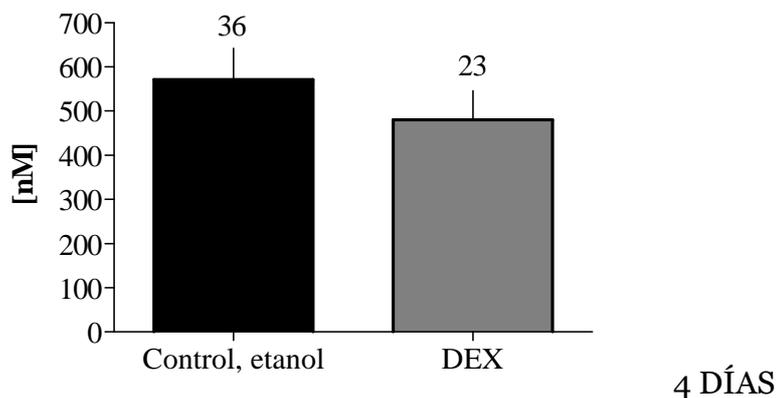
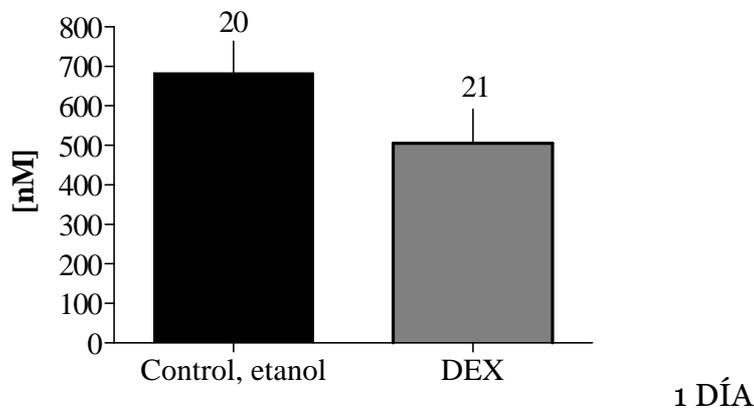
Sabemos que la dexametasona es un glucocorticoide de gran potencia que se relaciona directamente con el desarrollo de ciertos glaucomas inducidos de ángulo abierto. La exposición prolongada a corticoides produce incremento de la PIO. Las células TM están implicadas en esta alteración puesto que poseen receptores para glucocorticoides. Uno de los efectos de DEX que se ha descrito más ampliamente, es el de la reorganización del citoesqueleto, por la formación de redes de filamentos entrecruzados de actina (CLANs) y alteraciones importantes en la matrix extracelular (Clark et al., 2005). Cambios en el citoesqueleto de actina, como el aumento de los filamentos, comportan un aumento en la dureza de la célula y alteraciones en sus propiedades contráctiles. Nos preguntamos si en el conjunto de alteraciones provocadas por DEX, podían darse cambios en la dinámica del calcio, especialmente en la vía de influjo de calcio capacitativo, puesto que existen referencias sobre el papel del citoesqueleto en la activación de los canales de calcio SOC, canales que operan con el retículo endoplasmático (Sabala et al., 2002).

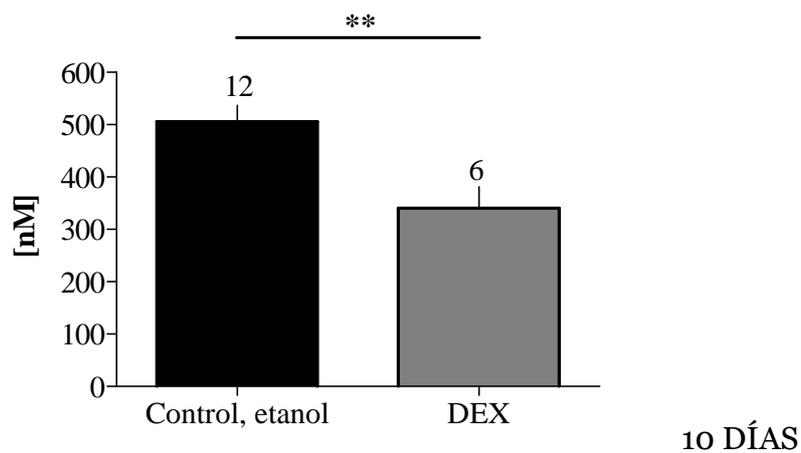
Testamos los parámetros de  $T_{70}$  y la amplitud del pico de calcio movilizado por BK ( $1\mu\text{M}$ ) en células pretratadas con dexametasona ( $0.1\mu\text{M}$ ) y células control (tratadas con el vehículo-etanol), obtuvimos los siguientes resultados **Fig. 18b** para diferentes días del tratamiento:



**Fig. 19** Movilización de  $Ca^{2+}$  citosólico vs tiempo para la aplicación de BK en células control (vehículo-etanol; traza en negro) y células pre-tratadas con dexametasona (DEX; traza gris).

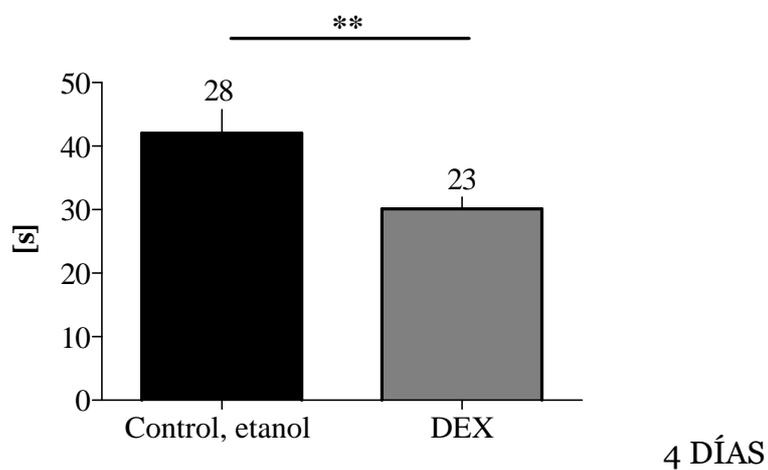
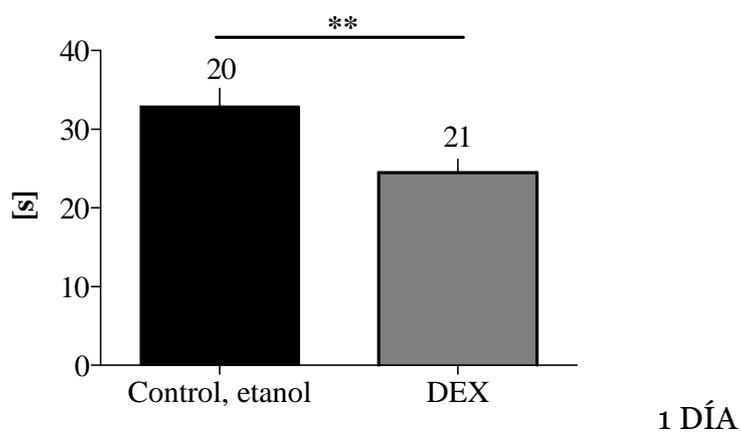
Los resultados no muestran diferencias significativas para el valor máximo de calcio o amplitud, movilizado a 1 y 4 días de tratamiento con DEX, pero sí encontramos una disminución en el  $T_{70}$  del calcio movilizado tras 10 días de tratamiento.

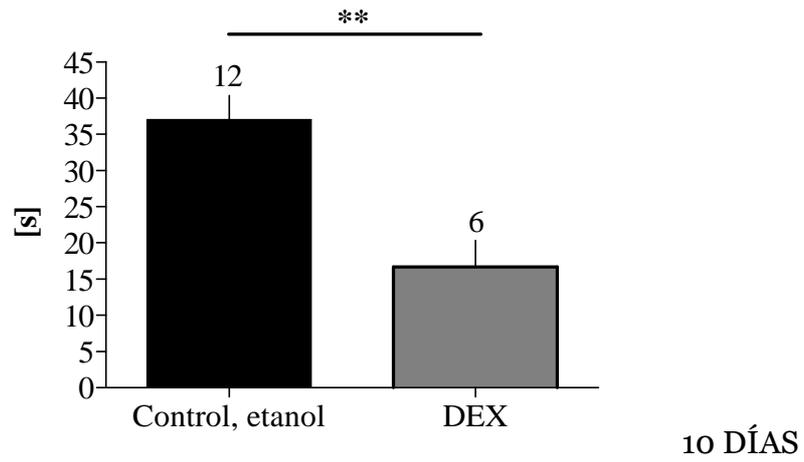




**Fig. 19a** Amplitud de los picos de calcio estimulados por BK en células control y células pretratadas con dexametasona a 1, 4 y 10 días de tratamiento (\*\*, diferencia significativa para las amplitudes a 10 días de tratamiento, control vs DEX) (promedio  $\pm$  sem).

Los resultados para el parámetro  $T_{70}$  [s] (indicador indirecto de la entrada de calcio extracelular, ver aptdo. 4 a.1) muestran la disminución significativa de la entrada de calcio, desde el primer día de tratamiento, diferencia que se mantiene para 4 y 10 días. Esto indica que el tratamiento con DEX podría estar afectando la vía de entrada de calcio estimulada por el receptor/BK (0.1  $\mu$ M).





**Fig. 19b** Parámetro  $T_{70}$  de los picos de calcio estimulados por BK en células control y células pretratadas con dexametasona a 1, 4 y 10 días de tratamiento (promedio  $\pm$  sem). Se determinaron diferencias significativas en los 3 grupos.

## **5. DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

El estudio del calcio es esencial para entender multitud de procesos celulares. Un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico puede provenir de la descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los propios depósitos intracelulares o bien, por la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular a través de canales iónicos o intercambiadores, como el de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  intervienen en procesos como son la proliferación celular, el inicio de actividades enzimáticas o por ejemplo, la mecánica contráctil celular, pero además, también, encontramos al  $\text{Ca}^{2+}$  en la señalización de muerte celular o apoptosis. La gran versatilidad de este ión se debe, principalmente, al exhaustivo control de su contenido. Para ello existe una red de compartimentos o depósitos intracelulares, canales de calcio, intercambiadores y bombas de extrusión o recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$ , todos ellos especializados y selectivos en el transporte de este ión, además de la compartimentalización intracelular, la dinámica del calcio funciona en red, una red reguladora, es decir, su dinámica depende simultáneamente del estado de todos los compartimentos (ER, mitocondrias y citoplasma)(Friel and Chiel, 2008).

En células excitables, existen canales de calcio extracelular dependientes de voltaje, los VOCC y también, canales no-dependientes de voltaje, como por ejemplo, los llamados canales de calcio capacitativos. Éstos permiten la entrada de calcio capacitativa (CCE) o dependiente de los depósitos de calcio intracelular (retículo endo-/sarcoplásmico principalmente y mitocondrias). Pero además, existe un grupo no dependiente de voltaje llamado 'no-capacitativos' que dan lugar al influjo o entrada de calcio extracelular de forma independiente del contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo (NCCE), son canales activados generalmente por receptor, por lo que también se usa la nomenclatura RACC o ROCC (*receptor- activated/operated calcium channels*). Para células no-excitables, la entrada de calcio extracelular está mediada exclusivamente por vías no dependientes de voltaje, es decir, por CCE y NCCE.

Nuestro estudio trata sobre la movilización de calcio y la identificación de corrientes de calcio de entrada dependientes de los depósitos intracelulares (corrientes capacitativas de calcio, CCE) en particular, inducidas por estimulación de sustancias vasoconstrictoras como la bradiquinina (BK) y la endotelina-1 (ET-1), en células trabeculares. Una vez detectadas y caracterizadas estas corrientes de calcio, el siguiente paso propuesto fue el de determinar su influencia en la contracción a nivel celular y sus efectos sobre la función evacuadora de la malla trabecular.

El interés de estas sustancias, endotelina y bradiquinina, se debe a resultados preliminares que muestran que son agentes vasoconstrictores capaces de contraer la malla trabecular y de disminuir su permeabilidad, es decir, disminuir la salida del humor acuoso del ojo. La acumulación del humor acuoso, entonces, supone el aumento en la PIO (principal factor de riesgo del glaucoma). En cambio, el efecto inverso, la relajación del tejido, permite mayor fluidez de humor acuoso y menor PIO (Wiederholt, 1998a;Wiederholt et al., 2000b). Disminuir la PIO es el objetivo número uno de la mayoría de terapias antiglaucoma o que previenen las consecuencias de la enfermedad.

Además, otra razón para el estudio de sustancias vasoconstrictoras es que se ha determinado la presencia de ET-1 en el humor vítreo y acuoso en condiciones fisiológicas y su aumento significativo en el humor acuoso de pacientes con glaucoma.

No se descarta que ET-1 pueda estar relacionada, en algunos casos, con la patogénesis de la enfermedad (Koliakos et al., 2004;Lepple-Wienhues et al., 1991;Thieme et al., 2006a;Yorio et al., 2002).

Más información previa de la cual surge nuestro estudio, relaciona la BK con ciertas señales de calcio; se observó movilización de calcio intracelular en forma de picos de gran amplitud y tiempos de relajación largos, de varios minutos, a la vez que se produce contracción del tejido. Tanto BK como ET-1 promueven la síntesis de PGE<sub>2</sub> y la formación de AMP cíclico, esta vía de prostaglandinas facilita la evacuación; así que estos vasoconstrictores pueden presentar formas distintas incluso antagónicas de regulación de la función del tejido (Llobet et al., 1999b;Webb et al., 2003;Yorio et al., 2002).

Sustancias como la adenosina y otros nucleótidos, y dinucleótidos, relajan al tejido e incrementan el flujo de humor acuoso en la zona de evacuación. Por ejemplo, el dinucleótido Ap<sub>4</sub>A puede reducir la PIO actuando sobre receptores purinérgicos P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> de la malla trabecular. Sabemos que estas sustancias movilizan calcio en células trabeculares, y son también sucesos transitorios en forma de pico pero éstos son de poca amplitud y de corta duración. No obstante, existe especificidad de funciones para los distintos receptores de adenosina en la malla trabecular, con efectos opuestos sobre el drenaje del HA, es decir formas distintas de regulación (Karl et al., 2007;Shearer and Crosson, 2002). Se relaciona estas sustancias con la modificación en la resistencia del tejido mediante el efecto que producen sobre el volumen de las células trabeculares ('shrinkage', disminución del volumen), estos cambios afectarían facilitando o restringiendo el paso del flujo en los espacios intercelulares.

En otros tipos celulares, la BK incrementa el contenido de calcio libre en el citosol e hiperpolariza la célula, y lo hace mediante la activación de canales de potasio de alta conductancia sensibles al calcio (Frieden et al., 1999;Soto et al., 2004).

Las prostaglandinas se conocen, hoy, con drogas antiglaucomatosas y su uso se ha extendido en gran medida. Disminuyen la PIO incrementando la evacuación del humor acuoso a través de la vía uveoescleral, principalmente. Se desconocen los mecanismos concretos responsables del mecanismo por el cual prostaglandinas como PGF<sub>2</sub> alfa pueden inhibir la contracción de TM inducida por ET-1. Los estudios más recientes apuntan a que este efecto se debe en parte a la inhibición de la movilización de Ca<sup>2+</sup> por las prostaglandinas, lo cual supone el bloqueo de un suceso clave en el inicio de la fuerza contráctil (Thieme et al., 2006b;Wan et al., 2007).

El uso de cannabinoides y prostanoides también son efectivos sobre la malla trabecular y producen relajación del tejido. Los receptores asociados a estas sustancias abren directamente canales de tipo BK<sub>Ca</sub> y se produce el aumento de flujo y la disminución de PIO. Ciertos agonistas cannabinoides reducen hasta en un 80% la contracción provocada en el tejido previamente, por sustancias como la ET-1 o el carbacol mediante la activación de corrientes de potasio de salida (estas respuestas fueron bloqueadas en presencia de IBTX) (Stumpff et al., 2005b).

Por otra parte, donadores de óxido nítrico (NO) disminuyen la PIO actuando sobre el volumen celular de las células trabeculares y del canal de Schlemm, de forma que

disminuyen la resistencia al paso de HA por 'shrinkage' celular. Este efecto podría explicar, al menos en parte, los cambios observados en la funcionalidad del tejido. Inhibidores de los canales de gran conductancia de potasio (BKCa) como la IBTX, o de la guanilato ciclasa soluble (sGC), de cGMP y PKC, inhiben el efecto del NO sobre el volumen celular. Existen datos que indican que la malla trabecular posee un mecanismo de feedback que regula la producción de NO para modificar el flujo de HA evacuado y por tanto, la PIO; además, el mecanismo estimula la sobreexpresión del gen de la sintasa de NO inducible (iNOS) (Dismuke et al., 2008; Schneemann et al., 2003; Stumpff et al., 2005b).

Una de las características propias de la señalización vasoconstrictora, al menos, para ET y BK, frente a las sustancias vasorelajantes como por ejemplo, la adenosina, parece ser la movilización de calcio. Esto sugiere cuestiones acerca de cómo se generan los picos de calcio inducidos por uno u otro grupo de sustancias (vías de señalización) o de dónde procede el calcio (depósitos intracelulares y/o el medio extracelular). Nos preguntamos, si la concentración elevada de calcio en el citosol y prolongada en el tiempo, estimulada por estas sustancias, tiene como fin la contracción celular y en qué medida depende la contracción de la célula trabecular del calcio interno y externo. Otra cuestión interesante era estudiar cómo se desarrolla, la intensidad del proceso de contracción a nivel celular y el porcentaje de células capaces de contraerse. Y comprobar el paralelismo entre la contracción celular y los cambios en la permeabilidad del tejido.

Especialmente, nos preguntamos si el proceso de contracción depende de alguna manera de la aportación de calcio extracelular, tal y como sucede en músculo liso (Webb, 2003), en definitiva si la supuesta activación de canales de calcio capacitativos o dependientes de los depósitos intracelulares (*store-operated calcium entry*, SOCE) interviene en la contracción inducida por agonista.

### **5a. Entrada Capacitativa de Ca<sup>2+</sup> extracelular (CCE)**

Inicialmente, abordamos la cuestión de la señal de calcio estimulada por BK y ET-1 para determinar algunos de los parámetros más descriptivos, como la amplitud del pico o su tiempo de relajación, según el parámetro T<sub>70</sub>, tiempo transcurrido desde el momento de máxima amplitud del pico y su disminución en un 70%.

Los primeros resultados del estudio muestran la activación de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de los depósitos intracelulares ('store-operated calcium channels', SOCC), en células trabeculares (TM), tras la estimulación con tapsigargina (TG) (Fig. 5a,b; 6a; 7) y las sustancias vasoconstrictoras: bradykinina (BK) y endotelina (ET-1) (Fig. 9a, 1a,b; 2a,b,c,d). BK y ET-1 son agonistas de receptores acoplados a proteína G<sub>q</sub> que estimula la PLC<sub>β</sub> y la hidrólisis de PIP<sub>2</sub> produciendo IP<sub>3</sub> y diacilglicerol (DAG). La causa de activación de los SOCC es el vaciamiento del contenido basal de Ca<sup>2+</sup> guardado en los depósitos intracelulares (retículo endoplasmático y mitocondrias) cualquiera que sea el procedimiento aplicado. Fisiológicamente, se produce IP<sub>3</sub> (forma activa) pero también existen otras señales que inician descarga de Ca<sup>2+</sup> intracelular como la descarga pasiva, con tapsigargina, que actúa por bloqueo de la función de la bomba de recaptación de calcio del retículo endoplasmático (Parekh and Penner, 1997a). Para empezar la caracterización farmacológica de la movilización del

calcio por estas sustancias, testamos los compuestos: 2-APB,  $\text{La}^{3+}$  o  $\text{Gd}^{3+}$  y SKF96365, algunos de los bloqueadores reconocidos de los canales de calcio operados por agonista/receptor (ROCC), tanto para la entrada capacitativa (CCE o SOCC) como la no-capacitativa (NCCE), sobre su acción trataremos en un apartado posterior.

Las corrientes capacitativas transmembrana o de entrada de calcio dependientes de los depósitos intracelulares ( $I_{\text{CCE}}$  o  $I_{\text{SOC}}$ ) se activan en función del estado de vaciamiento de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares. De este grupo de corrientes, la mejor caracterizada electrofisiológica y biofísicamente es la corriente activada por descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  o  $I_{\text{CRAC}}$  ( $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  currents, CRAC) (Hogan and Rao, 2007; Parekh and Putney, Jr., 2005b; Vig and Kinet, 2007). Estas corrientes permiten la recaptación de calcio y la recuperación del contenido basal en los depósitos descargados. El nivel de vaciamiento es determinante en la activación de los canales CRAC en la membrana y están involucrados en otras distintas funciones. Inicialmente, las corrientes CRAC fueron descritas en registros electrofisiológicos en mastocitos peritoneales de rata y en células humanas Jurkat T (Lewis and Cahalan, 1989; Penner et al., 1988), posteriormente han sido caracterizadas en muy diversos tipos celulares.

En nuestros resultados, obtuvimos corrientes inducidas tras la aplicación de TG ( $I_{\text{TG}}$ ) al medio extracelular con características corriente vs voltaje similares a las CRAC, es decir, corrientes de calcio de pocos pA/pF, con forma rectificadora de entrada y altamente selectivas para  $\text{Ca}^{2+}$  (potencial de reversión próximo a +50mV). Podemos observar el promedio de la relación corriente versus voltaje (I/V) para TG en la figura (Fig. 8b). Con una amplitud de densidad de corriente alrededor de -1pA/pF a los 5 min de aplicación de la droga (-80 mV) y una evolución creciente y de tipo lineal (Fig. 8a) (Moreau et al., 2005; Takemura et al., 1989b). De todos modos, estas características (I/V), no son exclusivas de las  $I_{\text{CRAC}}$ , hay que tener en cuenta que existen otros canales de  $\text{Ca}^{2+}$  selectivos como los TRPV5 y TRPV6, que no pertenecen al grupo de las  $I_{\text{SOC}}$  (den Dekker et al., 2003).

Experimentos similares, mostraron corrientes inducidas intracelularmente por  $\text{IP}_3$  ( $I_{\text{IP}_3}$ ) junto al quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (EGTA), y dado que usamos una combinación de concentraciones elevadas de  $\text{IP}_3$  (30  $\mu\text{M}$ ) además de EGTA (10 mM), estimulamos fuertemente la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo y la no-recaptación. La evolución de  $I_{\text{IP}_3 + \text{EGTA}}$  es rápida, de tipo exponencial, registrando valores de corriente de casi -2 pA/pF (-80 mV) a los 5 min del inicio de la diálisis (Fig.9a) (Parekh, 2003; Parekh and Putney, Jr., 2005b). La relación I/V es ligeramente rectificadora de entrada y no-selectiva con un potencial de reversión entre +10 y +20 mV (Fig.9b).

Teniendo en cuenta que el efecto de  $\text{IP}_3 + \text{EGTA}$ , es el de vaciar el retículo de forma rápida y prolongar la situación de baja carga de calcio en el retículo, las corrientes de calcio de entrada que esperamos serían de la misma naturaleza que para la TG, es decir, de tipo capacitativo, o incluso corrientes CRAC y por tanto selectivas al calcio. No obstante, los resultados nos conducen a otro modelo, el potencial de reversión y cierta corriente de salida determinan que  $I_{\text{IP}_3 + \text{EGTA}}$  es una corriente catiónica capacitativa pero no-selectiva como lo es  $I_{\text{TG}}$ . El factor diferencial principal es la activación de los receptores  $\text{IP}_3$ , por lo que pensamos que éstos, de alguna forma,

podrían estar modulando la actividad de ciertos canales catiónicos permeables al calcio pero no-selectivos distintos a los canales selectivos activados por TG.

### 5a.1 Receptores de inositol trifosfato (InsP<sub>3</sub>R)

Los receptores/canal de IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) se encuentran, principalmente, en el retículo pero no es un lugar exclusivo (hay en vesículas secretoras, en el aparato de Golgi y a veces, en la membrana plasmática). Los depósitos de calcio sensibles a IP<sub>3</sub> están física y funcionalmente interactuando con las mitocondrias y esto se ve en distintos tipos celulares como los cardiomiocitos (Jaconi et al., 2000), en células de mucosas (Csordas et al., 1999) o en oligodendrocitos (Simpson et al., 1997). Las mitocondrias suelen actuar como *buffers* pasivos de calcio y al absorberlo activan su metabolismo para generar ATP. Aunque la sobrecarga de calcio también puede llevar a la apoptosis celular. En cualquier caso, las mitocondrias mantienen una relación muy estrecha con los canales de descarga de calcio intracelular como los receptores de IP<sub>3</sub>, modulando su actividad (Rizzuto et al., 2000). De hecho las diferentes isoformas de estos receptores están localizadas cerca de mitocondrias, y se hipotetiza que una proteína específica podría hacer de enlace entre ambas estructuras (Filippin et al., 2003). También, se ha podido observar que para ciertos tipos celulares, como las neuronas, los IP<sub>3</sub>R se exhiben muy próximos, prácticamente en contacto, a la membrana plasmática (Blaustein and Golovina, 2001) se ha especulado sobre un posible acoplamiento entre la membrana y estas estructuras receptoras tan eficientes para la trasducción de señales.

Su agonista, el inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) es un segundo mensajero producido por el ciclo fosfoinositídico en respuesta a gran variedad de estímulos extracelulares (hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, incluso la luz); la descarga de calcio del retículo estimulada tras la apertura de los IP<sub>3</sub>R es parte de la cascada de señalización para funciones celulares como la diferenciación, la proliferación, fertilización, la secreción, la contracción muscular, respuestas inmunes y transducción de la luz, entre otras.

La relación de proximidad física entre estos receptores y la membrana celular es habitual, para lo cual incluso, llegan a redistribuirse en los lugares próximos a la membrana plasmática en forma de *clusters*; como en células de músculo liso, en las que los IP<sub>3</sub>R se concentran y pueden activar canales de potasio dependientes de calcio, hiperpolarizando y relajando así el músculo tras la contracción previa, que también precisa de una señal de calcio (Nelson and Quayle, 1995).

Por todo ello, inicialmente, se estudió la posibilidad de que los IP<sub>3</sub>R fueran parte del complejo de activación por acoplamiento de los canales SOC, el vaciado de los depósitos induciría un cambio conformacional en el receptor que se transfiere al canal en la membrana plasmática, por interacción proteína-proteína (Berridge, 2004). Finalmente se ha descartado esta hipótesis y determinado que la interacción entre el retículo y la membrana, se debe a una proteína llamada STIM1 que funciona como sensor de calcio en la membrana del retículo (Hewavitharana et al., 2007).

## 5a.2 STIM1, Orai y TRPCs

Los estudios más recientes determinan que STIM1 y Orai1 son parte esencial del mecanismo de la activación de corrientes de calcio capacitativas (SOC), especialmente de las corrientes selectivas, tipo CRAC (Hewavitharana et al., 2007). La descarga de calcio del retículo induce la traslocación de la proteína STIM1 que se aproxima a las zonas más cercanas a la membrana celular donde interacciona con Orai1 (proteína del canal) permitiendo la activación del canal y la entrada de calcio extracelular.

En cambio, la identidad de las corrientes no-selectivas dependientes de los depósitos intracelulares, es decir, capacitativas pero no CRAC, no está tan clara. Aunque se ha atribuido esta función a la versátil y multifuncional familia de proteínas/canal *transient receptor potential* (TRP) (Venkatachalam and Montell, 2007) abundante en multitud de tejidos, la cuestión no está resuelta. No se sabe con certeza si estas proteínas pueden formar por sí mismas el canal capacitativo o bien, el canal se formaría a partir de la combinación de algunas proteínas TRP y Orai junto a la acción sensora de STIM desde el retículo (Worley et al., 2007).

Del conjunto de las TRP (7 subfamilias), la subfamilia canónica de TRP (TRPC1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7) forma canales catiónicos no-selectivos activados por diferentes mecanismos, uno de los cuáles es el de la vía PLC (Putney, 2005; Putney, Jr., 2004). Concretamente tanto TRPC1 como TRPC4 pueden formar complejos homómeros y también, por similitud, combinaciones entre estos, que dan lugar a la formación de canales capacitativos no-selectivos (Clapham et al., 2001). En células trabeculares en cultivo y en el tejido determinamos la presencia de las proteínas TRPC1 y 4. Por otra parte, TRPC3 y 6 considerados los candidatos más plausibles para formar canales de calcio 'no-capacitativos' activados por DAG (y análogos), en células trabeculares no obtuvimos resultados concluyentes en relación a la expresión de TRPC3 y los niveles para TRPC6 son indetectables (Fig. 4) (Dietrich et al., 2005; Hofmann et al., 1999).

Mediante registros de 'parche perforado', detectamos en células trabeculares, corrientes transmembrana de entrada inducidas por BK ( $I_{BK}$ ). Los segundos mensajeros derivados de la acción de BK podrían dar lugar a corrientes capacitativas (vía  $IP_3$ ) selectivas y/o no-capacitativas (vía DAG), menos selectivas. Los resultados mostraron la aparición de corrientes no-selectivas, con potenciales de reversión ligeramente positivos (alrededor de +10 mV) o prácticamente cero (Fig. 3b). Y la evolución de la corriente con el tiempo muestra un crecimiento lineal con un valor alrededor de -0.6 pA/pF, a los 5 min posteriores a la aplicación de la droga. La relación I/V de  $I_{BK}$  resultó similar a la observada para  $I_{IP_3}$  así que las corrientes observadas para BK son de tipo capacitativo pero no selectivas. No descartamos la mezcla de corrientes no-capacitativas mediadas por DAG, que podrían derivar el potencial de reversión a valores menos positivos.

Corrientes de entrada de calcio extracelular inducidas por BK a través de canales no dependientes de voltaje aparecen ya en un estudio de patch y fluorescencia, en 1987, de Margaret Colden-Stanfield en células endoteliales de aorta bovina. La movilización del calcio por BK permitía la apertura de canales tipo BKCa. Aunque no se determinaba qué porcentaje de este calcio implicado en las corrientes de potasio proviene del aporte de calcio intracelular, almacenado en los depósitos y descargado por  $IP_3$  y cuánto del medio extracelular (Colden-Stanfield et al., 1987).

En células endoteliales, más tarde, se detectaron dos tipos de corrientes de calcio de entrada inducidas por BK, una corriente rápida de cloruro que podía bloquearse con ácido 4,4'-diisotiocianatostilbene-2, 2'-disulfónico (DIDS) y otra de evolución más lenta, que producía un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a modo de 'plateau' y podía bloquearse por  $\text{La}^{3+}$  y no por DIDS. El comportamiento de esta última, se correspondía con un tipo no-selectivo de influjo catiónico (Song and Davis, 1994). En células ganglionares de la raíz dorsal de neonatos de rata se hallaron también corrientes de entrada activadas por el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulado por BK, se trataba de corrientes de cloruro dependientes del calcio descargado por los depósitos (England et al., 2001).

En la misma línea de estudios, en 1989, aparece un artículo sobre el efecto de la BK en la relación corriente- voltaje en células endoteliales de arteria pulmonar bovina (Cannell and Sage, 1989). En este trabajo se confirma que el estímulo no activa canales de calcio dependientes de voltaje. Se usaron técnicas de 'whole-cell voltage-clamp' y fluorescencia en simultáneo para determinar la relación entre las variaciones de calcio intracelular y cambios en el voltaje de membrana. El incremento de calcio provenía de los depósitos intracelulares y resultaba ser una fase rápida que declinaba hacia el estado basal o estable (u oscilante en ocasiones), seguida de una fase lenta de entrada de calcio extracelular que prolongaba el nivel elevado de calcio respecto al basal por tiempos más largos. Con relación al tipo de entrada del calcio no se determinó la naturaleza de los canales responsables. Eran vías no-selectivas, así que se pensó en la implicación del intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ , que introducía calcio tras la entrada de sodio a través de estos canales catiónicos indeterminados. Pero existía ya otra hipótesis, que tenía en cuenta la posible conexión entre la descarga de los depósitos intracelulares de calcio y la activación de canales de membrana que dependería del estado de vaciamiento de calcio de estos depósitos (Hallam et al., 1989).

Hay evidencias sobre el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  no-selectivo inducido por BK en células endoteliales desde 1992, D. Mendelowitz y colaboradores caracterizan la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Na}^{+}$  extracelular por estímulo de la BK a potenciales negativos (-60 mV) y observan el potencial de reversión en valores cercanos a 0 mV así como el bloqueo por  $\text{La}^{3+}$  de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^{+}$  (Mendelowitz et al., 1992).

En la línea humana de trabeculares conocida como hTM5, procedimos con el mismo protocolo que para BK (parche-perforado voltage-clamp) pero testando ET-1. Los resultados obtenidos se muestran en el registro versus tiempo de la **Fig. 3c**. Se trata de la activación de corrientes catiónicas de entrada de mayor amplitud ( $I_{\text{ET-1}} \sim -3$  pA/pF), que los valores obtenidos para  $I_{\text{BK}}$  ( $I_{\text{BK}} \sim -0.6$  pA/pF); los resultados con fura-2 en células bovinas, también muestran amplitudes de respuesta para ET-1 (0.1  $\mu\text{M}$ ) superiores que para BK (1 $\mu\text{M}$ ).

Los datos sobre el potencial de reversión y las formas de las diferentes I/V para taspigargina,  $\text{IP}_3$  (+EGTA) y BK, indican la coexistencia de vías selectivas y no-selectivas de entrada de calcio extracelular en este tipo celular. Esto sugiere las diferentes naturalezas de los canales implicados y favorece las hipótesis relacionadas con la colaboración de los receptores  $\text{InsP}_3$  en la activación de los canales de calcio, por cambio conformacional y posible acoplamiento para la estimulación por receptor (Dellis et al., 2006; Domeier et al., 2008).

En el artículo de (Vanden Abeele et al., 2004) se describen dos tipos de corrientes de calcio capacitativas, una activada por receptor  $IP_3$  ( $I_{IP_3}$ ) y la otra inducida por el vaciamiento de los depósitos de calcio, con TG ( $I_{TG}$ ). Estos registros fueron realizados en células epiteliales de cáncer de próstata (LNCaP) y presentan resultados muy similares a los obtenidos en células trabeculares, es decir, los influjos capacitativos estimulados por TG y por  $IP_3$  son distintos. Para empezar, eran corrientes aditivas, independientes la una de la otra. Pruebas con citocalasina D (interfiriendo sobre el citoesqueleto), depolimerizando la red de actina, no mostraron efectos sobre las corrientes, pero con caliculina A (CalyA) que polimeriza la red de actina periférica, se observó que mientras la remodelación del citoesqueleto cortical no tiene prácticamente efectos sobre  $I_{TG}$  impedía en cambio, la activación de  $I_{IP_3}$ . Otro elemento interesante es el papel de la fosfolipasa A2 en la activación de  $I_{TG}$  y sin duda, un factor revelador es la importancia del citoesqueleto cortical para  $I_{IP_3}$ . Por tanto, no sólo el contenido de los depósitos decide la activación de corrientes capacitativas de calcio sino que para el caso de  $I_{IP_3}$ , el mecanismo de activación de los canales de calcio puede depender del estado del citoesqueleto. Observaron también, que la cantidad de calcio descargada por  $IP_3$  era inferior a la cantidad respectiva para la TG, en cambio las corrientes transmembrana inducidas en el primer caso,  $I_{IP_3}$ , eran superiores (hasta -2 pA/pF, -80 mV) al segundo grupo,  $I_{TG}$  (alrededor de -0.6 pA/pF, -80 mV).

Otras sustancias similares a la BK y la ET-1, son la histamina (His), la trombina (Tr) y la acetilcolina (ACh), con efectos sobre la movilización de calcio y la estimulación de contracción en diversos tipos celulares. Los receptores correspondientes están acoplados a proteína  $G_q$  e implican la vía  $PLC\beta$ . Todas estas sustancias son mediadores de inflamación en diversos tejidos (en el pulmón, contribuyen a la broncoconstricción y vasoespasmo, en tejidos vasculares, contribuyen a la permeabilidad del tejido o la vasodilatación dependiente del endotelio). No obstante, hay diferencias decisivas entre estos agentes contráctiles; para BK y ET-1, la vía PLC ( $IP_3$  y DAG) es el origen de la cascada de señalización para la dinámica del  $Ca^{2+}$ , en cambio para His y ACh aunque la descarga  $Ca^{2+}$  intracelular está implicada, se activan otras vías de señalización distintas, que permiten por ejemplo, que el influjo de  $Ca^{2+}$  sea por canales no-capacitativos. Esto es debido al tipo de proteína G a la que está acoplado el receptor en cuestión; para His y ACh (receptores muscarínicos) la entrada de calcio depende de la proteína G sensible a la toxina pertusis (PTX) y es independiente de DAG. Otros factores diferenciadores de las corrientes de calcio inducidas por estas agonistas son el tipo celular y el depósito de calcio descargado, mientras la BK descarga calcio del retículo endoplasmático fundamentalmente, que es sensible a la TG, la trombina actúa sobre otros depósitos, insensibles al bloqueo de la SERCA, por la TG (Hallam et al., 1989; Wang and Kotlikoff, 2000).

### **5a.3 Entrada de calcio capacitativa y no capacitativa en células trabeculares**

Se ha reconocido la existencia de entrada de calcio mediada por receptor por vías que no pertenecen al mecanismo de la entrada capacitativa, se trata de la entrada de calcio no-capacitativa (NCCE). En ausencia de descarga ni ningún otro tipo de movilización del calcio intracelular, se ha descrito la activación de influjo de calcio tras el estímulo de ciertos receptores de membrana, en muy distintos tipos celulares, como por ejemplo, en hepatocitos (Tinton et al., 1996), células Jurkat T (Llopis et al.,

1991), fibroblastos (Munaron et al., 1995) o células acinares pancreáticas ((Krause et al., 1996; Mignen et al., 2005).

Si en la literatura encontramos la descripción de la CCE como un tipo de entrada de calcio que opera con los depósitos intracelulares, principalmente el retículo endoplasmático, y los canales asociados son los llamados 'Store-Operated Calcium Channels' (SOCC), la NCCE, está descrita como otra vía de entrada de calcio extracelular ligada a la acción de la cascada de señalización de ciertos receptores en membrana pero independiente del estado de carga de calcio de los depósitos intracelulares. Los canales que permiten este influjo son conocidos como 'Receptor-Operated Calcium Channels' (ROCC). Ambos grupos de canales pueden coexistir, y aunque mantienen relaciones de adición o inhibición mútua en ocasiones, son corrientes que parecen moverse a través de canales distintos. Una diferencia clave entre los dos grupos es la no-selectividad de los ROCC, de hecho, más apropiadamente se les llama canales catiónicos y no canales de calcio.

El ácido araquidónico (AA) es un ácido graso presente en la membrana plasmática implicado en multitud de señales intracelulares fisiológicas y también, patológicas. Este ácido se genera comunmente como producto de la fosfolipasa A2 (activada por las prostaglandinas, potentes vasodilatadores que incrementan la permeabilidad vascular) o bien, producido por la cadena de señalizaciones de fosfolípidos de la vía PLC (diacilglicerol lipasa). Se ha visto que AA induce y regula la actividad de canales iónicos de calcio incluidos los de CCE y NCCE.

A veces, AA activa corrientes no-capacitativas muy selectivas para el calcio, para las cuales se desconocen la identidad de los canales responsables, pero también activa corrientes no-capacitativas no-selectivas, para las cuales, por sus propiedades biofísicas, existen plausibles candidatos como los canales TRPC y TRPV (McFadzean and Gibson, 2002).

Las sensibilidades al uso de bloqueadores lantánidos (bloqueadores de canales de calcio) son muy parecidas en los dos tipos de corriente, a excepción del 2-APB (bloqueador de CCE) que no inhibe la activación de las NCCE mediadas por ácido araquidónico (Shuttleworth et al., 2004).

En el artículo de Dali Luo et al. (Luo et al., 2001) se contrasta el efecto del ácido araquidónico (NCCE) y la thapsigargina (CCE) en HEK293; los resultados son muy interesantes, puesto que muestran la relación antagónica entre ambas entradas de  $Ca^{2+}$ , la activación de una supone la inhibición de la otra.

En células de ovario de hamster, se midió la entrada de calcio de tipo no-capacitativa inducida por el receptor de PDGF. Estos receptores activan la vía PLC $\gamma$ , produciendo InsP<sub>3</sub> y DAG. Se comprobó cómo la descarga de calcio por la vía de InsP<sub>3</sub> permitía la entrada de calcio capacitativa, y a la vez, existía otra vía de influjo independiente de la descarga de calcio intracelular, que probablemente deriva de la acción de algún metabolito de InsP<sub>3</sub> (InsP<sub>4</sub>) o bien de la regulación directa o indirecta de ciertas isoformas de PKC (activadas por la vía DAG) (Mathias et al., 1997).

La esfingosilfosforilcolina (SPC) es un vasoconstrictor de arterias intrapulmonares de rata muy efectivo y potente, se determinó que su efecto contráctil es inhibido significativamente por 2-APB y La<sup>3+</sup>, bloqueadores típicos de la CCE, en cambio,

inhibidores de canales de calcio tipo L no tenían prácticamente efecto sobre la contracción y la descarga previa de calcio del retículo por taspigargina o  $\text{InsP}_3$  no impedía tampoco la contracción (Thomas et al., 2005). De manera que los mecanismos de activación de ambos caminos de entrada de calcio son distintos. Un elemento que parece ser común en las contracciones vía NCCE es la implicación de Rho quinasa, puesto que sus inhibidores impiden el proceso contráctil.

Mientras en algunos casos, la NCCE actúa como extensión de las posibilidades de entrada de calcio (Schubert, 2005), en otros casos la NCCE actúa en modo antagónico a la CCE, o como mecanismo regulador de ésta. Las dos vías de entrada de calcio pueden regularse en modo recíproco, la activación de una es por separado de la otra en función de diferentes concentraciones de la agonista aplicada. Por ejemplo, a bajas concentraciones es preferente la activación de NCCE y a altas concentraciones el impacto de vaciado de los depósitos inicia la entrada capacitativa primero y posteriormente un incremento sostenido de calcio NCCE (inhibido por calcineurina). Mientras la señal de calcio es elevada y sostenida en el citosol, el sistema de canales ROCC se mantiene inactivo; quizás el antagonismo no es tanto por regulación mutua, sino por simple precaución, es decir, evitar que las entradas sean aditivas para que no se produzca un efecto tóxico por sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula (Luo et al., 2001).

En células trabeculares, quisimos testar mediante un sencillo protocolo con fura-2, la posibilidad de observar aislada la entrada de calcio no-capacitativa inducida por agonista, concretamente por BK. El experimento consiste en la descarga de calcio intracelular pasiva mediante TG y una vez finalizada la descarga de calcio del retículo y la consiguiente entrada extracelular capacitativa, ya en el retorno al basal, estudiar el efecto de BK en el calcio citosólico. En estas condiciones, la vía  $\text{IP}_3$ , o capacitativa, del agonista no juega ningún papel, no efectuará descargas importantes de calcio puesto que el retículo está vacío y sin posibilidad de recuperación, pero la vía del DAG (y/o ácido araquidónico) o no-capacitativa, podría todavía funcionar. Si la activación capacitativa ya se había producido y desactivado mayormente en el momento de la aplicación de BK, debido al proceso previo con TG, nos preguntamos si observaríamos, la entrada de calcio por vías no-capacitativas. Los resultados fueron negativos, no hubo variaciones de incremento significativo en la señal de calcio basal por aplicación de Bk en el retorno al estado basal de calcio citosólico tras la respuesta de la descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulada por TG (datos no mostrados).

La primera y más evidente observación derivada de estos datos preliminares, es que los receptores de  $\text{IP}_3$  en células trabeculares se concentran principalmente en el retículo endoplasmático, y no en las mitocondrias, puesto que la descarga pasiva por TG inhibe la descarga de calcio intracelular por BK. Este protocolo no es definitivo para la demostración sobre la inducción de corrientes no capacitativas por agonista, por ejemplo, ambas corrientes podrían activarse de forma aditiva, casi en simultáneo, y no podríamos aislarlas en el tiempo en este protocolo. Distintas explicaciones pueden deducirse del resultado: 1) CCE y NCCE, aparecen al mismo tiempo, no funcionan independientes, y por lo tanto no pudimos distinguirlos, 2) la vía  $\text{PLC}_\beta$  (BK, ET-1) activa CCE pero no activa canales no-capacitativos de forma significativa en células trabeculares, 3) los canales implicados en la NCCE son sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ , en ausencia del transitorio de calcio no se activan. Por lo que podríamos decir que CCE y NCCE actúan en combinación. Aunque desconocemos la función de NCCE.

#### **5a.4 Bloqueadores de la entrada capacitativa (y no-capacitativa) de Ca<sup>2+</sup>**

La caracterización farmacológica con bloqueantes específicos no es posible para estas corrientes, los efectos de los bloqueantes clásicos de canales de calcio tipo SOC o capacitativos presentan efectos diversos, dependientes del tipo celular y del rango de concentraciones. Tampoco se ha determinado inhibidores farmacológicos que diferencien la entrada CCE de la NCCE. Ciertas sustancias orgánicas, como el 2-amino etoxidifenilborato (2-APB) o el SKF96365 (del grupo de los imidazoles) son bloqueadores típicos de las corrientes SOC. Los lantánidos (La<sup>3+</sup> y Gd<sup>3+</sup>) por su carga positiva, emulan al Ca<sup>2+</sup> y compiten con éste, en la unión con el canal bloqueando la entrada de calcio extracelular (suelen ser menos específicos) (Parekh and Putney, Jr., 2005a).

Las corrientes SOCC y ROCC son resistentes a los bloqueadores/antagonistas específicos de otras corrientes de calcio, como las dependientes de voltaje tipo-L y -T (dihidropiridina, nifedipina, verapamil, rutenium red) o las corrientes tipo TRPV1 (capsazepina).

Nuestros resultados muestran que los bloqueadores característicos de la corriente CCE (SOC) y NCCE, inhiben o bloquean la entrada de calcio estimulada por TG (Fig. 7a, b, c, d) y también pero menos, de la entrada inducida por BK y ET-1 (Fig. 2a, b, c, d) en células trabeculares. Presumiblemente, esta diferencia proviene de la distinta naturaleza de los canales activados en uno y otro caso, la señalización de las vías de IP<sub>3</sub> y DAG implican quizás formas de activación distintas (mezcla de CCE y NCCE) respecto al mecanismo que funciona para la TG (netamente, una corriente capacitativa y selectiva). La acción de La<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup> y 2-APB sobre la entrada de calcio inducida por TG es prácticamente total y más efectiva que en el caso de la entrada de calcio inducida por agonista (BK y ET), para la cual el efecto bloqueador del lantano, 2-APB o el SKF96365 es menor (Nilius and Droogmans, 2001).

#### **5a.5 Particularidades del 2-APB**

Originariamente, el 2-APB se estudió como inhibidor de los receptores IP<sub>3</sub> ya que es una sustancia permeable que impide la apertura de los canales/receptor de IP<sub>3</sub> (distintas isoformas) y por lo tanto inhibe la descarga de calcio intracelular. Pero este efecto depende de la concentración, alrededor de los 100 µM se obtiene la completa inhibición de la descarga de calcio inducida por agonista/IP<sub>3</sub>, en diversos tipos celulares como plaquetas, neutrófilos o en pruebas de contracción sobre strips de aorta (Maruyama et al., 1997).

No obstante, las habilidades del 2-APB son muy diversas, a concentraciones por debajo de 50 µM, el efecto inhibitor sobre los InsP<sub>3</sub>R es insignificante y funciona como un bloqueador de las corrientes de entrada de calcio capacitativas endógenas (Diver et al., 2001), así como por ejemplo de algunos canales homómeros y heterómeros TRPC (canales catiónicos no-selectivos, activados por receptor y permeantes al calcio), aunque con particularidades dependiendo del tipo celular o incluso del mecanismo de activación del canal. Por ejemplo, se han encontrado evidencias contradictorias en estudios de sobreexpresión de canales tipo TRPC3 en células HEK293. La acción del 2-APB en la inhibición de canales SOC depende de la forma de activación, es decir si están implicados los InsP<sub>3</sub>R o sólo la vía del DAG

(OAG) (Kiselyov et al., 1998b; Trebak et al., 2003). En general, este tipo de resultados que parecen incompatibles se resuelven al determinar la inhibición parcial del 2-APB para estos canales sobreexpresados, en una u otra forma de activación (Lievremont et al., 2005). En definitiva, se considera este compuesto como un inhibidor o bloqueador de los canales de calcio capacitativos en el rango de concentraciones inferiores a 50  $\mu\text{M}$ , actuando sobre el canal desde el exterior.

No obstante, a muy baja concentración entre 1-5  $\mu\text{M}$ , 2-APB puede ser estimulante de la propia entrada de calcio, convirtiéndose en casi una agonista de la vía SOC (Prakriya and Lewis, 2001).

Por otra parte, el 2-APB puede activar canales de calcio no dependientes de los depósitos de calcio como TRPV1, TRPV2, TRPV3 (Colton and Zhu, 2007), así como la inhibición y potenciación de la activación de canales TRPM6 y 7 (Li et al., 2006) e incluso puede inhibir la bomba SERCA a altas concentraciones (Peppiatt et al., 2003).

La lista de efectos diversos de 2-APB incluye también la detección de un tipo nuevo de corriente permeable al calcio, en células RBL-2H3 m1, que no pertenecen ni al grupo de las CRAC ni al de las MagNum/MIC (Braun et al., 2003b).

Aunque 2-APB puede bloquear con especificidad corrientes capacitativas no está claro que también pueda inhibir con la misma eficiencia corrientes no-capacitativas.

La CCE inducida por TG (forma pasiva, ausencia de segundos mensajeros) es inhibida por 2-APB en el estado previo a la activación y también, bloqueada una vez está activa la vía de entrada.

Para células trabeculares, encontramos un bloqueo total de las corrientes capacitativas inducidas por TG (Fig.7a,7d) y un efecto de bloqueo significativo pero menor, en las corrientes de calcio extracelular estimuladas vía receptor (BK y ET-1) en presencia de 2-APB (50  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 2b,2d)

## 5a.6 Lantánidos

Este grupo de bloqueadores mimetizan al  $\text{Ca}^{2+}$  (afinidad de carga) pero su radio iónico hidratado impide que permeen por el poro como lo hace el calcio, ciertos cationes divalentes actúan como bloqueadores también porqué su tamaño es superior al del ión calcio. Pero en este tipo de mecanismo bloqueador la concentración nuevamente es un valor crítico a tener en cuenta. Por ejemplo, el  $\text{La}^{3+}$  a altas concentraciones puede bloquear la bomba que extrae el calcio citoplasmático, mientras que los valores típicos para el bloqueo con  $\text{La}^{3+}$  de las corrientes SOC suelen estar entre 10-100  $\mu\text{M}$  (Kwan et al., 1990). Mientras que otro lantánido, el gadolinio,  $\text{Gd}^{3+}$ , ha mostrado una acción más específica que el  $\text{La}^{3+}$ , en células de músculo liso una concentración de 1  $\mu\text{M}$   $\text{Gd}^{3+}$  era suficiente para bloquear la entrada capacitativa de calcio, y era menos sensible en cambio, para la entrada no capacitativa, estimulada por ácido araquidónico. No obstante, el tipo celular y la forma de activación tanto de la corriente capacitativa como no-capacitativa puede determinar comportamientos distintos en el efecto inhibidor (Broad et al., 1999).

En nuestros resultados en células trabeculares encontramos efectos de bloqueo sobre las corrientes de calcio capacitativas por TG (Fig. 7b, c, d) y vía receptor/agonista (BK, ET-1) (Fig. 2b, 2d), en presencia de  $\text{La}^{3+}$  (50  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{Gd}^{3+}$  (20  $\mu\text{M}$ ). Así como, observamos capacidad de bloqueo aunque más irregular del grupo de lantánidos sobre las corrientes capacitativas activadas para  $\text{IP}_3$  (+EGTA) (Fig. 11a, b). La eficacia del bloqueo puede depender del estado activo/inactivo del canal.

### 5a.7 SKF96365

Las corrientes de calcio sensibles a SKF96365 son principalmente de tipo SOCC y carácter no-selectivo, por lo que también se usa como bloqueador de corrientes tipo ROCC. Además, este compuesto del grupo de los imidazoles no es específico de estos canales, también puede bloquear la entrada de canales de calcio dependientes de voltaje (aunque en un rango de concentraciones distinto al SOC). Por esta habilidad se cree que la forma de bloqueo es directamente sobre el canal y no en ningún mecanismo relacionado con la forma de apertura del canal.

Probamos SKF96365 en el rango de pocos micromoles, adecuado para la inhibición de los canales SOC/ROC (10  $\mu\text{M}$ ), concretamente para el caso de la BK (Fig.2b). El resultado muestra la inhibición significativa aunque no total de la corriente control. Este efecto parcial para SKF y 2-APB, sugiere que las corrientes obtenidas por estímulo de BK son la mezcla de corrientes catiónicas selectivas y no-selectivas, conjuntamente.

### 5a.8 Corrientes monovalentes: característica de las corrientes tipo CRAC

Aunque en condiciones fisiológicas, las corrientes CRAC son altamente selectivas para el  $\text{Ca}^{2+}$ , en ausencia de cationes divalentes en el medio extracelular los canales responsables de estas corrientes son permeables a iones monovalentes. Además, teniendo en cuenta que las CRAC son del orden de pocos pA/pF, (-1 pA/pF a -80 mV en células Jurkat T) estas corrientes sustitutas monovalentes ( $\text{Na}^+$ ) son mucho mayores, su conductancia es hasta 100 veces superior.

Nuestro estudio pretendía observar si los canales capacitativos (SOC) responsables de  $\text{IP}_3$ +EGTA también perdían selectividad (a pesar de que la corriente total no exhibe la alta selectividad al  $\text{Ca}^{2+}$ , característica de los CRAC) y además aumentaban su conductancia, en ausencia de iones divalentes (esto ocurre también en los VOCC y en canales de calcio TRPV5/6). Para ello, activamos las corrientes capacitativas dializando la célula con la combinación de  $\text{IP}_3$  en alta concentración (saturante) y EGTA, en un medio con elevada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  que seguidamente perfundimos por una solución libre de cationes divalentes (DVF), abundante en  $\text{Na}^+$ . Inmediatamente, crece una corriente mayor (de 3 a 7 veces superior) que la corriente precedente, es rápida y también se deactiva muy rápidamente, en pocos segundos, aunque en otras ocasiones, en unas decenas de segundos (Fig.10). Podemos sugerir la presencia de canales CRAC en células trabeculares puesto que el efecto del cambio de selectividad se reproduce para al menos una parte de los canales capacitativos mediadores de  $\text{IP}_3$ +EGTA (Hogan and Rao, 2007).

Testamos además, 2-APB en estas corrientes cuando la deactivación era más lenta y observamos el efecto de bloqueo inmediato (Fig. 10a).

Los estudios hechos sobre ratios de permeabilidad dependientes de la concentración para los canales CRAC indican que se trata de poros multi-ión y que el filtro de selectividad para el  $\text{Ca}^{2+}$  se debe al enlace de alta afinidad que se establece con el  $\text{Ca}^{2+}$  específicamente (Prakriya and Lewis, 2003; Bakowski and Parekh, 2002).

Uno de los efectos más curiosos de este tipo de permeabilidad de los canales CRAC a cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) es que es variable y disminuye con el tiempo de exposición a baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (nivel micromolar) (Parekh and Putney, Jr., 2005a).

Otra característica de los canales CRAC es el papel del  $\text{Mg}^{2+}$  interno en su cinética. Este ión es un elemento esencial para que el propio canal se mantenga rectificador de entrada y bloquear las corrientes de salida. El  $\text{Mg}^{2+}$  a potenciales negativos potencia la entrada de calcio, pero no la salida. Este efecto se conoce como mecanismo para rectificación mediante bloqueo dependiente de voltaje por  $\text{Mg}^{2+}$  y funciona de la misma forma en otros canales rectificadores de potasio y sodio, no sólo para los CRAC (Kerschbaum and Cahalan, 1998).

### **5a.9 Funciones de las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de los depósitos intracelulares**

La función inicial propuesta para la entrada de calcio operada por los depósitos de calcio, fue la de relleno y recuperación del contenido basal de calcio almacenado en la célula (Parekh, 2007). No obstante, hoy se conoce que la entrada de calcio capacitativa está implicada en otros procesos celulares como son la exocitosis, la proliferación celular, producción de ATP mitocondrial, señalización para oscilaciones de calcio o la transcripción génica (Berridge et al., 2003). Patologías como los desórdenes neurodegenerativos, en inmunodeficiencias primarias, pancreatitis aguda y en algunos tipos de cáncer se asocian a la disfunción en esta vía de entrada de calcio (Targos et al., 2005).

Por el momento, se ha visto que la entrada de calcio SOC y no la descarga del calcio de los depósitos, está implicada en la regulación de las ciclasas adenilato sensibles al  $\text{Ca}^{2+}$ . Existe la hipótesis sobre la proximidad entre los canales SOC y estas enzimas (Cooper et al., 1998). También la sintasa de óxido nítrico (NOS) en células COS-7 o la fosfolipasa A2 dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en mastocitos, necesitan el calcio que aportan los canales CRAC para la producción de ácido araquidónico y la secreción de leukotriene C4 (Chang et al., 2006; Lin et al., 2000). Este tipo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , está implicada también en factores de transcripción como NF $\kappa$ B, AP-1 y NFAT, o genes como c-fos.

La presencia de canales SOC se conoce ya en una multitudinaria lista de tejidos y tipos celulares interviniendo en actividades fisiológicas muy distintas específica propias de células de la epidermis, endoteliales, músculo liso, músculo esquelético y cardíaco, hepatocitos, fibroblastos, en neuronas y células neuroendocrinas. Se han descrito que estas corrientes intervienen en la mecánica celular regulando la contracción, otras veces, el influjo de calcio se guarda en compartimentos con funciones que no gobiernan procesos contráctiles.

## 5b. Homeostasis del $\text{Ca}^{2+}$ y Glucocorticoides

La dexametasona (DEX) es un glucocorticoide comúnmente usado en todo tipo de tratamientos antiinflamatorios. Los corticosteroides en el ojo tienen efectos contraproducentes si el tratamiento es prolongado: incremento de la presión intraocular y disminución de la facilidad de salida del humor acuoso (glaucomas secundarios inducidos por corticoides).

En los ensayos que realizamos en trabeculares, obtuvimos alteraciones en ciertos parámetros del transitorio de calcio inducido por BK (Fig.18) en presencia de DEX ( $1\mu\text{M}$ ) para tratamientos a 1, 4 y 10 días, respecto a células control (vehículo). Por ejemplo, observamos que los valores de amplitud de concentración del pico de calcio (A), una medida orientativa de la cantidad de calcio descargada proveniente de los depósitos intracelulares sensibles a  $\text{IP}_3$ , eran estadísticamente inferiores en células pretratadas con DEX durante 10 días. Aunque no es un resultado determinante sugiere la posible disminución del contenido de calcio almacenado en el retículo, este cambio podría estar relacionado con modificaciones en la capacidad de buffering por efecto de la DEX (aumento en la expresión de  $\text{IP}_3\text{R}$  (pérdida de calcio-*leak*) o bien disminución de la actividad de la SERCA).

En una reciente publicación, (Davis et al., 2008) se ha mostrado cómo en células de linfoma de Murine, se detectó un incremento significativo en las expresiones de los receptores de  $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) (1 y 2) tras un tratamiento con DEX, a partir de las 24h. Por otra parte, se midieron cambios en la homeostasis del calcio estudiados con thapsigargina. El tratamiento con DEX aumentaba el nivel basal de calcio citosólico y la cantidad de calcio descargada por el retículo era menor tras el estímulo con thapsigargina (en un medio libre de calcio) en función de la dosis administrada en el tratamiento con DEX. No se encontró, no obstante, una correlación fuerte entre la elevación de  $\text{IP}_3\text{R}$  y las alteraciones en el contenido de calcio. No obstante, la hipótesis sobre la relación entre la mayor expresión de receptores de  $\text{IP}_3$  y la elevación de calcio y apoptosis inducidas por glucocorticoides no está todavía justificada, no se hallan ni por la cinética de los sucesos ni por la relación dosis respuesta un vínculo firme. Mediante un constructo antisense para la inhibición de la elevación de  $\text{IP}_3\text{R}$  se logró inhibir el aumento de su expresión pero no la elevación del calcio citoplasmático o la disminución del contenido del retículo. Se desconoce por lo tanto, cómo se producen los cambios en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  por tratamiento con DEX (Lencesova et al., 2002; Khan et al., 1996) Otro parámetro modificado por el tratamiento con DEX fue el de  $T_{70}$ , este intervalo mide el tiempo de relajación del transitorio o pico de calcio. Este valor da cuenta orientativa de la entrada de calcio extracelular (Resultados, Fig.1). Desde el primer día de tratamiento y en adelante, a los 4 y 10 días, se observó la disminución significativa de los  $T_{70}$  respecto al valor control, pero especialmente a los 10 días se hizo patente la disminución (la mitad del valor control) de  $T_{70}$  para las células pre-tratadas. Este cambio podría estar relacionado con el incremento en la actividad de *buffering* de  $\text{Ca}^{2+}$  (mitocondrias) o de extrusión de calcio citosólico al exterior ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa). Otra hipótesis pero también, podemos hipotetizar sobre la inhibición del mecanismo de influjo de calcio inducido por receptor/agonista (en este caso, BK) por efecto del tratamiento con DEX.

En el estudio de (Clark et al., 2005), se estudió el citoesqueleto de actina durante el tratamiento con DEX de tejido trabecular humano, revelando por ejemplo que se

promovía la formación de fibras de actina periférica, el *cross-linking* de actina (CLANs) y el aumento de fibras de estrés. Estos cambios del citoesqueleto pueden estar asociados con el incremento en la resistencia de salida del humor acuoso. Por otra parte, existe diversos estudios que prueban la relación entre el estado del citoesqueleto cortical y la activación de canales de calcio tipo SOC (Lockwich et al., 2001; Vanden Abeele et al., 2004)

### **5c. Contracción celular y movilización de Ca<sup>2+</sup>**

Como ya comentamos al principio de la discusión, el estado de contracción de la malla trabecular regula de la permeabilidad del tejido a la salida de humor acuoso y el valor de la presión intraocular que es un factor principal de riesgo de glaucoma. El mecanismo de contracción celular está íntimamente ligado a la movilización de calcio (Berridge, 2005) de una forma dependiente del tipo celular. Las células trabeculares expresan propiedades contráctiles parecidas a las de una célula de músculo liso, cierto sector de la población heterogénea de trabeculares contiene filamentos de alfa-actina contráctiles específicos de músculo liso aunque las trabeculares no son excitables y por tanto no poseen las mismas propiedades eléctricas (Ryland et al., 2003; Grierson and Rahi, 1979).

Para medir la contracción en el tiempo y para además, tener una valoración cuantitativa, utilizamos la técnica de la microscopía de tracción en células trabeculares (Gavara et al., 2006). Los resultados (Fig. 14a, 15a) muestran la respuesta promedio del curso de contracción de la célula por estímulo con BK y ET-1 en el control (medio extracelular fisiológico). Entre el 70 y 60% de las células respondían al estímulo para ambas drogas respectivamente, es decir, incrementaba su tono contráctil de forma significativa por encima del nivel basal de contracción, previo al estímulo. Estos resultados, nos confirman, que un porcentaje importante de la población de trabeculares presentan propiedades contráctiles. El curso de contracción es rápido en los primeros 3-4 min desde la aplicación de la droga, hasta llegar a un valor máximo de contracción que ha incrementado la fuerza de la célula en la mitad del valor basal. Este valor máximo se mantiene durante tiempos largos (>30min).

Por lo tanto, se puede decir que estas sustancias vasoconstrictoras incrementan el tono contráctil de las trabeculares hasta un valor máximo y este efecto es prolongado.

La rapidez al inicio, la durabilidad y la magnitud de la fuerza de la contracción a nivel celular mantiene cierto paralelismo con los datos obtenidos para el efecto de la endotelina sobre la permeabilidad del tejido en los experimentos de perfusión de segmento anterior de ojo bovino. En estas pruebas sobre el tejido, observamos que en apenas 15 min desde la aplicación de la droga, la permeabilidad del tejido desciende en la mitad del valor basal. A partir de ese valor este parámetro se recupera y aumenta lentamente la facilidad al paso del flujo. Vemos en la Fig.17, como el proceso de recuperación dura aproximadamente 2h. El lavado de la droga no altera significativamente la recuperación de la facilidad o permeabilidad, al menos, en un tiempo de recuperación avanzado (1h 30min).

La activación del músculo liso por diferentes agonistas o por depolarización eléctrica implica un incremento rápido de Ca<sup>2+</sup> citosólico, que en pocos segundos llega a su

valor máximo, el  $\text{Ca}^{2+}$  proviene de la descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico y del exterior celular, a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, así como de canales que operan vía receptor o por 'stretch' (Somlyo and Somlyo, 2004; Guibert et al., 2008). El  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario porque activa la vía clásica más relevante para este proceso; el  $\text{Ca}^{2+}$  se enlaza a calmodulina y activa la quinasa MLCK, esta quinasa fosforila a la cadena ligera reguladora de miosina II (rMLC) catalizada (y llega a su valor máximo en un tiempo de 4s), rMLC permite que la miosina ATPasa sea activada por actina y se produzca contracción del músculo (Kamm and Stull, 1986), esto ocurre clásicamente para los estímulos netamente depolarizantes. La contracción inducida por agonistas que activan la vía PLC depende de  $\text{IP}_3$  (descarga de calcio) y del otro 2º mensajero producido por la fosfolipasa, el DAG. Éste activa distintas isoenzimas de la proteína quinasa C (PKC) que también tienen efectos contráctiles (fosforilación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo- L o de proteínas que regulan el ciclo de puente de unión). Existe además vías alternativas y menos relevantes para músculo liso, en las cuales la fosforilación de rMLC es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (vía de la quinasa asociada a Rho, ROK).

El mecanismo principal de contracción de células parecidas al músculo liso y no-excitables como las trabeculares, no está determinado aún. La célula trabecular podría funcionar de forma similar, utilizando  $\text{Ca}^{2+}$  para la activación de MLCK, pero también podría contraerse por vías independientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , esta opción, de hecho, que no es tan importante para músculo sí lo es para células no-musculares (Kolodney et al., 1999).

### **5c.1 Contracción dependiente de $\text{Ca}^{2+}$**

Como ya sabemos que la descarga de calcio intracelular inducida por ET y BK en las trabeculares proviene del retículo principalmente, en forma de transitorio de calcio en el citosol elevado y rápido, seguido de un influjo lento y persistente (varios minutos) de calcio extracelular (vías capacitativa/no-capacitativa) y que las formas de señalización de calcio son distintas para sustancias vasoconstrictoras, capaces de contraer la malla trabecular que para sustancias vasorelajantes con el efecto opuesto.

Para comprobar si la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  por ET y BK es necesaria o regula de algún modo la contracción realizamos primero experimentos en ausencia de calcio extracelular. En los gráficos de contracción relativa (Fig.14a, 15a), vemos cómo la contracción inducida por agonista (BK y ET) es independiente de calcio extracelular, se produce de forma rápida y se mantiene en el tiempo de forma similar al control (Fig. 15d). La contracción tampoco se previene en presencia de  $\text{La}^{3+}$ , bloqueador de canales catiónicos (no específico) (14b).

Aunque pudimos observar diferencias significativas en la contracción (fuerza que ejerce la célula) en la fase inicial del proceso. La contracción sin calcio extracelular era más rápida y alcanzaba valores mayores aunque descendía a los pocos minutos (3-4min) igualándose al valor de la contracción control (calcio fisiológico). Las evoluciones de la contracción en ambos grupos alcanzan valores máximos similares pero la velocidad de contracción al principio, en ausencia de calcio, es superior. Esto sucedía para endotelina y bradiquinina igualmente. Observamos además, que el curso general de la contracción por endotelina en el control es un proceso más uniforme o 'regular' que para el grupo en ausencia de calcio (Fig.15d). Sobre este hecho no

tenemos referencias bibliográficas e investigamos posibles causas (discusión en próximos apartados).

En relación con el calcio intracelular, la contracción parece que sí depende de la descarga de calcio intracelular puesto que los experimentos realizados con 2-APB (50  $\mu\text{M}$ ) preincubado antes de la aplicación de la droga, inhiben la contracción prácticamente en su totalidad (Fig.15c). Aunque el 2-APB en la concentración usada actúa principalmente como bloqueador de canales de calcio capacitivos, a partir de concentraciones superiores a 50  $\mu\text{M}$  inhibe significativamente los  $\text{InsP}_3\text{R}$ . La disminución de la descarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular desciende significativamente (Resultados, tabla 2, aptdo. 4a.1), hasta valores de la mitad de amplitud del transitorio control. Pensamos que esta reducción del contenido de calcio libre disponible para la activación de MLCK impide el inicio de la contracción. Parece entonces, que el incremento transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico proveniente del retículo es un evento necesario para el inicio de la contracción.

## **5c.2 Contracción independiente de $\text{Ca}^{2+}$**

En células de músculo liso se ha determinado claramente la vía de contracción independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por Rho-quinasa. La estimulación de Rho/Rho-quinasa inhibe la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina MLCP y el equilibrio de  $\text{MLC}_{20}$  se decanta hacia la forma fosforilada. Esta vía estaría sujeta al receptor del estímulo, puesto que se ha encontrado, en células de la musculatura lisa vascular, que el estímulo de ciertos receptores (como por ejemplo, receptores de ET-1) que están acoplados tanto a proteína  $G_q/G_{11}$  como a  $G_{12}/G_{13}$  produce una regulación dual de la fosforilación de  $\text{MLC}_{20}$  a través de MLCK ( $\text{Ca}^{2+}$ ). La activación de  $G_{12}/G_{13}$  activa Rho y se activa así la vía de Rho-kinasa (Gohla et al., 2000).

La contracción independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por Rho-kinasa es un mecanismo descrito en distintos tipos celulares, y recientemente se ha descrito en distintas publicaciones en células trabeculares que cambios en el tono contráctil de la célula pueden modular la permeabilidad del tejido, es decir, la facilidad de evacuación de humor acuoso. El papel de Rho quinasa en los cambios de contracción celular se ha sugerido ya en diversos artículos que relacionan la inhibición de la quinasa con la disminución de fibras de estrés y adhesiones focales en la célula TM. Estos estudios han determinado que sustancias como la ET-1, tromboxano A<sub>2</sub>, angiotensina II o ácidos lisofosfatídicos (LPA) inducen contracción, al menos en parte, vía Rho GTPasa, en células trabeculares (Renieri et al., 2008; Tian and Kaufman, 2005; Thieme et al., 2000).

Estudios de contracción con algunos esteres de forbol (PMA) muestran cómo podría ser posible una contracción en ausencia de calcio intracelular y extracelular, mediada por Rho quinasa y no tan intensa como la contracción por calcio (Rao et al., 2001). En oposición, sustancias como la Forskolina que elevan el nivel de cAMP, desfosforilan a MLCK y relajan el tono contráctil de la célula TM (Ramachandran et al., 2008).

### 5c.3 Contracción sostenida

Otra característica de la contracción para BK y ET-1 es la fase de contracción sostenida (acorde con la lenta recuperación de la facilidad de evacuación de flujo en las perfusiones). Si hacemos el paralelismo entre células de músculo liso y las trabeculares, entonces el mecanismo de contracción consiste en un transiente de calcio rápido (para el cual los mecanismos de extrusión de calcio actúan rápidamente) que activa a MLCK dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina, seguido de una fase de contracción sostenida, donde se mantiene la fosforilación de  $MLC_{20}$ . En esta fase, existe un mecanismo independiente de  $Ca^{2+}$  que fosforila MLCK, se trata de la quinasa *zipper-interacting protein* (ZIP) y a su vez, se produce la inhibición de la fosfatasa de MLC (MLCP) por fosforilación de la subunidad reguladora de MLCP (MYPT1) o bien, por mediación de PKC que fosforila CPI-17 (inhibidor endógeno de MLCP) (Deng et al., 2001; Hirano et al., 2003; Niiró and Ikebe, 2001).

En nuestros experimentos probamos el efecto de la reintroducción de calcio al medio tras la aplicación de ET-1 e iniciada la primera fase de contracción, no observamos en promedio, ninguna variación en la fuerza de la célula, sugiriendo así que efectivamente, en trabeculares, como para músculo liso, los mecanismos operantes en la fase de contracción sostenida no dependen de  $Ca^{2+}$ .

Es muy interesante corroborar las equivalencias entre el comportamiento contráctil de las células trabeculares y de músculo liso. Y especialmente, es interesante la analogía que se puede hacer entre la malla trabecular y la función de la musculatura lisa circular (arterias, venas); en ambos casos la vía fisiológica de contracción es la de  $PLC\beta$  (para la musculatura lisa longitudinal la contracción es mediante  $cPLA2$ ) y en ambos casos, la contracción inicial es inhibida por bloqueadores de los  $Ins_3PR$  (efecto que pudimos comprobar con el 2-APB en nuestros experimentos), antagonistas de la calmodulina, inhibidores de MLCK o por depleción del retículo sarcoplásmico pero no por el bloqueo de la entrada de canales de calcio extracelular; en cambio impedir la entrada de calcio (canales dependientes de voltaje) inhibe la contracción para la longitudinal ('Smooth muscle contraction and relaxation', R. Clinton Webb; *Advan Physiol Educ* 27:201-206, 2003)

### 5c.4 Relajación de la contracción sostenida

La relajación de la musculatura lisa depende de la desaparición del estímulo de la contracción o bien por acción de sustancias tipo vasodilatadoras. En cualquier caso, aumenta la actividad de MLCP que desfosforila la  $MLC_{20}$  y por lo tanto, la contracción de la célula.

La relajación funciona en músculo liso por efecto principalmente de la inhibición por fosforilación, mediante la quinasa proteína G (PKG) o la quinasa proteína A (PKA), de la actividad de RhoA en la membrana, que se trasloca al citosol. Rho quinasa y la vía PKC, que dependen de Rho, ya no fosforilan la MLCP y la contracción decae. Este efecto relajante es superior al de la fosforilación independiente de  $Ca^{2+}$  de MLCK, que en si es sólo una forma de mantenimiento de la fosforilación asumida en un primer momento, en la fase inicial del proceso contráctil (Murthy, 2006).

La activación de PKG y/o PKA puede derivar de la vía de NOS (NO-cGMP-PKG) o bien, debido a un incremento de cAMP, respectivamente. De esta forma se inicia el proceso de relajación permitiendo que MLCP desfosforile MLC<sub>20</sub>.

Por ejemplo, se sabe que bradiquinina en células trabeculares bovinas amplifica la producción de cAMP derivada de la señalización PGE<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>/COX/PGE<sub>2</sub>). Y anteriormente, se caracterizó que en músculo liso del tejido respiratorio, Bk estimula cAMP (tras varios minutos en presencia de la droga) de forma dependiente de la fosforilación de la proteína quinasa mitogénica (MAPK), la cual es dependiente de PKC, de la cual depende la activación de cPLA<sub>2</sub> (Webb et al., 2003; Pyne et al., 1997; Yousufzai et al., 1995).

#### **5d. Deficiencia reguladora en la contracción en ausencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular**

Sobre la cuestión de las diferencias de contracción iniciales en ausencia de calcio extracelular versus control, y la irregularidad de la fuerza observada durante la contracción sostenida en ausencia de calcio extracelular vs control (Fig. 15d), hipotetizamos la posible implicación de las vías de calcio capacitativa/no-capacitativa estimuladas por Bk y Et-1 no directamente en la contracción per se, sino en la autoregulación del mecanismo contráctil. La fosforilación de MLCK en la fase inicial (dependiente de Ca<sup>2+</sup>) se ve favorecida por el nivel de Ca<sup>2+</sup> en el citosol, y sin embargo, en los resultados obtenidos vemos que existe contracción para el grupo de células en un medio libre de calcio y que incluso, la contracción alcanza un valor máximo superior y más rápidamente que el grupo control, en una solución fisiológica. También sabemos que el calcio intracelular descargado es suficiente para disparar el proceso de contracción. Por lo tanto, nos preguntamos sobre qué mecanismo 'limitante' podría estar actuando el flujo de Ca<sup>2+</sup> en la contracción por agonista en células trabeculares. Y específicamente, pensamos que la vía no regulada por falta del influjo Ca<sup>2+</sup> en el espacio inmediato en contacto con la membrana, puede ser la del DAG y PKC (isoformas dependientes de Ca<sup>2+</sup>). Se ha descrito en diversas publicaciones que existe una relación directa entre la entrada de Ca<sup>2+</sup> y el mantenimiento de la actividad de PKC y principalmente, del efecto regulador de PKC en la contracción del músculo liso (Ruzycky and Morgan, 1989; Kojima et al., 1994).

También, existen estudios concretos sobre PKC en la contractibilidad de la malla trabecular y el músculo ciliar, mientras en el primer caso, la inhibición de PKC tiene efecto relajante (se ha testado en terapia antiglaucoma, en modelo animal), en el segundo, es un efecto contráctil. Así mismo, activadores de PKC contraen la malla trabecular; la evolución de esta contracción es lenta y sostenida, posiblemente, por fragmentos catalíticos de la proteólisis de PKC asociada a la membrana (PKM), que en el citosol interaccionan con miosina, o bien, a través de la inhibición de MLCP (contracción sostenida). Parece que son isoformas independientes de calcio las que estarían implicadas en la contractibilidad del músculo liso, y también, de la malla trabecular como es PKC $\epsilon$ ; aunque también abunda la isoforma PKC $\alpha$  dependiente de calcio. Este calcio puede provenir de la descarga del retículo o bien, teniendo en cuenta que PKC se trasloca a membrana, justamente puede ser más efectivo el influjo de Ca<sup>2+</sup> (Andrea and Walsh, 1992; Thieme et al., 1999).

En cambio, en tejido vascular endotelial abunda la isoforma de PKC $\alpha$  (dependiente de Ca $^{2+}$ ) y está implicada especialmente en la iniciación de la contracción y en el desensamblaje de las uniones cadherinas (VE) inducidos por sustancias inflamatorias (histamina, trombina). Además, se ha determinado que existe una relación directa entre la entrada de Ca $^{2+}$  extracelular y el incremento en la permeabilidad del tejido (edemas). Por otra parte, se sugiere la importancia de la vía de calcio mediada por TRPC4 en la señalización, porque el *knockout* de la proteína en ratón inhibe los efectos en la permeabilidad de estas agonistas (Tiruppathi et al., 2002).

### 5d.1 Síntesis de NO y contracción en células trabeculares

En la regulación de la contracción del músculo liso se considera el óxido nítrico (NO) como una molécula principal de la señalización de la relajación. El NO producido por las células endoteliales se difunde rápidamente a las células del tejido vecino, un músculo. En este contexto se descubrió precisamente los efectos de NO, originalmente. Tanto el NO como la guanosina monofosfato cíclico (cGMP) son moléculas que aparecen en la mayoría de los tejidos y especies, y los efectos son variados desde la vasodilatación, la regulación inmunológica y genética, la neurotransmisión o la apoptosis, entre otras.

En ojo, esta vía de señalización (NO-cGMP-proteínas quinasas) también tiene un papel clave, en la fisiología y patología oculares. Inicialmente, se encontró NOS en retina y se comprobó que participaba en la señal de trasducción de la luz (Cobbs et al., 1985).

La presencia de la sintasa de NO (NOS) y el incremento de la evacuación del humor acuoso en la malla trabecular por efecto de la síntesis de NO revelan que esta molécula es también un modulador clave para este tejido. Los experimentos de perfusión de segmento de ojo humano ha demostrado la capacidad de esta molécula para regular la presión intraocular actuando sobre la malla trabecular (Schneemann et al., 2003; Wiederholt et al., 1994b). Y se ha detectado la presencia de NOS en la malla trabecular por inmunohistoquímica; además se ha visto que esta enzima se sobreexpresa en tejido de pacientes con glaucoma de ángulo abierto (Stefan et al., 2007). No obstante, estos estudios sobre el efecto de NO o de la producción de NO en la malla trabecular son en el tejido intacto o mediante perfusión de segmento anterior, por lo que las estructuras endoteliales del tejido, próximas al endotelio del canal de Schlemm, podrían estar modulando esta respuesta mediante los factores relajantes derivados del endotelio (EDRF) como son el NO y las prostaciclina (PGI $_2$ ) pero este componente no existe en estudios en cultivo.

Mediante la síntesis de NO (produce cGMP) o por la activación de PLA $_2$  (produce cAMP), sabemos que las trabeculares pueden limitar o regular la fosforilación de MLC $_{20}$ . Existe además, una relación directa entre Ca $^{2+}$  (intra/extracelular) y la activación de la forma constitutiva de NOS dependiente de calcio/calmodulina (eNOS) (Lin et al., 2000) y del Ca $^{2+}$  sobre la quinasa PKC, también, como ya comentamos (en el *upstream* de la cadena de PLA $_2$ ). Se sabe que la producción de cGMP o cAMP tiene efectos relajantes similares sobre las células TM y sobre el aumento en la permeabilidad del tejido (Kee et al., 1994; Gilabert et al., 1997).

Por tanto, nos cuestionamos la posibilidad de que un péptido producido en el endotelio vascular como la ET-1, indujera la síntesis del óxido nítrico (NO) en la célula trabecular como mecanismo autoregulator en paralelo con el efecto vasoconstrictor, de alguna forma promoviendo la actividad de la NOS dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina debido a la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a endotelina. Quizás este suceso podría explicar la evolución más lenta y relajada de la contracción en condiciones fisiológicas a diferencia de la contracción observada en ausencia de calcio en el medio extracelular. Es decir, nos preguntamos, primero, si existía producción de NO endógeno, segundo, si la entrada de calcio inducida por BK o ET-1 podría estar implicada en el proceso, en definitiva si el NO tenía relación con esas diferencias registradas en los grupos de contracción.

Los resultados de nuestros experimentos mostraron que la estimulación con ET-1 no induce la síntesis de NO en la célula trabecular; no se dan diferencias significativas para el comportamiento de las células con la aplicación de ET-1 al medio, en presencia del inhibidor de la NOS (L-NAME) o en su ausencia (Fig. 17b). Sin embargo, observamos un ligero descenso del nivel basal de NO en presencia de L-NAME, por lo que deducimos que pueda existir cierta actividad basal de la sintasa propia de la célula (datos no mostrados) (Matsuo, 2000; Prasanna et al., 2000).

Descartamos la vía NO como mecanismo de relajación en los experimentos de contracción inducida por Et-1. Al menos, la producción de NO no explica las diferencias en la contracción inicial en ausencia de calcio extracelular versus control.

## **5d.2 Canales $\text{BK}_{\text{Ca}}$ y contracción**

En general, la apertura de canales de potasio supone la hiperpolarización de la célula de forma que revierte y previene la depolarización producida típicamente por efecto de hormonas y neurotransmisores. Su activación es un mecanismo de inhibición. Encontramos estos canales en células de músculo liso, neuronales, epiteliales secretoras y sus posibilidades moduladoras les han convertido en importantes dianas farmacológicas. En condiciones fisiológicas, en músculo liso, por ejemplo, existen estudios que apuntan a que los factores de relajación derivados del endotelio activan un tipo de canal de potasio, de alta conductancia y dependientes de calcio ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ).

Se ha determinado y caracterizado las corrientes  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  en células trabeculares bovinas y está descrita la relación entre la activación de canales de  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  y la relajación de la malla trabecular (Stumpff et al., 1997; Soto et al., 2005; Stumpff et al., 2005b). En publicaciones recientes, se ha determinado la implicación de los  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  en la regulación del volumen en células trabeculares inducida por NO, así como también la activación de estos canales en la cascada de señalización de los receptores cannabinoides (CB1) y prostanoides (EP2) vía un segundo mensajero no difusible (Dismuke et al., 2008; Stumpff et al., 2005b).

Como la activación de los  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  implica una intensa hiperpolarización del potencial de membrana (deriva eléctrica) y esto favorece la entrada de calcio al citosol, si efectivamente están activos quizás vemos diferencias entre las movilizaciones del calcio en la situación control o fisiológica y la en presencia de un bloqueante de estos canales. De forma indirecta probaríamos la activación de la salida de potasio por el

estímulo con endotelina. La membrana celular es muy poco permeable al ión calcio, pero la gran diferencia de concentraciones citosólica y extracelular, generan fuerzas de deriva eléctrica tan potentes como para que un modesto incremento en la permeabilidad iónica al calcio y la hiperpolarización de la membrana produzca un gran influjo de este ión.

Mediante preincubación con iberiotoxina (IBTX) bloqueamos la supuesta activación de los BK<sub>Ca</sub> y estimulamos con ET-1. Los resultados muestran que la descarga de calcio hacia el citosol disminuye significativamente y que el incremento de calcio es más lento en presencia de IBTX (bloqueador selectivo de los BK<sub>Ca</sub>) en relación al pico de calcio en condiciones fisiológicas y en ausencia de calcio (Fig.16). Por tanto, sugerimos que en células trabeculares aisladas existe activación de canales BK<sub>Ca</sub> inducida por sustancias vasoconstrictoras (BK y ET-1) durante la movilización del calcio. Por otra parte, pensamos que el influjo de calcio extracelular podría estar incrementando la actividad de estos canales sensibles al calcio citosólico.

Así, la evolución diferenciada de la contracción en ausencia de calcio externo podría estar relacionada con la menor cantidad de Ca<sup>2+</sup> citosólico en comparación a los valores alcanzados en un medio fisiológico, por tanto, puede disminuir la activación de los canales BK<sub>Ca</sub> (hiperpolarización) y disminuir en consecuencia, su implicación en los mecanismos de relajación asociados.

La relación del calcio con la relajación de músculo liso es conocida, por ejemplo, en tejido arterial de aorta. La relajación dependiente de factores del endotelio (EDRF) tras un estímulo de contracción con acetilcolina, tiene dos fases de hiperpolarización asociadas, una fase transitoria que requiere de la descarga de calcio intracelular y otra fase sostenida, que requiere calcio extracelular (Chen and Suzuki, 1990).

En resumen, la presencia incrementada y sostenida de ET-1 en el humor acuoso en ojos de pacientes glaucomatosos sugiere su efecto nocivo en el funcionamiento de los tejidos que drenan el humor acuoso en su salida del ojo, especialmente sobre la malla trabecular. Hemos estudiado su efecto sobre el tejido, comprobando la disminución de la facilidad de evacuación y el efecto correlativo de contracción de la célula trabecular. La contracción celular inducida por endotelina y bradiquinina en células trabeculares dependen del incremento transitorio del Ca<sup>2+</sup> citosólico (vía IP<sub>3</sub>, depósitos de calcio intracelulares) y descartamos la necesidad del influjo de Ca<sup>2+</sup> extracelular (corrientes SOC y/o ROC) en el proceso de contracción inducido por receptor acoplado a proteína G<sub>q</sub> (bradiquinina, endotelina-1). No obstante, sugerimos que el influjo de Ca<sup>2+</sup> extracelular puede estar implicado en la activación de un sistema autoregulador de la contracción celular.



## **6. CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

Este trabajo ha demostrado y caracterizado las corrientes de entrada de calcio extracelular activadas por el vaciado de los depósitos intracelulares de calcio en células trabeculares tras estimulación con sustancias contráctiles. Del trabajo se concluyen los siguientes puntos:

1. Las sustancias vasoconstrictoras, BK y ET-1, activan una entrada de calcio extracelular dependiente del vaciado de los depósitos intracelulares de calcio en células trabeculares.
2. Las células trabeculares presentan corrientes de calcio activadas por el vaciado de los depósitos intracelulares de calcio tipo 'store-operated calcium currents' (SOCC) y 'receptor-operated calcium currents' (ROCC).
3. Las células trabeculares expresan las proteínas TRPC1 y TRPC4, candidatas a formar parte de los canales que median las corrientes SOCC y ROCC.
4. La contracción celular en las células trabeculares es independiente de la entrada de calcio extracelular. Por el contrario, se sugiere el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular sobre ciertas vías de relajación o regulación de la contracción inducida por agonista.



## **7. REFERENCIAS**



## 7. Referencias

1. Abramovitz, M., Y.Boie, T.Nguyen, T.H.Rushmore, M.A.Bayne, K.M.Metters, D.M.Slipetz, and R.Grygorczyk. 1994. Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid FP receptor. *J Biol Chem.* 269:2632-2636.
2. Akbari, Y., B.D.Hitt, M.P.Murphy, N.N.Dagher, B.P.Tseng, K.N.Green, T.E.Golde, and F.M.LaFerla. 2004. Presenilin regulates capacitative calcium entry dependently and independently of gamma-secretase activity. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 322:1145-1152.
3. Alcaraz, J., L.Buscemi, M.Grabulosa, X.Trepat, B.Fabry, R.Farre, and D.Navajas. 2003. Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophys. J* 84:2071-2079.
4. Alward, W.L., J.H.Fingert, M.A.Coote, A.T.Johnson, S.F.Lerner, D.Junqua, F.J.Durcan, P.J.McCartney, D.A.Mackey, V.C.Sheffield, and E.M.Stone. 1998. Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A). *N. Engl. J Med* 338:1022-1027.
5. An, S., J.Yang, M.Xia, and E.J.Goetzl. 1993. Cloning and expression of the EP2 subtype of human receptors for prostaglandin E2. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 197:263-270.
6. Andrea, J.E. and M.P.Walsh. 1992. Protein kinase C of smooth muscle. *Hypertension* 20:585-595.
7. Argent, B.E. and S.Arkle. 1985. Mechanism of action of extracellular calcium on isoprenaline-evoked amylase secretion from isolated rat parotid glands. *J Physiol* 369:337-353.
8. Artalejo, A.R., J.C.Ellory, and A.B.Parekh. 1998. Ca<sup>2+</sup>-dependent capacitance increases in rat basophilic leukemia cells following activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and dialysis with high-Ca<sup>2+</sup>-containing intracellular solution. *Pflugers Arch.* 436:934-939.
9. Avila, M.Y., R.A.Stone, and M.M.Civan. 2002. Knockout of A3 adenosine receptors reduces mouse intraocular pressure. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 43:3021-3026.
10. Bahler, C.K., M.P.Fautsch, C.R.Hann, and D.H.Johnson. 2004. Factors influencing intraocular pressure in cultured human anterior segments. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 45:3137-3143.

11. Bakowski, D. and A.B.Parekh. 2002. Monovalent cation permeability and Ca(2+) block of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC )in rat basophilic leukemia cells. *Pflugers Arch.* 443:892-902.
12. BARANY, E.H. and J.W.Rohen. 1963. Glaucoma in monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Arch. Ophthalmol.* 69:630-641.
13. Barequet, I.S., Q.Li, Y.Wang, T.P.O'Brien, J.J.Hooks, and W.J.Stark. 2000. Herpes simplex virus DNA identification from aqueous fluid in Fuchs heterochromic iridocyclitis. *Am J Ophthalmol.* 129:672-673.
14. Becker, B. 1954. Decrease in intraocular pressure in man by a carbonic anhydrase inhibitor, diamox; a preliminary report. *Am J Ophthalmol.* 37:13-15.
15. Berridge, M. 2004. Conformational coupling: a physiological calcium entry mechanism. *Sci STKE.* 2004:e33.
16. Berridge, M.J. 1995. Capacitative calcium entry. *Biochem. J* 312 ( Pt 1):1-11.
17. Berridge, M.J. 2005. Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu. Rev Physiol* 67:1-21.
18. Berridge, M.J., M.D.Bootman, and P.Lipp. 1998. Calcium--a life and death signal. *Nature* 395:645-648.
19. Berridge, M.J., M.D.Bootman, and H.L.Roderick. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev Mol Cell Biol* 4:517-529.
20. Berridge, M.J., P.Lipp, and M.D.Bootman. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev Mol Cell Biol* 1:11-21.
21. Berry, V., P.Francis, S.Kaushal, A.Moore, and S.Bhattacharya. 2000. Missense mutations in MIP underlie autosomal dominant 'polymorphic' and lamellar cataracts linked to 12q. *Nat. Genet.* 25:15-17.
22. Bhattacharya, S.K., E.J.Rockwood, S.D.Smith, V.L.Bonilha, J.S.Crabb, R.W.Kuchtey, N.G.Robertson, N.S.Peachey, C.C.Morton, and J.W.Crabb. 2005. Proteomics reveal Cochlin deposits associated with glaucomatous trabecular meshwork. *J Biol Chem.* 280:6080-6084.

23. Bird, G.S., O.Aziz, J.P.Lievremont, B.J.Wedel, M.Trebak, G.Vazquez, and J.W.Putney, Jr. 2004. Mechanisms of phospholipase C-regulated calcium entry. *Curr Mol Med* 4:291-301.
24. Bird, G.S. and J.W.Putney, Jr. 2005. Capacitative calcium entry supports calcium oscillations in human embryonic kidney cells. *J Physiol* 562:697-706.
25. Birnbaumer, L., X.Zhu, M.Jiang, G.Boulay, M.Peyton, B.Vannier, D.Brown, D.Platano, H.Sadeghi, E.Stefani, and M.Birnbaumer. 1996. On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 93:15195-15202.
26. Blaustein, M.P. and V.A.Golovina. 2001. Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum Ca(2+) stores. *Trends Neurosci.* 24:602-608.
27. Borrás, T., B.T.Gabelt, G.K.Klintworth, J.C.Peterson, and P.L.Kaufman. 2001. Non-invasive observation of repeated adenoviral GFP gene delivery to the anterior segment of the monkey eye in vivo. *J Gene Med* 3:437-449.
28. Braun, F.J., O.Aziz, and J.W.Putney, Jr. 2003a. 2-aminoethoxydiphenyl borane activates a novel calcium-permeable cation channel. *Mol Pharmacol.* 63:1304-1311.
29. Braun, F.J., O.Aziz, and J.W.Putney, Jr. 2003b. 2-aminoethoxydiphenyl borane activates a novel calcium-permeable cation channel. *Mol Pharmacol.* 63:1304-1311.
30. Broad, L.M., T.R.Cannon, and C.W.Taylor. 1999. A non-capacitative pathway activated by arachidonic acid is the major Ca<sup>2+</sup> entry mechanism in rat A7r5 smooth muscle cells stimulated with low concentrations of vasopressin. *J Physiol* 517 ( Pt 1):121-134.
31. Buller, C., D.H.Johnson, and R.C.Tschumper. 1990. Human trabecular meshwork phagocytosis. Observations in an organ culture system. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 31:2156-2163.
32. Butler, J.P., I.M.Tolic-Norrelykke, B.Fabry, and J.J.Fredberg. 2002. Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C595-C605.

33. Cahalan, M.D., S.L.Zhang, A.V.Yeromin, K.Ohlsen, J.Roos, and K.A.Stauderman. 2007. Molecular basis of the CRAC channel. *Cell Calcium* 42:133-144.
34. Cannell, M.B. and S.O.Sage. 1989. Bradykinin-evoked changes in cytosolic calcium and membrane currents in cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Physiol* 419:555-568.
35. Carafoli, E. 2004. Calcium-mediated cellular signals: a story of failures. *Trends Biochem. Sci* 29:371-379.
36. Carlsson, L., L.E.Nystrom, I.Sundkvist, F.Markey, and U.Lindberg. 1977. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol* 115:465-483.
37. Chakrabarti, R., J.Y.Chang, and K.L.Erickson. 1995. T cell receptor-mediated  $Ca^{2+}$  signaling: release and influx are independent events linked to different  $Ca^{2+}$  entry pathways in the plasma membrane. *J Cell Biochem.* 58:344-359.
38. Chalmers, M., M.J.Schell, and P.Thorn. 2006. Agonist-evoked inositol trisphosphate receptor (IP<sub>3</sub>R) clustering is not dependent on changes in the structure of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J* 394:57-66.
39. Chang, W.C., C.Nelson, and A.B.Parekh. 2006.  $Ca^{2+}$  influx through CRAC channels activates cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, leukotriene C<sub>4</sub> secretion, and expression of c-fos through ERK-dependent and -independent pathways in mast cells. *FASEB J* 20:2381-2383.
40. Chen, G.F. and H.Suzuki. 1990. Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery. *J Physiol* 421:521-534.
41. Chetham, P.M., P.Babal, J.P.Bridges, T.M.Moore, and T.Stevens. 1999. Segmental regulation of pulmonary vascular permeability by store-operated  $Ca^{2+}$  entry. *Am J Physiol* 276:L41-L50.
42. Choritz, L., R.Rosenthal, M.Fromm, M.H.Foerster, and H.Thieme. 2005. Pharmacological and functional characterization of endothelin receptors in bovine trabecular meshwork and ciliary muscle. *Ophthalmic Res* 37:179-187.
43. Chu, T.C., C.Keith, and K.Green. 1992. Intracellular pH regulation by a  $Na^{+}/H^{+}$  exchanger in cultured bovine trabecular cells. *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 70:772-779.

44. Clapham, D.E., L.W.Runnels, and C.Strubing. 2001. The TRP ion channel family. *Nat. Rev Neurosci.* 2:387-396.
45. Clark, A.F., D.Brotchie, A.T.Read, P.Hellberg, S.English-Wright, I.H.Pang, C.R.Ethier, and I.Grierson. 2005. Dexamethasone alters F-actin architecture and promotes cross-linked actin network formation in human trabecular meshwork tissue. *Cell Motil. Cytoskeleton* 60:83-95.
46. Clozel, M. and G.A.Gray. 1995. Are there different ETB receptors mediating constriction and relaxation? *J Cardiovasc Pharmacol.* 26 Suppl 3:S262-S264.
47. Cobbs, W.H., A.E.Barkdoll, III, and E.N.Pugh, Jr. 1985. Cyclic GMP increases photocurrent and light sensitivity of retinal cones. *Nature* 317:64-66.
48. Colden-Stanfield, M., W.P.Schilling, A.K.Ritchie, S.G.Eskin, L.T.Navarro, and D.L.Kunze. 1987. Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res* 61:632-640.
49. Colton, C.K. and M.X.Zhu. 2007. 2-Aminoethoxydiphenyl borate as a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 channels. *Handb. Exp. Pharmacol.*173-187.
50. Comes, N., E.Abad, M.Morales, T.Borras, A.Gual, and X.Gasull. 2006. Identification and functional characterization of ClC-2 chloride channels in trabecular meshwork cells. *Exp. Eye Res* 83:877-889.
51. Comes, N., X.Gasull, A.Gual, and T.Borras. 2005. Differential expression of the human chloride channel genes in the trabecular meshwork under stress conditions. *Exp. Eye Res* 80:801-813.
52. Conners, W., C.Whitebeck, P.Chicester, R.Legget, A.D.Lin, A.Johnson, B.Kogan, R.Levin, and A.Mannikarottu. 2006. L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes oxidative damage in urinary bladder partial outlet obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F357-F363.
53. Cooper, D.M., J.W.Karpen, K.A.Fagan, and N.E.Mons. 1998. Ca(2+)-sensitive adenylyl cyclases. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res* 32:23-51.

54. Coroneo, M.T., C.Korbmacher, C.Flugel, B.Stiemer, E.Lutjen-Drecoll, and M.Wiederholt. 1991. Electrical and morphological evidence for heterogeneous populations of cultured bovine trabecular meshwork cells. *Exp. Eye Res* 52:375-388.
55. Crosson, C.E. 2001. Intraocular pressure responses to the adenosine agonist cyclohexyladenosine: evidence for a dual mechanism of action. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 42:1837-1840.
56. Crosson, C.E., P.W.Yates, A.N.Bhat, Y.V.Mukhin, and S.Husain. 2004. Evidence for multiple P2Y receptors in trabecular meshwork cells. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 309:484-489.
57. Csordas, G., A.P.Thomas, and G.Hajnoczky. 1999. Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J* 18:96-108.
58. Csutora, P., Z.Su, H.Y.Kim, A.Bugrim, K.W.Cunningham, R.Nuccitelli, J.E.Keizer, M.R.Hanley, J.E.Blalock, and R.B.Marchase. 1999. Calcium influx factor is synthesized by yeast and mammalian cells depleted of organellar calcium stores. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 96:121-126.
59. Cuppoletti, J., K.P.Tewari, A.M.Sherry, C.J.Ferrante, and D.H.Malinowska. 2004. Sites of protein kinase A activation of the human ClC-2 Cl(-) channel. *J Biol Chem.* 279:21849-21856.
60. Davenport, A.P. and B.Battistini. 2002. Classification of endothelin receptors and antagonists in clinical development. *Clin Sci (Lond)* 103 Suppl 48:1S-3S.
61. Davis, M.C., K.S.McColl, F.Zhong, Z.Wang, M.H.Malone, and C.W.Distelhorst. 2008. Dexamethasone-induced inositol 1,4,5-trisphosphate receptor elevation in murine lymphoma cells is not required for dexamethasone-mediated calcium elevation and apoptosis. *J Biol Chem.* 283:10357-10365.
62. de Kater, A.W., A.Shahsafaee, and D.L.Epstein. 1992. Localization of smooth muscle and nonmuscle actin isoforms in the human aqueous outflow pathway. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 33:424-429.
63. de Kater, A.W., S.J.Spurr-Michaud, and I.K.Gipson. 1990. Localization of smooth muscle myosin-containing cells in the aqueous outflow pathway. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 31:347-353.

64. De La Paz, M.A. and D.L.Epstein. 1996. Effect of age on superoxide dismutase activity of human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 37:1849-1853.
65. Dellis, O., S.G.Dedos, S.C.Tovey, U.R.Taufiq, S.J.Dubel, and C.W.Taylor. 2006. Ca<sup>2+</sup> entry through plasma membrane IP<sub>3</sub> receptors. *Science* 313:229-233.
66. den Dekker, E., J.G.Hoenderop, B.Nilius, and R.J.Bindels. 2003. The epithelial calcium channels, TRPV<sub>5</sub> & TRPV<sub>6</sub>: from identification towards regulation. *Cell Calcium* 33:497-507.
67. Deng, J.T., J.E.Van Lierop, C.Sutherland, and M.P.Walsh. 2001. Ca<sup>2+</sup>-independent smooth muscle contraction. a novel function for integrin-linked kinase. *J Biol Chem.* 276:16365-16373.
68. Dietlein, T.S., P.C.Jacobi, C.Luke, and G.K.Krieglstein. 2000. Morphological variability of the trabecular meshwork in glaucoma patients: implications for non-perforating glaucoma surgery. *Br. J Ophthalmol.* 84:1354-1359.
69. Dietrich, A., H.Kalwa, B.R.Rost, and T.Gudermann. 2005. The diacylglycerol-sensitive TRPC<sub>3/6/7</sub> subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance. *Pflugers Arch.* 451:72-80.
70. Dijkstra, B.G., A.Schneemann, and P.F.Hoyng. 1999. Flow after prostaglandin E<sub>1</sub> is mediated by receptor-coupled adenylyl cyclase in human anterior segments. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 40:2622-2626.
71. Dismuke, W.M., C.C.Mbadugha, and D.Z.Ellis. 2008. NO-induced regulation of human trabecular meshwork cell volume and aqueous humor outflow facility involve the BKCa ion channel. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C1378-C1386.
72. Diver, J.M., S.O.Sage, and J.A.Rosado. 2001. The inositol trisphosphate receptor antagonist 2-aminoethoxydiphenylborate (2-APB) blocks Ca<sup>2+</sup> entry channels in human platelets: cautions for its use in studying Ca<sup>2+</sup> influx. *Cell Calcium* 30:323-329.
73. Dlugosz, J.A., S.Munk, X.Zhou, and C.I.Whiteside. 1998. Endothelin-1-induced mesangial cell contraction involves activation of protein kinase C- $\alpha$ , - $\delta$ , and - $\epsilon$ . *Am J Physiol* 275:F423-F432.

74. Domeier, T.L., A.V.Zima, J.T.Maxwell, S.Huke, G.A.Mignery, and L.A.Blatter. 2008. IP<sub>3</sub> receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> release modulates excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H596-H604.
75. Dudek, S.M. and J.G.Garcia. 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol* 91:1487-1500.
76. Edwards, R.M., W.Trizna, and E.H.Ohlstein. 1990. Renal microvascular effects of endothelin. *Am J Physiol* 259:F217-F221.
77. Emptage, N.J., C.A.Reid, and A.Fine. 2001. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron* 29:197-208.
78. Enfissi, A., S.Prigent, P.Colosetti, and T.Capiod. 2004. The blocking of capacitative calcium entry by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells. *Cell Calcium* 36:459-467.
79. England, S., F.Heblich, I.F.James, J.Robbins, and R.J.Docherty. 2001. Bradykinin evokes a Ca<sup>2+</sup>-activated chloride current in non-neuronal cells isolated from neonatal rat dorsal root ganglia. *J Physiol* 530:395-403.
80. Erickson-Lamy, K., C.Korbmacher, J.S.Schuman, and J.A.Nathanson. 1991. Effect of endothelin on outflow facility and accommodation in the monkey eye in vivo. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 32:492-495.
81. Erickson-Lamy, K., J.W.Rohen, and W.M.Grant. 1988. Outflow facility studies in the perfused bovine aqueous outflow pathways. *Curr Eye Res* 7:799-807.
82. Erickson-Lamy, K.A. and J.A.Nathanson. 1992. Epinephrine increases facility of outflow and cyclic AMP content in the human eye in vitro. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 33:2672-2678.
83. Ethier, C.R., A.T.Read, and D.Chan. 2004. Biomechanics of Schlemm's canal endothelial cells: influence on F-actin architecture. *Biophys. J* 87:2828-2837.
84. Falke, L.C., K.D.Gillis, D.M.Pressel, and S.Misler. 1989. 'Perforated patch recording' allows long-term monitoring of metabolite-induced electrical

- activity and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents in pancreatic islet B cells. *FEBS Lett.* 251:167-172.
85. Fan, B.J., D.Y.Wang, D.S.Lam, and C.P.Pang. 2006. Gene mapping for primary open angle glaucoma. *Clin Biochem.* 39:249-258.
  86. Fantozzi, I., S.Zhang, O.Platoshyn, C.V.Remillard, R.T.Cowling, and J.X.Yuan. 2003. Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in human pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L1233-L1245.
  87. Fautsch, M.P. and D.H.Johnson. 2006. Aqueous humor outflow: what do we know? Where will it lead us? *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 47:4181-4187.
  88. Fernandez-Durango, R., R.Rollin, A.Mediero, M.Roldan-Pallares, F.J.Garcia, S.J.Garcia, A.Fernandez-Cruz, and A.Ripodas. 2003. Localization of endothelin-1 mRNA expression and immunoreactivity in the anterior segment of human eye: expression of ETA and ETB receptors. *Mol Vis.* 9:103-109.
  89. Fernando, K.C. and G.J.Barritt. 1994. Characterisation of the inhibition of the hepatocyte receptor-activated Ca<sup>2+</sup> inflow system by gadolinium and SK&F 96365. *Biochim. Biophys. Acta* 1222:383-389.
  90. Feske, S., Y.Gwack, M.Prakriya, S.Srikanth, S.H.Puppel, B.Tanasa, P.G.Hogan, R.S.Lewis, M.Daly, and A.Rao. 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441:179-185.
  91. Filippin, L., P.J.Magalhaes, G.Di Benedetto, M.Colella, and T.Pozzan. 2003. Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria. *J Biol Chem.* 278:39224-39234.
  92. Fleischhauer, J.C., C.H.Mitchell, W.D.Stamer, M.O.Karl, K.Peterson-Yantorno, and M.M.Civan. 2003. Common actions of adenosine receptor agonists in modulating human trabecular meshwork cell transport. *J Membr. Biol* 193:121-136.
  93. Flemming, R., A.Cheong, A.M.Dedman, and D.J.Beech. 2002. Discrete store-operated calcium influx into an intracellular compartment in rabbit arteriolar smooth muscle. *J Physiol* 543:455-464.

94. Flugel, C., E.Tamm, and E.Lutjen-Drecoll. 1991. Different cell populations in bovine trabecular meshwork: an ultrastructural and immunocytochemical study. *Exp. Eye Res* 52:681-690.
95. Freichel, M., R.Vennekens, J.Olausson, M.Hoffmann, C.Muller, S.Stolz, J.Scheunemann, P.Weissgerber, and V.Flockerzi. 2004. Functional role of TRPC proteins in vivo: lessons from TRPC-deficient mouse models. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 322:1352-1358.
96. Frieden, M., M.Sollini, and J.Beny. 1999. Substance P and bradykinin activate different types of KCa currents to hyperpolarize cultured porcine coronary artery endothelial cells. *J Physiol* 519 Pt 2:361-371.
97. FRIEDENWALD, J.S. 1955. Carbonic anhydrase inhibition and aqueous flow. *Am J Ophthalmol.* 39:59-64.
98. Friel, D.D. and H.J.Chiel. 2008. Calcium dynamics: analyzing the Ca<sup>2+</sup> regulatory network in intact cells. *Trends Neurosci.* 31:8-19.
99. Fritsch, J. and A.Edelman. 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.
100. Funayama, T., Y.Mashima, Y.Ohtake, K.Ishikawa, N.Fuse, N.Yasuda, T.Fukuchi, A.Murakami, Y.Hotta, and N.Shimada. 2006. SNPs and interaction analyses of noelin 2, myocilin, and optineurin genes in Japanese patients with open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 47:5368-5375.
101. Funk, R., J.W.Rohen, and K.Skolasinska. 1985. Intraocular pressure and systemic blood pressure after administration of vasoactive substances in hypertensive and normal rats. *Graefes Arch. Clin Exp. Ophthalmol.* 223:145-149.
102. Gabelt, B.T., J.Gottanka, E.Lutjen-Drecoll, and P.L.Kaufman. 2003. Aqueous humor dynamics and trabecular meshwork and anterior ciliary muscle morphologic changes with age in rhesus monkeys. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 44:2118-2125.
103. Gabelt, B.T. and P.L.Kaufman. 1989. Prostaglandin F<sub>2</sub> alpha increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey. *Exp. Eye Res* 49:389-402.

104. Gabelt, B.T. and P.L.Kaufman. 2005. Changes in aqueous humor dynamics with age and glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res* 24:612-637.
105. Garcia, J.G., H.W.Davis, and C.E.Patterson. 1995. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol* 163:510-522.
106. Gasull, X., E.Ferrer, A.Llobet, A.Castellano, J.M.Nicolas, J.Pales, and A.Gual. 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.
107. Gaudet, C., W.A.Marganski, S.Kim, C.T.Brown, V.Gunderia, M.Dembo, and J.Y.Wong. 2003. Influence of type I collagen surface density on fibroblast spreading, motility, and contractility. *Biophys. J* 85:3329-3335.
108. Gavara, N., R.Sunyer, P.Roca-Cusachs, R.Farre, M.Rotger, and D.Navajas. 2006. Thrombin-induced contraction in alveolar epithelial cells probed by traction microscopy. *J Appl Physiol* 101:512-520.
109. Gelatt, K.N., D.E.Brooks, and D.A.Samuels. 1998. Comparative glaucomatology. I: The spontaneous glaucomas. *J Glaucoma*. 7:187-201.
110. Gilabert, R., X.Gasull, J.Pales, C.Belmonte, M.V.Bergamini, and A.Gual. 1997. Facility changes mediated by cAMP in the bovine anterior segment in vitro. *Vision Res* 37:9-15.
111. Gill, D.L., R.T.Waldron, K.E.Rys-Sikora, C.A.Ufret-Vincenty, M.N.Graber, C.J.Favre, and A.Alfonso. 1996. Calcium pools, calcium entry, and cell growth. *Biosci. Rep.* 16:139-157.
112. Gills, J.P., B.C.Roberts, and D.L.Epstein. 1998. Microtubule disruption leads to cellular contraction in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 39:653-658.
113. Gohla, A., G.Schultz, and S.Offermanns. 2000. Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res* 87:221-227.
114. Golovina, V.A., O.Platoshyn, C.L.Bailey, J.Wang, A.Limsuwan, M.Sweeney, L.J.Rubin, and J.X.Yuan. 2001. Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca(2+) entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H746-H755.

115. Gomez-Cabrero, A., N.Comes, J.Gonzalez-Linares, J.de Lapuente, M.Borras, J.Pales, A.Gual, X.Gasull, and M.Morales. 2005. Use of transduction proteins to target trabecular meshwork cells: outflow modulation by profilin I. *Mol Vis.* 11:1071-1082.
116. Gong, H., J.Ruberti, D.Overby, M.Johnson, and T.F.Freddo. 2002. A new view of the human trabecular meshwork using quick-freeze, deep-etch electron microscopy. *Exp. Eye Res* 75:347-358.
117. Gottanka, J., D.Chan, M.Eichhorn, E.Lutjen-Drecoll, and C.R.Ethier. 2004. Effects of TGF-beta2 in perfused human eyes. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 45:153-158.
118. Grierson, I. and R.C.Howes. 1987. Age-related depletion of the cell population in the human trabecular meshwork. *Eye* 1 ( Pt 2):204-210.
119. Grierson, I., R.C.Howes, and Q.Wang. 1984. Age-related changes in the canal of Schlemm. *Exp. Eye Res* 39:505-512.
120. Grierson, I. and A.H.Rahi. 1979. Microfilaments in the cells of the human trabecular meshwork. *Br. J Ophthalmol.* 63:3-8.
121. Grosheva, I., J.L.Vittitow, P.Goichberg, B.T.Gabelt, P.L.Kaufman, T.Borras, B.Geiger, and A.D.Bershadsky. 2006. Caldesmon effects on the actin cytoskeleton and cell adhesion in cultured HTM cells. *Exp. Eye Res* 82:945-958.
122. Gual, A., A.Llobet, R.Gilabert, M.Borras, J.Pales, M.V.Bergamini, and C.Belmonte. 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.
123. Guibert, C., T.Ducret, and J.P.Savineau. 2008. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog. Biophys. Mol Biol* 98:10-23.
124. Hallam, T.J., R.Jacob, and J.E.Merritt. 1989. Influx of bivalent cations can be independent of receptor stimulation in human endothelial cells. *Biochem. J* 259:125-129.
125. Hamill, O.P., A.Marty, E.Neher, B.Sakmann, and F.J.Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.

126. Haque, M.S., I.H.Pang, P.E.Magnino, and L.DeSantis. 1998. Activation of phospholipase C and guanylyl cyclase by endothelins in human trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res* 17:1110-1117.
127. Hardie, R.C. and B.Minke. 1992. The trp gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron* 8:643-651.
128. Harnick, D.J., T.Jayaraman, Y.Ma, P.Mulieri, L.O.Go, and A.R.Marks. 1995. The human type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from T lymphocytes. Structure, localization, and tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 270:2833-2840.
129. Harper, J.L. and J.W.Daly. 2000. Effect of calmidazolium analogs on calcium influx in HL-60 cells. *Biochem. Pharmacol.* 60:317-324.
130. Harper, J.L., Y.Shin, and J.W.Daly. 1997. Loperamide: a positive modulator for store-operated calcium channels? *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 94:14912-14917.
131. Hassel, B., D.A.Samuelson, P.A.Lewis, and K.N.Gelatt. 2007. Immunocytochemical localization of smooth muscle actin-containing cells in the trabecular meshwork of glaucomatous and nonglaucomatous dogs. *Vet. Ophthalmol.* 10 Suppl 1:38-45.
132. Hermosura, M.C., M.K.Monteilh-Zoller, A.M.Scharenberg, R.Penner, and A.Fleig. 2002. Dissociation of the store-operated calcium current I(CRAC) and the Mg-nucleotide-regulated metal ion current MagNum. *J Physiol* 539:445-458.
133. Hewavitharana, T., X.Deng, J.Soboloff, and D.L.Gill. 2007. Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium* 42:173-182.
134. Hill, M.A., H.Zou, S.J.Potocnik, G.A.Meininger, and M.J.Davis. 2001. Invited review: arteriolar smooth muscle mechanotransduction: Ca(2+) signaling pathways underlying myogenic reactivity. *J Appl Physiol* 91:973-983.
135. Hirano, K., D.N.Derkach, M.Hirano, J.Nishimura, and H.Kanaide. 2003. Protein kinase network in the regulation of phosphorylation and dephosphorylation of smooth muscle myosin light chain. *Mol Cell Biochem.* 248:105-114.

136. Hirata, Y., T.Emori, S.Eguchi, K.Kanno, T.Imai, K.Ohta, and F.Marumo. 1993. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 91:1367-1373.
137. Hofmann, T., A.G.Obukhov, M.Schaefer, C.Harteneck, T.Gudermann, and G.Schultz. 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397:259-263.
138. Hogan, P.G. and A.Rao. 2007. Dissecting ICRAC, a store-operated calcium current. *Trends Biochem. Sci* 32:235-245.
139. Hollopeter, G., H.M.Jantzen, D.Vincent, G.Li, L.England, V.Ramakrishnan, R.B.Yang, P.Nurden, A.Nurden, D.Julius, and P.B.Conley. 2001. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409:202-207.
140. Hopf, F.W., P.Reddy, J.Hong, and R.A.Steinhardt. 1996. A capacitative calcium current in cultured skeletal muscle cells is mediated by the calcium-specific leak channel and inhibited by dihydropyridine compounds. *J Biol Chem.* 271:22358-22367.
141. Hoth, M. and R.Penner. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355:353-356.
142. Igie, R. 1985. Kallikrein and kininases in ocular tissues. *Exp. Eye Res* 41:117-120.
143. Ishida, N., N.Odani-Kawabata, A.Shimazaki, and H.Hara. 2006. Prostanoids in the therapy of glaucoma. *Cardiovasc Drug Rev* 24:1-10.
144. Jaconi, M., C.Bony, S.M.Richards, A.Terzic, S.Arnaudeau, G.Vassort, and M.Puceat. 2000. Inositol 1,4,5-trisphosphate directs Ca(2+) flow between mitochondria and the Endoplasmic/Sarcoplasmic reticulum: a role in regulating cardiac autonomic Ca(2+) spiking. *Mol Biol Cell* 11:1845-1858.
145. Jaconi, M., J.Pyle, R.Bortolon, J.Ou, and D.Clapham. 1997. Calcium release and influx colocalize to the endoplasmic reticulum. *Curr Biol* 7:599-602.
146. Jarvinen, T., D.W.Pate, and K.Laine. 2002. Cannabinoids in the treatment of glaucoma. *Pharmacol. Ther.* 95:203-220.

147. Jentsch, T.J., T.Maritzen, and A.A.Zdebik. 2005. Chloride channel diseases resulting from impaired transepithelial transport or vesicular function. *J Clin Invest* 115:2039-2046.
148. John, S.W., R.S.Smith, O.V.Savinova, N.L.Hawes, B.Chang, D.Turnbull, M.Davisson, T.H.Roderick, and J.R.Heckenlively. 1998. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 39:951-962.
149. Johnson, D.H., T.M.Richardson, and D.L.Epstein. 1989. Trabecular meshwork recovery after phagocytic challenge. *Curr Eye Res* 8:1121-1130.
150. Johnson, M. 2006. 'What controls aqueous humour outflow resistance?'. *Exp. Eye Res* 82:545-557.
151. Johnson, M., A.Shapiro, C.R.Ethier, and R.D.Kamm. 1992. Modulation of outflow resistance by the pores of the inner wall endothelium. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 33:1670-1675.
152. Kamm, K.E. and J.T.Stull. 1986. Activation of smooth muscle contraction: relation between myosin phosphorylation and stiffness. *Science* 232:80-82.
153. Karl, M.O., K.Peterson-Yantorno, and M.M.Civan. 2007. Cell-specific differential modulation of human trabecular meshwork cells by selective adenosine receptor agonists. *Exp. Eye Res* 84:126-134.
154. Kaufman, P.L., A.Bill, and E.H.BARANY. 1977. Effect of cytochalasin B on conventional drainage of aqueous humor in the cynomolgus monkey. *Exp. Eye Res* 25 Suppl:411-414.
155. Kee, C., P.L.Kaufman, and B.T.Gabelt. 1994. Effect of 8-Br cGMP on aqueous humor dynamics in monkeys. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 35:2769-2773.
156. Kelly, R.A., H.Eid, B.K.Kramer, M.O'Neill, B.T.Liang, M.Reers, and T.W.Smith. 1990. Endothelin enhances the contractile responsiveness of adult rat ventricular myocytes to calcium by a pertussis toxin-sensitive pathway. *J Clin Invest* 86:1164-1171.
157. Kerschbaum, H.H. and M.D.Cahalan. 1998. Monovalent permeability, rectification, and ionic block of store-operated calcium channels in Jurkat T lymphocytes. *J Gen. Physiol* 111:521-537.

158. Khan, A.A., M.J.Soloski, A.H.Sharp, G.Schilling, D.M.Sabatini, S.H.Li, C.A.Ross, and S.H.Snyder. 1996. Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Science* 273:503-507.
159. Kimura, A., M.Ohmichi, T.Takeda, H.Kurachi, H.Ikegami, K.Koike, K.Masuhara, J.Hayakawa, T.Kanzaki, M.Kobayashi, M.Akabane, M.Inoue, A.Miyake, and Y.Murata. 1999. Mitogen-activated protein kinase cascade is involved in endothelin-1-induced rat puerperal uterine contraction. *Endocrinology* 140:722-731.
160. Kiselyov, K., X.Xu, G.Mozhayeva, T.Kuo, I.Pessah, G.Mignery, X.Zhu, L.Birnbaumer, and S.Muallem. 1998b. Functional interaction between InsP<sub>3</sub> receptors and store-operated Htrp<sub>3</sub> channels. *Nature* 396:478-482.
161. Kiselyov, K., X.Xu, G.Mozhayeva, T.Kuo, I.Pessah, G.Mignery, X.Zhu, L.Birnbaumer, and S.Muallem. 1998a. Functional interaction between InsP<sub>3</sub> receptors and store-operated Htrp<sub>3</sub> channels. *Nature* 396:478-482.
162. Kojima, I., N.Kawamura, and H.Shibata. 1994. Rate of calcium entry determines the rapid changes in protein kinase C activity in angiotensin II-stimulated adrenal glomerulosa cells. *Biochem. J* 297 ( Pt 3):523-528.
163. Koliakos, G.G., A.G.Konstas, U.Schlotzer-Schrehardt, G.Hollo, D.Mitova, D.Kovatchev, S.Maloutas, and N.Georgiadis. 2004. Endothelin-1 concentration is increased in the aqueous humour of patients with exfoliation syndrome. *Br. J Ophthalmol.* 88:523-527.
164. Kolodney, M.S., M.S.Thimgan, H.M.Honda, G.Tsai, and H.F.Yee, Jr. 1999. Ca<sup>2+</sup>-independent myosin II phosphorylation and contraction in chicken embryo fibroblasts. *J Physiol* 515 ( Pt 1):87-92.
165. Krause, E., F.Pfeiffer, A.Schmid, and I.Schulz. 1996. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium conducting nonselective cation current in mouse pancreatic acinar cells. *J Biol Chem.* 271:32523-32528.
166. Kumar, A. and Z.H.Song. 2006. CB<sub>1</sub> cannabinoid receptor-mediated changes of trabecular meshwork cellular properties. *Mol Vis.* 12:290-297.
167. Kurebayashi, N. and Y.Ogawa. 2001. Depletion of Ca<sup>2+</sup> in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca<sup>2+</sup> entry into mouse skeletal muscle fibres. *J Physiol* 533:185-199.

168. Kwan, C.Y., H.Takemura, J.F.Obie, O.Thastrup, and J.W.Putney, Jr. 1990. Effects of MeCh, thapsigargin, and La<sup>3+</sup> on plasmalemmal and intracellular Ca<sup>2+</sup> transport in lacrimal acinar cells. *Am J Physiol* 258:C1006-C1015.
169. Labelle, D., C.Jumarie, and R.Moreau. 2007. Capacitative calcium entry and proliferation of human osteoblast-like MG-63 cells. *Cell Prolif.* 40:866-884.
170. Lee, D.A. and E.J.Higginbotham. 2005. Glaucoma and its treatment: a review. *Am J Health Syst. Pharm.* 62:691-699.
171. Lee, M.W. and D.L.Severson. 1994. Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action. *Am J Physiol* 267:C659-C678.
172. Lee, P.Y., S.M.Podos, and C.Severin. 1984. Effect of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha on aqueous humor dynamics of rabbit, cat, and monkey. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 25:1087-1093.
173. Lencesova, L., K.Ondrias, L.Micutkova, M.Filipenko, R.Kvetnansky, and O.Krizanova. 2002. Immobilization stress elevates IP(3) receptor mRNA in adult rat hearts in a glucocorticoid-dependent manner. *FEBS Lett.* 531:432-436.
174. Lepple-Wienhues, A., F.Stahl, U.Willner, R.Schafer, and M.Wiederholt. 1991. Endothelin-evoked contractions in bovine ciliary muscle and trabecular meshwork: interaction with calcium, nifedipine and nickel. *Curr Eye Res* 10:983-989.
175. Leung, Y.F., P.O.Tam, W.S.Lee, D.S.Lam, H.F.Yam, B.J.Fan, C.C.Tham, J.K.Chua, and C.P.Pang. 2003. The dual role of dexamethasone on anti-inflammation and outflow resistance demonstrated in cultured human trabecular meshwork cells. *Mol Vis.* 9:425-439.
176. Lewis, R.S. 2001. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu. Rev Immunol.* 19:497-521.
177. Lewis, R.S. and M.D.Cahalan. 1989. Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and transmembrane Ca<sup>2+</sup> current in human leukemic T cells. *Cell Regul.* 1:99-112.
178. Li, M., J.Jiang, and L.Yue. 2006. Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7. *J Gen. Physiol* 127:525-537.

179. Lievremont, J.P., G.S.Bird, and J.W.Putney, Jr. 2005. Mechanism of inhibition of TRPC cation channels by 2-aminoethoxydiphenylborane. *Mol Pharmacol.* 68:758-762.
180. Lin, S., K.A.Fagan, K.X.Li, P.W.Shaul, D.M.Cooper, and D.M.Rodman. 2000. Sustained endothelial nitric-oxide synthase activation requires capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *J Biol Chem.* 275:17979-17985.
181. Liou, J., M.L.Kim, W.D.Heo, J.T.Jones, J.W.Myers, J.E.Ferrell, Jr., and T.Meyer. 2005. STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Curr Biol* 15:1235-1241.
182. Liu, B., A.M.Freyer, and I.P.Hall. 2007. Bradykinin activates calcium-dependent potassium channels in cultured human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L898-L907.
183. Livneh, E. and D.D.Fishman. 1997. Linking protein kinase C to cell-cycle control. *Eur. J Biochem.* 248:1-9.
184. Llobet, A., X.Gasull, and A.Gual. 2003. Understanding trabecular meshwork physiology: a key to the control of intraocular pressure? *News Physiol Sci* 18:205-209.
185. Llobet, A., X.Gasull, J.Pales, E.Marti, and A.Gual. 2001. Identification of Kir2.1 channel activity in cultured trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 42:2371-2379.
186. Llobet, A., A.Gual, J.Pales, R.Barraquer, E.Tobias, and J.M.Nicolas. 1999a. 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.
187. Llobet, A., A.Gual, J.Pales, R.Barraquer, E.Tobias, and J.M.Nicolas. 1999b. 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.
188. Llopis, J., S.B.Chow, G.E.Kass, A.Gahm, and S.Orrenius. 1991. Comparison between the effects of the microsomal Ca(2+)-translocase inhibitors thapsigargin and 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone on cellular calcium fluxes. *Biochem. J* 277 ( Pt 2):553-556.

189. Lockwich, T., B.B.Singh, X.Liu, and I.S.Ambudkar. 2001. Stabilization of cortical actin induces internalization of transient receptor potential 3 (Trp3)-associated caveolar Ca<sup>2+</sup> signaling complex and loss of Ca<sup>2+</sup> influx without disruption of Trp3-inositol trisphosphate receptor association. *J Biol Chem.* 276:42401-42408.
190. Lu, Z., D.R.Overby, P.A.Scott, T.F.Freddo, and H.Gong. 2008. The mechanism of increasing outflow facility by rho-kinase inhibition with Y-27632 in bovine eyes. *Exp. Eye Res* 86:271-281.
191. Luik, R.M., M.M.Wu, J.Buchanan, and R.S.Lewis. 2006. The elementary unit of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol* 174:815-825.
192. Luo, D., L.M.Broad, G.S.Bird, and J.W.Putney, Jr. 2001. Mutual antagonism of calcium entry by capacitative and arachidonic acid-mediated calcium entry pathways. *J Biol Chem.* 276:20186-20189.
193. Lutjen-Drecoll, E. 1999. Functional morphology of the trabecular meshwork in primate eyes. *Prog. Retin. Eye Res* 18:91-119.
194. Lutjen-Drecoll, E. and J.W.Rohen. 1981. [Characteristics of connective tissue structures located in the anterior segment of the eye]. *Verh. Anat. Ges.* 75:147-155.
195. Lutjen-Drecoll, E., T.Shimizu, M.Rohrbach, and J.W.Rohen. 1986. Quantitative analysis of 'plaque material' in the inner- and outer wall of Schlemm's canal in normal- and glaucomatous eyes. *Exp. Eye Res* 42:443-455.
196. Ma, J.X., Q.Song, H.C.Hatcher, R.K.Crouch, L.Chao, and J.Chao. 1996. Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. *Exp. Eye Res* 63:19-26.
197. Manji, S.S., N.J.Parker, R.T.Williams, L.van Stekelenburg, R.B.Pearson, M.Dziadek, and P.J.Smith. 2000. STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochim. Biophys. Acta* 1481:147-155.
198. Marshall, G.E., A.G.Konstas, and W.R.Lee. 1991. Immunogold ultrastructural localization of collagens in the aged human outflow system. *Ophthalmology* 98:692-700.

199. Maruyama, T., T.Kanaji, S.Nakade, T.Kanno, and K.Mikoshiba. 1997. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *J Biochem.* 122:498-505.
200. Mathias, R.S., S.J.Zhang, E.Wilson, P.Gardner, and H.E.Ives. 1997. Non-capacitative calcium entry in Chinese hamster ovary cells expressing the platelet-derived growth factor receptor. *J Biol Chem.* 272:29076-29082.
201. Matsuo, T. 2000. Basal nitric oxide production is enhanced by hydraulic pressure in cultured human trabecular cells. *Br. J Ophthalmol.* 84:631-635.
202. Mattson, M.P., F.M.LaFerla, S.L.Chan, M.A.Leissring, P.N.Shepel, and J.D.Geiger. 2000. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 23:222-229.
203. May, C.A., L.M.Skorski, and E.Lutjen-Drecoll. 2005. Innervation of the porcine ciliary muscle and outflow region. *J Anat.* 206:231-236.
204. McFadzean, I. and A.Gibson. 2002. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br. J Pharmacol.* 135:1-13.
205. McIntosh, B.T., B.Hudson, S.Yegorova, C.A.Jollimore, and M.E.Kelly. 2007. Agonist-dependent cannabinoid receptor signalling in human trabecular meshwork cells. *Br. J Pharmacol.* 152:1111-1120.
206. Meininger, G.A., E.D.Moore, D.J.Schmidt, L.M.Lifshitz, and F.S.Fay. 1999. Distribution of active protein kinase C in smooth muscle. *Biophys. J* 77:973-984.
207. Mendelowitz, D., K.Bacal, and D.L.Kunze. 1992. Bradykinin-activated calcium influx pathway in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* 262:H942-H948.
208. Mercer, J.C., W.I.Dehaven, J.T.Smyth, B.Wedel, R.R.Boyles, G.S.Bird, and J.W.Putney, Jr. 2006. Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem.* 281:24979-24990.
209. Mignen, O., J.L.Thompson, D.I.Yule, and T.J.Shuttleworth. 2005. Agonist activation of arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup>-selective (ARC) channels in murine parotid and pancreatic acinar cells. *J Physiol* 564:791-801.

210. Mitchell, C.H., D.A.Carre, A.M.McGlenn, R.A.Stone, and M.M.Civan. 1998. A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 95:7174-7178.
211. Mitchell, C.H., J.C.Fleischhauer, W.D.Stamer, K.Peterson-Yantorno, and M.M.Civan. 2002. Human trabecular meshwork cell volume regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C315-C326.
212. Moneer, Z., J.L.Dyer, and C.W.Taylor. 2003. Nitric oxide co-ordinates the activities of the capacitative and non-capacitative Ca<sup>2+</sup>-entry pathways regulated by vasopressin. *Biochem. J* 370:439-448.
213. Moneer, Z., I.Pino, E.J.Taylor, L.M.Broad, Y.Liu, S.C.Tovey, L.Staali, and C.W.Taylor. 2005. Different phospholipase-C-coupled receptors differentially regulate capacitative and non-capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in A7r5 cells. *Biochem. J* 389:821-829.
214. Moreau, B., S.Straube, R.J.Fisher, J.W.Putney, Jr., and A.B.Parekh. 2005. Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent facilitation and Ca<sup>2+</sup> inactivation of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem.* 280:8776-8783.
215. Munaron, L., C.Distasi, V.Carabelli, F.M.Baccino, G.Bonelli, and D.Lovisololo. 1995. Sustained calcium influx activated by basic fibroblast growth factor in Balb-c 3T3 fibroblasts. *J Physiol* 484 ( Pt 3):557-566.
216. Murthy, K.S. 2006. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu. Rev Physiol* 68:345-374.
217. Nelson, M.T. and J.M.Quayle. 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268:C799-C822.
218. Ng, L.C. and A.M.Gurney. 2001. Store-operated channels mediate Ca(2+) influx and contraction in rat pulmonary artery. *Circ Res* 89:923-929.
219. Nguyen, T.D., P.Chen, W.D.Huang, H.Chen, D.Johnson, and J.R.Polansky. 1998. Gene structure and properties of TIGR, an olfactomedin-related glycoprotein cloned from glucocorticoid-induced trabecular meshwork cells. *J Biol Chem.* 273:6341-6350.
220. Nicholas, R.A. 2001. Identification of the P2Y(12) receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. *Mol Pharmacol.* 60:416-420.

221. Niemeyer, M.I., L.P.Cid, L.Zuniga, M.Catalan, and F.V.Sepulveda. 2003. A conserved pore-lining glutamate as a voltage- and chloride-dependent gate in the ClC-2 chloride channel. *J Physiol* 553:873-879.
222. Niiro, N. and M.Ikebe. 2001. Zipper-interacting protein kinase induces Ca(2+)-free smooth muscle contraction via myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*. 276:29567-29574.
223. Nilius, B. and G.Droogmans. 2001. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81:1415-1459.
224. Norwood, N., T.M.Moore, D.A.Dean, R.Bhattacharjee, M.Li, and T.Stevens. 2000. Store-operated calcium entry and increased endothelial cell permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L815-L824.
225. Ocklind, A. 1998. Effect of latanoprost on the extracellular matrix of the ciliary muscle. A study on cultured cells and tissue sections. *Exp. Eye Res* 67:179-191.
226. Okka, M., B.Tian, and P.L.Kaufman. 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.
227. Pang, I.H., D.L.Shade, A.F.Clark, H.T.Steely, and L.DeSantis. 1994. Preliminary characterization of a transformed cell strain derived from human trabecular meshwork. *Curr Eye Res* 13:51-63.
228. Parekh, A.B. 2003. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J Physiol* 547:333-348.
229. Parekh, A.B. 2007. Functional consequences of activating store-operated CRAC channels. *Cell Calcium* 42:111-121.
230. Parekh, A.B. and R.Penner. 1997b. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77:901-930.
231. Parekh, A.B. and R.Penner. 1997a. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* 77:901-930.

232. Parekh, A.B. and J.W.Putney, Jr. 2005b. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85:757-810.
233. Parekh, A.B. and J.W.Putney, Jr. 2005a. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85:757-810.
234. Park, B.C., M.Tibudan, M.Samaraweera, X.Shen, and B.Y.Yue. 2007. Interaction between two glaucoma genes, optineurin and myocilin. *Genes Cells* 12:969-979.
235. Patel, S., S.K.Joseph, and A.P.Thomas. 1999. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 25:247-264.
236. Pedersen, S.F., G.Owsianik, and B.Nilius. 2005. TRP channels: an overview. *Cell Calcium* 38:233-252.
237. Pelham, R.J., Jr. and Y.Wang. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 94:13661-13665.
238. Penner, R., G.Matthews, and E.Neher. 1988. Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells. *Nature* 334:499-504.
239. Peppiatt, C.M., T.J.Collins, L.Mackenzie, S.J.Conway, A.B.Holmes, M.D.Bootman, M.J.Berridge, J.T.Seo, and H.L.Roderick. 2003. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels. *Cell Calcium* 34:97-108.
240. Perez, C.A., R.F.Margolskee, S.C.Kinnamon, and T.Ogura. 2003. Making sense with TRP channels: store-operated calcium entry and the ion channel Trpm5 in taste receptor cells. *Cell Calcium* 33:541-549.
241. Peterson, J.A., B.Tian, A.D.Bershadsky, T.Volberg, R.E.Gangnon, I.Spector, B.Geiger, and P.L.Kaufman. 1999. Latrunculin-A increases outflow facility in the monkey. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 40:931-941.
242. Pfitzer, G. 2001. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* 91:497-503.

243. Philipp, S., A.Cavalié, M.Freichel, U.Wissenbach, S.Zimmer, C.Trost, A.Marquart, M.Murakami, and V.Flockerzi. 1996. A mammalian capacitative calcium entry channel homologous to *Drosophila* TRP and TRPL. *EMBO J* 15:6166-6171.
244. Pigozzi, D., B.Tombal, T.Ducret, P.Vacher, and P.Gailly. 2004. Role of store-dependent influx of Ca<sup>2+</sup> and efflux of K<sup>+</sup> in apoptosis of CHO cells. *Cell Calcium* 36:421-430.
245. Pintor, J., A.Peral, T.Pelaez, S.Martin, and C.H.Hoyle. 2003. Presence of diadenosine polyphosphates in the aqueous humor: their effect on intraocular pressure. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 304:342-348.
246. Potau, J.M., M.Canals, J.Costa, M.D.Merindano, and D.Ruano. 2000a. [Morphological alterations of the trabecular meshwork in primary open angle glaucoma]. *Arch. Soc. Esp Oftalmol.* 75:159-164.
247. Potau, J.M., M.Canals, J.Costa, M.D.Merindano, and D.Ruano. 2000b. [Ultrastructural characteristics of glaucomatous trabecular meshwork]. *Arch. Soc. Esp Oftalmol.* 75:21-28.
248. Prakriya, M. and R.S.Lewis. 2001. Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethyl-diphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors. *J Physiol* 536:3-19.
249. Prakriya, M. and R.S.Lewis. 2003. CRAC channels: activation, permeation, and the search for a molecular identity. *Cell Calcium* 33:311-321.
250. Prasanna, G., R.Krishnamoorthy, C.Hulet, H.Zhang, X.Zhang, and T.Yorio. 2000. Endothelin-1 induces nitric oxide synthase-2 expression in human non-pigmented ciliary epithelial cells. *Exp. Eye Res* 71:535-539.
251. Putney, J.W., Jr. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7:1-12.
252. Putney, J.W., Jr. 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11:611-624.
253. Putney, J.W., Jr. 2003. Capacitative calcium entry in the nervous system. *Cell Calcium* 34:339-344.

254. Putney, J.W., Jr. 2004. The enigmatic TRPCs: multifunctional cation channels. *Trends Cell Biol* 14:282-286.
255. Putney, J.W. 2005. Physiological mechanisms of TRPC activation. *Pflugers Arch.* 451:29-34.
256. Putney, J.W., Jr. 2007a. New molecular players in capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *J Cell Sci* 120:1959-1965.
257. Putney, J.W., Jr. 2007b. Recent breakthroughs in the molecular mechanism of capacitative calcium entry (with thoughts on how we got here). *Cell Calcium* 42:103-110.
258. Putney, J.W. and G.S.Bird. 2008. Cytoplasmic calcium oscillations and store-operated calcium influx. *J Physiol* 586:3055-3059.
259. Pyne, N.J., D.Tolan, and S.Pyne. 1997. Bradykinin stimulates cAMP synthesis via mitogen-activated protein kinase-dependent regulation of cytosolic phospholipase A2 and prostaglandin E2 release in airway smooth muscle. *Biochem. J* 328 ( Pt 2):689-694.
260. Rabiet, M.J., J.L.Plantier, Y.Rival, Y.Genoux, M.G.Lampugnani, and E.Dejana. 1996. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 16:488-496.
261. Ramachandran, C., M.Satpathy, D.Mehta, and S.P.Srinivas. 2008. Forskolin induces myosin light chain dephosphorylation in bovine trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res* 33:169-176.
262. Randriamampita, C. and R.Y.Tsien. 1993. Emptying of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores releases a novel small messenger that stimulates Ca<sup>2+</sup> influx. *Nature* 364:809-814.
263. Rao, P.V., P.Deng, Y.Sasaki, and D.L.Epstein. 2005. Regulation of myosin light chain phosphorylation in the trabecular meshwork: role in aqueous humor outflow facility. *Exp. Eye Res* 80:197-206.
264. Rao, P.V., P.F.Deng, J.Kumar, and D.L.Epstein. 2001. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 42:1029-1037.

265. Read, A.T., D.W.Chan, and C.R.Ethier. 2007. Actin structure in the outflow tract of normal and glaucomatous eyes. *Exp. Eye Res* 84:214-226.
266. Realini, T. 2008. Selective laser trabeculoplasty: a review. *J Glaucoma*. 17:497-502.
267. Reeves, J.P. and M.Condrescu. 2003. Lanthanum is transported by the sodium/calcium exchanger and regulates its activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C763-C770.
268. Renieri, G., L.Choritz, R.Rosenthal, S.Meissner, N.Pfeiffer, and H.Thieme. 2008. Effects of endothelin-1 on calcium-independent contraction of bovine trabecular meshwork. *Graefes Arch. Clin Exp. Ophthalmol*. 246:1107-1115.
269. Rico, F., P.Roca-Cusachs, N.Gavara, R.Farre, M.Rotger, and D.Navajas. 2005. Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips. *Phys. Rev E. Stat. Nonlin. Soft. Matter Phys*. 72:021914.
270. Rizzuto, R., P.Bernardi, and T.Pozzan. 2000. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol* 529 Pt 1:37-47.
271. Roos, J., P.J.DiGregorio, A.V.Yeromin, K.Ohlsen, M.Lioudyno, S.Zhang, O.Safrina, J.A.Kozak, S.L.Wagner, M.D.Cahalan, G.Velicelebi, and K.A.Stauderman. 2005. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol* 169:435-445.
272. Rosado, J.A. and S.O.Sage. 2000. Protein kinase C activates non-capacitative calcium entry in human platelets. *J Physiol* 529 Pt 1:159-169.
273. Rosenthal, R., L.Choritz, S.Schlott, N.E.Bechrakis, J.Jaroszewski, M.Wiederholt, and H.Thieme. 2005. Effects of ML-7 and Y-27632 on carbachol- and endothelin-1-induced contraction of bovine trabecular meshwork. *Exp. Eye Res* 80:837-845.
274. Russell, P. and D.H.Johnson. 1996. Enzymes protective of oxidative damage present in all decades of life in the trabecular meshwork, as detected by two-dimensional gel electrophoresis protein maps. *J Glaucoma*. 5:317-324.
275. Ruzycky, A.L. and K.G.Morgan. 1989. Involvement of the protein kinase C system in calcium-force relationships in ferret aorta. *Br. J Pharmacol*. 97:391-400.

276. Ryland, T.R., P.A.Lewis, M.Chisholm, K.N.Gelatt, and D.A.Samuels. 2003. Localization of smooth muscle actin in the iridocorneal angle of normal and spontaneous glaucomatous beagle dogs. *Vet. Ophthalmol.* 6:205-209.
277. Rzigalinski, B.A., K.A.Willoughby, S.W.Hoffman, J.R.Falck, and E.F.Ellis. 1999. Calcium influx factor, further evidence it is 5, 6-epoxyeicosatrienoic acid. *J Biol Chem.* 274:175-182.
278. Sabala, P., B.Targos, A.Caravelli, R.Czajkowski, D.Lim, G.Graganiello, L.Santella, and J.Baranska. 2002. Role of the actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry in glioma C6 cells. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 296:484-491.
279. Sacca, S.C., A.Pascotto, P.Camicione, P.Capris, and A.Izzotti. 2005. Oxidative DNA damage in the human trabecular meshwork: clinical correlation in patients with primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 123:458-463.
280. Sagara, T., D.D.Gaton, J.D.Lindsey, B.T.Gabelt, P.L.Kaufman, and R.N.Weinreb. 1999. Topical prostaglandin F<sub>2</sub>α treatment reduces collagen types I, III, and IV in the monkey uveoscleral outflow pathway. *Arch. Ophthalmol.* 117:794-801.
281. Sakamoto, K., T.Ezashi, K.Miwa, E.Okuda-Ashitaka, T.Houtani, T.Sugimoto, S.Ito, and O.Hayaishi. 1995. Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F<sub>2</sub> α receptor. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res* 23:259-261.
282. Sandoval, R., A.B.Malik, T.Naqvi, D.Mehta, and C.Tiruppathi. 2001. Requirement for Ca<sup>2+</sup> signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L239-L247.
283. Sato, K., M.Hori, H.Ozaki, H.Takano-Ohmuro, T.Tsuchiya, H.Sugi, and H.Karaki. 1992. Myosin phosphorylation-independent contraction induced by phorbol ester in vascular smooth muscle. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 261:497-505.
284. Schaefer, M., T.D.Plant, A.G.Obukhov, T.Hofmann, T.Gudermann, and G.Schultz. 2000. Receptor-mediated regulation of the nonselective cation channels TRPC4 and TRPC5. *J Biol Chem.* 275:17517-17526.
285. Schlotzer-Schrehardt, U., M.Zenkel, U.Decking, D.Haubs, F.E.Kruse, A.Junemann, M.Coca-Prados, and G.O.Naumann. 2005. Selective

- upregulation of the A<sub>3</sub> adenosine receptor in eyes with pseudoexfoliation syndrome and glaucoma. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 46:2023-2034.
286. Schneemann, A., A.Leusink-Muis, B.T.van den, P.F.Hoyng, and W.Kamphuis. 2003. Elevation of nitric oxide production in human trabecular meshwork by increased pressure. *Graefes Arch. Clin Exp. Ophthalmol.* 241:321-326.
  287. Schubert, R. 2005. Non-capacitative calcium entry--extension of the possibilities for calcium entry in vascular tissue. *Cardiovasc Res* 68:5-7.
  288. Schulte, G. and B.B.Fredholm. 2003. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal.* 15:813-827.
  289. Scuderi, G.L. and N.Pasquale. 2008. Laser therapies for glaucoma: new frontiers. *Prog. Brain Res* 173:225-236.
  290. Seccia, M., C.Perugini, E.Albano, and G.Bellomo. 1996. Inhibition of Cu<sup>2+</sup>-induced LDL oxidation by nitric oxide: a study using donors with different half-time of NO release. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 220:306-309.
  291. Selbach, J.M., J.Gottanka, M.Wittmann, and E.Lutjen-Drecoll. 2000. Efferent and afferent innervation of primate trabecular meshwork and scleral spur. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 41:2184-2191.
  292. Shade, D.L., A.F.Clark, and I.H.Pang. 1996. Effects of muscarinic agents on cultured human trabecular meshwork cells. *Exp. Eye Res* 62:201-210.
  293. Sharif, N.A., C.R.Kelly, and M.McLaughlin. 2006. Human trabecular meshwork cells express functional serotonin-2A (5HT<sub>2A</sub>) receptors: role in IOP reduction. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 47:4001-4010.
  294. Shearer, T.W. and C.E.Crosson. 2002. Adenosine A<sub>1</sub> receptor modulation of MMP-2 secretion by trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 43:3016-3020.
  295. Shen, X., T.Koga, B.C.Park, N.SundarRaj, and B.Y.Yue. 2008. Rho GTPase and cAMP/protein kinase A signaling mediates myocilin-induced alterations in cultured human trabecular meshwork cells. *J Biol Chem.* 283:603-612.

296. Shin, C.Y., Y.P.Lee, T.S.Lee, H.D.Je, D.S.Kim, and U.D.Sohn. 2002. The signal transduction of endothelin-1-induced circular smooth muscle cell contraction in cat esophagus. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 302:924-934.
297. Short, A.D., J.Bian, T.K.Ghosh, R.T.Waldron, S.L.Rybak, and D.L.Gill. 1993. Intracellular Ca<sup>2+</sup> pool content is linked to control of cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 90:4986-4990.
298. Shuttleworth, T.J. 1997. Intracellular Ca<sup>2+</sup> signalling in secretory cells. *J Exp. Biol* 200:303-314.
299. Shuttleworth, T.J., J.L.Thompson, and O.Mignen. 2004. ARC channels: a novel pathway for receptor-activated calcium entry. *Physiology. (Bethesda.)* 19:355-361.
300. Simonson, M.S. and M.J.Dunn. 1990. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J* 4:2989-3000.
301. Simpson, P.B., S.Mehotra, G.D.Lange, and J.T.Russell. 1997. High density distribution of endoplasmic reticulum proteins and mitochondria at specialized Ca<sup>2+</sup> release sites in oligodendrocyte processes. *J Biol Chem.* 272:22654-22661.
302. Sjoquist, B., A.Johansson, and J.Stjernschantz. 1999. Pharmacokinetics of latanoprost in the cynomolgus monkey. 3rd communication: tissue distribution after topical administration on the eye studied by whole body autoradiography. Glaucoma Research Laboratories. *Arzneimittelforschung.* 49:240-249.
303. Smani, T., S.I.Zakharov, P.Csutora, E.Leno, E.S.Trepakova, and V.M.Bolotina. 2004. A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat. Cell Biol* 6:113-120.
304. Soboloff, J., M.A.Spasoova, X.D.Tang, T.Hewavitharana, W.Xu, and D.L.Gill. 2006. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem.* 281:20661-20665.
305. Somasundaram, B., J.C.Norman, and M.P.Mahaut-Smith. 1995. Primaquine, an inhibitor of vesicular transport, blocks the calcium-release-activated current in rat megakaryocytes. *Biochem. J* 309 ( Pt 3):725-729.

306. Somlyo, A.P. and A.V.Somlyo. 2000. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522 Pt 2:177-185.
307. Somlyo, A.P. and A.V.Somlyo. 2004. Signal transduction through the RhoA/Rho-kinase pathway in smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 25:613-615.
308. Song, J. and M.J.Davis. 1994. Chloride and cation currents activated by bradykinin in coronary venular endothelial cells. *Am J Physiol* 267:H2508-H2515.
309. Song, Z.H. and M.Zhong. 2000. CB1 cannabinoid receptor-mediated cell migration. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 294:204-209.
310. Soto, D., N.Comes, E.Ferrer, M.Morales, A.Escalada, J.Pales, C.Solsona, A.Gual, and X.Gasull. 2004. Modulation of aqueous humor outflow by ionic mechanisms involved in trabecular meshwork cell volume regulation. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 45:3650-3661.
311. Soto, D., J.Pintor, A.Peral, A.Gual, and X.Gasull. 2005. Effects of dinucleoside polyphosphates on trabecular meshwork cells and aqueous humor outflow facility. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 314:1042-1051.
312. Spassova, M.A., J.Soboloff, L.P.He, W.Xu, M.A.Dziadek, and D.L.Gill. 2006. STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 103:4040-4045.
313. Stamer, W.D., S.F.Golightly, Y.Hosohata, E.P.Ryan, A.C.Porter, E.Varga, R.J.Noecker, C.C.Felder, and H.I.Yamamura. 2001a. Cannabinoid CB(1) receptor expression, activation and detection of endogenous ligand in trabecular meshwork and ciliary process tissues. *Eur. J Pharmacol.* 431:277-286.
314. Stamer, W.D., K.Peppel, M.E.O'Donnell, B.C.Roberts, F.Wu, and D.L.Epstein. 2001b. Expression of aquaporin-1 in human trabecular meshwork cells: role in resting cell volume. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 42:1803-1811.
315. Stamer, W.D., R.E.Seftor, S.K.Williams, H.A.Samaha, and R.W.Snyder. 1995. Isolation and culture of human trabecular meshwork cells by extracellular matrix digestion. *Curr Eye Res* 14:611-617.

316. Steely, H.T., S.L.Browder, M.B.Julian, S.T.Miggans, K.L.Wilson, and A.F.Clark. 1992. The effects of dexamethasone on fibronectin expression in cultured human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 33:2242-2250.
317. Stefan, C., D.M.Dumitrica, and C.Ardeleanu. 2007. [The future started: nitric oxide in glaucoma]. *Oftalmologia* 51:89-94.
318. Stevens, T. 2001. Is there a role for store-operated calcium entry in vasoconstriction? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L866-L869.
319. Stumpff, F., M.Boxberger, A.Krauss, R.Rosenthal, S.Meissner, L.Choritz, M.Wiederholt, and H.Thieme. 2005a. Stimulation of cannabinoid (CB1) and prostanoid (EP2) receptors opens BKCa channels and relaxes ocular trabecular meshwork. *Exp. Eye Res* 80:697-708.
320. Stumpff, F., M.Boxberger, A.Krauss, R.Rosenthal, S.Meissner, L.Choritz, M.Wiederholt, and H.Thieme. 2005b. Stimulation of cannabinoid (CB1) and prostanoid (EP2) receptors opens BKCa channels and relaxes ocular trabecular meshwork. *Exp. Eye Res* 80:697-708.
321. Stumpff, F., O.Strauss, M.Boxberger, and M.Wiederholt. 1997. Characterization of maxi-K-channels in bovine trabecular meshwork and their activation by cyclic guanosine monophosphate. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 38:1883-1892.
322. Stumpff, F. and M.Wiederholt. 2000. Regulation of trabecular meshwork contractility. *Ophthalmologica* 214:33-53.
323. Sugiyama, T. and I.Azuma. 1995. Effect of UF-021 on optic nerve head circulation in rabbits. *Jpn. J Ophthalmol.* 39:124-129.
324. Suplat, D., B.Targos, P.Sabala, J.Baranska, and P.Pomorski. 2004. Differentiation of answer of glioma C6 cells to SERCA pump inhibitors by actin disorganization. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 323:870-875.
325. Syriani, E., A.Gomez-Cabrero, M.Bosch, A.Moya, E.Abad, A.Gual, X.Gasull, and M.Morales. 2008. Profilin induces lamellipodia by growth factor-independent mechanism. *FASEB J* 22:1581-1596.
326. Tahir, S.K. and A.M.Zimmerman. 1991. Influence of marihuana on cellular structures and biochemical activities. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40:617-623.

327. Takemura, H., A.R.Hughes, O.Thastrup, and J.W.Putney, Jr. 1989a. Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 264:12266-12271.
328. Takemura, H., A.R.Hughes, O.Thastrup, and J.W.Putney, Jr. 1989b. Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 264:12266-12271.
329. Tamm, E., C.Flugel, F.H.Stefani, and J.W.Rohen. 1992. Contractile cells in the human scleral spur. *Exp. Eye Res* 54:531-543.
330. Targos, B., J.ska, and P.Pomorski. 2005. Store-operated calcium entry in physiology and pathology of mammalian cells. *Acta Biochim. Pol.* 52:379-409.
331. Taylor, C.W., P.C.da Fonseca, and E.P.Morris. 2004. IP(3) receptors: the search for structure. *Trends Biochem. Sci* 29:210-219.
332. Taylor, C.W. and Z.Moneer. 2004. Regulation of capacitative and non-capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Biol Res* 37:641-645.
333. Tezel, G., M.A.Kass, A.E.Kolker, B.Becker, and M.B.Wax. 1997. Plasma and aqueous humor endothelin levels in primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma.* 6:83-89.
334. Thieme, H., J.U.Nass, M.Nuskovski, N.E.Bechrakis, F.Stumpff, O.Strauss, and M.Wiederholt. 1999. The effects of protein kinase C on trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 40:3254-3261.
335. Thieme, H., M.Nuskovski, J.U.Nass, U.Pleyer, O.Strauss, and M.Wiederholt. 2000. Mediation of calcium-independent contraction in trabecular meshwork through protein kinase C and rho-A. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 41:4240-4246.
336. Thieme, H., C.Schimmat, G.Munzer, M.Boxberger, M.Fromm, N.Pfeiffer, and R.Rosenthal. 2006a. Endothelin antagonism: effects of FP receptor agonists prostaglandin F<sub>2</sub>alpha and fluprostenol on trabecular meshwork contractility. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 47:938-945.

337. Thieme, H., C.Schimmat, G.Munzer, M.Boxberger, M.Fromm, N.Pfeiffer, and R.Rosenthal. 2006b. Endothelin antagonism: effects of FP receptor agonists prostaglandin F<sub>2</sub>alpha and fluprostenol on trabecular meshwork contractility. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 47:938-945.
338. Thomas, A.P., G.S.Bird, G.Hajnoczky, L.D.Robb-Gaspers, and J.W.Putney, Jr. 1996. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J* 10:1505-1517.
339. Thomas, G.D., V.A.Snetkov, R.Patel, R.M.Leach, P.I.Aaronson, and J.P.Ward. 2005. Sphingosylphosphorylcholine-induced vasoconstriction of pulmonary artery: activation of non-store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Cardiovasc Res* 68:56-64.
340. Thompson, S.H. 1997. Cyclic GMP-gated channels in a sympathetic neuron cell line. *J Gen. Physiol* 110:155-164.
341. Tian, B. and P.L.Kaufman. 2005. Effects of the Rho kinase inhibitor Y-27632 and the phosphatase inhibitor calyculin A on outflow facility in monkeys. *Exp. Eye Res* 80:215-225.
342. Tinton, S.A., S.C.Chow, P.M.Buc-Calderon, and G.E.Kass. 1996. Adenosine stimulates calcium influx in isolated rat hepatocytes. *Eur. J Biochem.* 238:576-581.
343. Tiruppathi, C., R.D.Minshall, B.C.Paria, S.M.Vogel, and A.B.Malik. 2002. Role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul. Pharmacol.* 39:173-185.
344. Tolic-Norrelykke, I.M., J.P.Butler, J.Chen, and N.Wang. 2002. Spatial and temporal traction response in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1254-C1266.
345. Torphy, T.J. 1994. Beta-adrenoceptors, cAMP and airway smooth muscle relaxation: challenges to the dogma. *Trends Pharmacol. Sci* 15:370-374.
346. Trebak, M., J.B.St, R.R.McKay, L.Birnbaumer, and J.W.Putney, Jr. 2003. Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels. *J Biol Chem.* 278:16244-16252.
347. Tripathi, R.C. 1971. Ultrastructure of the exit pathway of the aqueous in lower mammals. (A preliminary report on the "angular aqueous plexus"). *Exp. Eye Res* 12:311-314.

348. Tripathi, R.C. and B.J.Tripathi. 1980. Contractile protein alteration in trabecular endothelium in primary open-angle glaucoma. *Exp. Eye Res* 31:721-724.
349. Troyer, D.A., O.F.Gonzalez, J.G.Douglas, and J.I.Kreisberg. 1988. Phorbol ester inhibits arginine vasopressin activation of phospholipase C and promotes contraction of, and prostaglandin production by, cultured mesangial cells. *Biochem. J* 251:907-912.
350. Ueda, J., K.K.Wentz-Hunter, E.L.Cheng, T.Fukuchi, H.Abe, and B.Y.Yue. 2000. Ultrastructural localization of myocilin in human trabecular meshwork cells and tissues. *J Histochem. Cytochem.* 48:1321-1330.
351. Vanden Abeele, F., L.Lemonnier, S.Thebault, G.Lepage, J.B.Parys, Y.Shuba, R.Skryma, and N.Prevarskaya. 2004. Two types of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem.* 279:30326-30337.
352. Vanden Abeele, F., M.Roudbaraki, Y.Shuba, R.Skryma, and N.Prevarskaya. 2003. Store-operated Ca<sup>2+</sup> current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca<sup>2+</sup> transporter type 1. *J Biol Chem.* 278:15381-15389.
353. Venkatachalam, K. and C.Montell. 2007. TRP channels. *Annu. Rev Biochem.* 76:387-417.
354. Verkman, A.S. 2003. Role of aquaporin water channels in eye function. *Exp. Eye Res* 76:137-143.
355. Vig, M. and J.P.Kinet. 2007. The long and arduous road to CRAC. *Cell Calcium* 42:157-162.
356. Vittitow, J. and T.Borras. 2002. Expression of optineurin, a glaucoma-linked gene, is influenced by elevated intraocular pressure. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 298:67-74.
357. Vittitow, J. and T.Borras. 2004. Genes expressed in the human trabecular meshwork during pressure-induced homeostatic response. *J Cell Physiol* 201:126-137.
358. Vittitow, J.L., R.Garg, L.L.Rowlette, D.L.Epstein, E.T.O'Brien, and T.Borras. 2002. Gene transfer of dominant-negative RhoA increases outflow facility in perfused human anterior segment cultures. *Mol Vis.* 8:32-44.

359. Walsh, M.P., J.E.Andrea, B.G.Allen, O.Clement-Chomienne, E.M.Collins, and K.G.Morgan. 1994. Smooth muscle protein kinase C. *Can. J Physiol Pharmacol.* 72:1392-1399.
360. Wan, Z., D.F.Woodward, C.L.Cornell, H.G.Fliri, J.L.Martos, S.N.Pettit, J.W.Wang, A.B.Kharlamb, L.A.Wheeler, M.E.Garst, K.J.Landsverk, C.S.Struble, and W.D.Stamer. 2007. Bimatoprost, prostamide activity, and conventional drainage. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 48:4107-4115.
361. Wang, N., S.K.Chintala, M.E.Fini, and J.S.Schuman. 2001. Activation of a tissue-specific stress response in the aqueous outflow pathway of the eye defines the glaucoma disease phenotype. *Nat. Med* 7:304-309.
362. Wang, Y.X. and M.I.Kotlikoff. 2000. Signalling pathway for histamine activation of non-selective cation channels in equine tracheal myocytes. *J Physiol* 523 Pt 1:131-138.
363. Ward, J.P., T.P.Robertson, and P.I.Aaronson. 2005. Capacitative calcium entry: a central role in hypoxic pulmonary vasoconstriction? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L2-L4.
364. Webb, J.G., S.Husain, P.W.Yates, and C.E.Crosson. 2006. Kinin modulation of conventional outflow facility in the bovine eye. *J Ocul. Pharmacol. Ther.* 22:310-316.
365. Webb, J.G., T.W.Shearer, P.W.Yates, Y.V.Mukhin, and C.E.Crosson. 2003. Bradykinin enhancement of PGE<sub>2</sub> signalling in bovine trabecular meshwork cells. *Exp. Eye Res* 76:283-289.
366. Webb, R.C. 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol Educ.* 27:201-206.
367. Weinreb, R.N. and P.T.Khaw. 2004. Primary open-angle glaucoma. *Lancet* 363:1711-1720.
368. Weinreb, R.N. and M.D.Mitchell. 1989. Prostaglandin production by cultured cynomolgus monkey trabecular meshwork cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 36:97-100.
369. Weinreb, R.N., M.D.Mitchell, and J.R.Polansky. 1983. Prostaglandin production by human trabecular cells: in vitro inhibition by dexamethasone. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 24:1541-1545.

370. Weiss, G.B. and F.R.Goodman. 1969. Effects of lanthanum on contraction, calcium distribution and  $Ca^{45}$  movements in intestinal smooth muscle. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 169:46-55.
371. Wiederholt, M. 1998b. Direct involvement of trabecular meshwork in the regulation of aqueous humor outflow. *Curr Opin. Ophthalmol.* 9:46-49.
372. Wiederholt, M. 1998a. Direct involvement of trabecular meshwork in the regulation of aqueous humor outflow. *Curr Opin. Ophthalmol.* 9:46-49.
373. Wiederholt, M., S.Bielka, F.Schweig, E.Lutjen-Drecoll, and A.Lepple-Wienhues. 1995. Regulation of outflow rate and resistance in the perfused anterior segment of the bovine eye. *Exp. Eye Res* 61:223-234.
374. Wiederholt, M., R.Schafer, U.Wagner, and A.Lepple-Wienhues. 1996. Contractile response of the isolated trabecular meshwork and ciliary muscle to cholinergic and adrenergic agents. *Ger J Ophthalmol.* 5:146-153.
375. Wiederholt, M., A.Sturm, and A.Lepple-Wienhues. 1994b. Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 35:2515-2520.
376. Wiederholt, M., A.Sturm, and A.Lepple-Wienhues. 1994a. Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 35:2515-2520.
377. Wiederholt, M., H.Thieme, and F.Stumpff. 2000b. The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Prog. Retin. Eye Res* 19:271-295.
378. Wiederholt, M., H.Thieme, and F.Stumpff. 2000a. The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Prog. Retin. Eye Res* 19:271-295.
379. Worley, P.F., W.Zeng, G.N.Huang, J.P.Yuan, J.Y.Kim, M.G.Lee, and S.Muallem. 2007. TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium* 42:205-211.
380. Wu, S., E.A.Cioffi, D.Alvarez, S.L.Sayner, H.Chen, D.L.Cioffi, J.King, J.R.Creighton, M.Townsley, S.R.Goodman, and T.Stevens. 2005. Essential role of a  $Ca^{2+}$ -selective, store-operated current (ISOC) in endothelial cell permeability: determinants of the vascular leak site. *Circ Res* 96:856-863.

381. Wu, X., T.K.Zagranichnaya, G.T.Gurda, E.M.Eves, and M.L.Villereal. 2004. A TRPC1/TRPC3-mediated increase in store-operated calcium entry is required for differentiation of H19-7 hippocampal neuronal cells. *J Biol Chem.* 279:43392-43402.
382. Xu, X., R.A.Star, G.Tortorici, and S.Muallem. 1994. Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores activates nitric-oxide synthase to generate cGMP and regulate Ca<sup>2+</sup> influx. *J Biol Chem.* 269:12645-12653.
383. Yamamoto, N., T.Wakabayashi, K.Murakami, and S.Hommura. 2003. Detection of CMV DNA in the aqueous humor of AIDS patients with CMV retinitis by AMPLICOR CMV test. *Ophthalmologica* 217:45-48.
384. Yeromin, A.V., S.L.Zhang, W.Jiang, Y.Yu, O.Safrina, and M.D.Cahalan. 2006. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 443:226-229.
385. Yokoyama, K., S.Awaya, K.Mizumura, and T.Kumazawa. 1990. Implication of polymodal receptor activities in intraocular pressure elevation by neurogenic inflammation. *Jpn. J Ophthalmol.* 34:245-255.
386. Yoo, A.S., I.Cheng, S.Chung, T.Z.Grenfell, H.Lee, E.Pack-Chung, M.Handler, J.Shen, W.Xia, G.Tesco, A.J.Saunders, K.Ding, M.P.Frosch, R.E.Tanzi, and T.W.Kim. 2000. Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry. *Neuron* 27:561-572.
387. Yorio, T., R.Krishnamoorthy, and G.Prasanna. 2002. Endothelin: is it a contributor to glaucoma pathophysiology? *J Glaucoma.* 11:259-270.
388. Yousufzai, S.Y., Z.Ye, and A.A.Abdel-Latif. 1995. Prostaglandins mediate the stimulatory effects of endothelin-1 on cAMP accumulation and inositol-1,4,5-trisphosphate production and contraction in cat iris sphincter. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 275:1280-1287.
389. Yu, Y., M.Sweeney, S.Zhang, O.Platoshyn, J.Landsberg, A.Rothman, and J.X.Yuan. 2003. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C316-C330.
390. Zhang, S.L., A.V.Yeromin, X.H.Zhang, Y.Yu, O.Safrina, A.Penna, J.Roos, K.A.Stauderman, and M.D.Cahalan. 2006. Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 103:9357-9362.

391. Zhang, S.L., Y.Yu, J.Roos, J.A.Kozak, T.J.Deerinck, M.H.Ellisman, K.A.Stauderman, and M.D.Cahalan. 2005. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature* 437:902-905.
392. Zhang, W., H.Meng, Z.H.Li, Z.Shu, X.Ma, and B.X.Zhang. 2007a. Regulation of STIM1, store-operated Ca<sup>2+</sup> influx, and nitric oxide generation by retinoic acid in rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1054-F1064.
393. Zhang, X., C.M.Ognibene, A.F.Clark, and T.Yorio. 2007b. Dexamethasone inhibition of trabecular meshwork cell phagocytosis and its modulation by glucocorticoid receptor beta. *Exp. Eye Res* 84:275-284.
394. Zhong, L., L.Geng, Y.Njie, W.Feng, and Z.H.Song. 2005. CB2 cannabinoid receptors in trabecular meshwork cells mediate JWH015-induced enhancement of aqueous humor outflow facility. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci* 46:1988-1992.
395. Zhu, X., M.Jiang, and L.Birnbaumer. 1998. Receptor-activated Ca<sup>2+</sup> influx via human Trp3 stably expressed in human embryonic kidney (HEK)293 cells. Evidence for a non-capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *J Biol Chem.* 273:133-142.
396. Zhu, X., M.Jiang, M.Peyton, G.Boulay, R.Hurst, E.Stefani, and L.Birnbaumer. 1996. trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *Cell* 85:661-671.
397. Zweifach, A. and R.S.Lewis. 1993. Mitogen-regulated Ca<sup>2+</sup> current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* 90:6295-6299.

Artículo publicado, 2008



# Activation of Store-Operated $\text{Ca}^{2+}$ Channels in Trabecular Meshwork Cells

Elena Abad,<sup>1</sup> Gisela Lorente,<sup>1</sup> Núria Gavara,<sup>2</sup> Miguel Morales,<sup>1</sup> Arcadi Gual,<sup>1</sup> and Xavier Gasull<sup>1</sup>

**PURPOSE.** In nonexcitable cells,  $G_q$ -coupled membrane receptor activation induces a biphasic increase in intracellular calcium ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) expressed as an initial  $\text{IP}_3$ -dependent release from intracellular stores followed by a sustained  $\text{Ca}^{2+}$  influx from the extracellular space that involves store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (SOCs). In trabecular meshwork (TM) cells, contractile agonists such as bradykinin (BK) and endothelin-1 (ET-1) induce this type of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. Given that trabecular outflow is modified by tissue contractility, the authors characterized SOCs and studied their participation in TM cell contractility.

**METHODS.**  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  was measured in cultured bovine TM cells loaded with Fura-2.  $\text{Ca}^{2+}$  currents were recorded using the patch clamp technique. Cell contractility measurements were assessed by traction microscopy.

**RESULTS.** BK and ET-1 activate a store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry that was greatly reduced in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  or by preincubation with SOC blocker 2-APB or SKF96365. Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  currents were also activated by intracellular dialysis with  $\text{IP}_3$  + EGTA or after stimulation with thapsigargin. Electrophysiological characterization supports the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (CRACs) and nonselective cation channels, of which TRPC1 and TRPC4 channels may be candidate TRPs detected in TM cells. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry through SOCs is not required for TM cell contraction in response to BK or ET-1, but it modulates this process.

**CONCLUSIONS.** Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry in TM cells in response to agonist stimulation and store-depletion is mediated by the activation of SOCs, which do not contribute to cell contraction but which may activate regulatory mechanisms to prevent excessive contraction. CRAC and TRPC channels involved represent interesting modulators of TM function to improve aqueous humor outflow. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:677–686) DOI:10.1167/iovs.07-1080

The trabecular meshwork (TM) is a tissue located in the iridocorneal angle that actively regulates the flow of aqueous humor (AH) exiting the eye. The TM is a key determinant to maintain intraocular pressure,<sup>1</sup> and malfunction of this tissue often leads to ocular hypertension and glaucoma.<sup>2</sup> Among

the different mechanisms that determine AH outflow pathway permeability, contraction and relaxation of TM cells appear to be among the most relevant.<sup>3</sup> In support of this, TM cells display contractile properties<sup>4</sup> and respond, through TM cell surface receptors, to substances that induce contractions, released by TM cells themselves or by surrounding tissues. In this sense, several substances known to contract the TM also reduce outflow facility, whereas cellular relaxation is commonly associated with the opposite effect.<sup>3,5–9</sup> In TM cells, tissue and cellular contraction have been reported after stimulation with carbachol, endothelin-1 (ET-1), or bradykinin (BK), among other substances.<sup>6,10,11</sup> Interestingly, in all cases, a biphasic increase in intracellular calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) was observed when TM cells in culture were stimulated with the aforementioned substances.<sup>6,12,13</sup>

Free  $\text{Ca}^{2+}$  elevation is one of the early events occurring after the stimulation of many cell membrane receptors, and it is fundamental for cell survival and function. Commonly, this  $\text{Ca}^{2+}$  elevation is multiphasic and includes  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores and  $\text{Ca}^{2+}$  influx across the plasma membrane. Extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry is essential for many cellular processes such as cell growth and differentiation, cell motility, enzyme control, gene activation, exocytosis, nitric oxide (NO) production, and cell contraction.<sup>14,15</sup> The release of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores by different mechanisms activates a store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (previously known as capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry) that appears to be mediated by the coordinated interaction of STIM1 and Orai1 proteins; the former is the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor and the latter is a plasma membrane calcium channel.<sup>16–19</sup> Agonists such as carbachol, signaling through  $G_q$ -coupled receptors, produce  $\text{IP}_3$ -mediated depletion of  $\text{Ca}^{2+}$  stores that can activate store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (SOCs) but also, by means of STIM1, appear to activate TRPC1 channels in HEK293 cells.<sup>20</sup> TRPC1 is a member of the canonical transient receptor potential (TRPC) subfamily of channels that has been involved in receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry after stimulation of the PLC pathway.<sup>21,22</sup> TRPC1, TRPC6, and other channels of their subfamily mediate the sustained  $\text{Ca}^{2+}$  increase that precedes Rho activation and endothelial cell contraction,<sup>23,24</sup> thus enhancing vascular permeability.<sup>25</sup>

It is possible to hypothesize that mechanisms similar to the ones described may be present in TM cells to regulate the permeability of the outflow pathway in response to different stimuli. Here we show that TM cells have two store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathways, one involving  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (CRACs) and another likely involving TRPC channels. External factors activating  $G_q$ -coupled membrane receptors trigger a sustained  $\text{Ca}^{2+}$  increase that, though is not necessary for acute TM cell contraction, appears to modulate this process, probably in conjunction with other yet undetermined regulatory events.

## MATERIALS AND METHODS

### Culture of Trabecular Meshwork Cells

Bovine TM cell cultures were performed using eyes from 3- to 6-month-old cows obtained at the local abattoir 0.5 hour to 2 hours after death

From the <sup>1</sup>Laboratory of Neurophysiology, Faculty of Medicine, and the <sup>2</sup>Biophysics Unit, Department of Physiological Sciences I-Institute of Biomedical Investigations August Pi i Sunyer, School of Medicine, University of Barcelona, Spain.

Supported by Ministerio de Educación y Ciencia Grants BFU2005-01572 (XG), BFU2006-04169 (AG), and BFU2006-15047 (MM).

Submitted for publication August 17, 2007; revised October 25, 2007; accepted December 17, 2007.

Disclosure: E. Abad, None; G. Lorente, None; N. Gavara, None; M. Morales, 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, University of Barcelona, Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain; xgasull@ub.edu.

and kept in PBS at 4°C for not more than 1.5 hours. A slight modification of the technique described by Stamer et al.<sup>26</sup> was used. As described,<sup>6,7</sup> TM strips were digested with 2 mg/mL collagenase and 0.5 mg/mL bovine serum albumin (BSA) at 37°C for 2 hours. After trituration with fire-polished glass Pasteur pipettes, the supernatant was collected and centrifuged. The pellet was resuspended and seeded in culture flasks containing Dulbecco modified Eagle medium plus 10% fetal bovine serum, 100 mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2.5 µg/mL amphotericin B. Cells reached confluence 12 to 15 days later. Cell passages were performed using trypsin-EDTA. Cells from passages 1 to 3 were used. All products for cell culture were obtained from Sigma (Madrid, Spain).

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

Measurement of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) was performed as described in detail.<sup>7</sup> Briefly, bovine TM 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 45 minutes at 37°C in incubation buffer (140 mM NaCl, 4.3 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 10 mM HEPES, at pH 7.4 with NaOH). Ca<sup>2+</sup> was omitted in the Ca<sup>2+</sup>-free solution, and 1 mM EGTA was added. Coverslips with fura-2-loaded cells were transferred to an open flow chamber (1 mL incubation buffer) mounted on the heated stage of an inverted microscope (IX70; Olympus, Tokyo, Japan) using a TILL monochromator as a source of illumination. Images were taken with an attached cooled charge-coupled device (CCD) camera (Orca II-ER; Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and were digitized, stored, and analyzed on a personal computer using image analysis software (Aquacosmos; Hamamatsu Photonics). After a stabilization period of 10 minutes, image pairs were obtained alternately every 4 seconds at excitation wavelengths of 340 (λ<sub>1</sub>) and 380 nm (λ<sub>2</sub>; 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). Typically, 10 to 20 cells were present in a field, and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> values were calculated and analyzed individually for each single cell from the 340- to 380-nm fluorescence ratios at each time point.<sup>7</sup> Drug responses in each field were homogeneous, and several experiments with cells from different primary cultures were used in all the groups assayed.

### Patch Clamp Procedures

TM cells were plated onto small glass coverslips and studied between 24 to 72 hours thereafter. Coverslips were transferred to a special chamber (0.2 mL) in the stage of an inverted microscope (Diaphot; Nikon, Tokyo, Japan) so the recordings could be performed. External solutions were superfused at a rate of 3 to 4 mL/min by gravity. Before the recording session was started, the culture medium was replaced with a 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) with a filled-tip resistance between 7 MΩ and 9 MΩ. Pipette capacitance to ground was neutralized after the seal was formed. An Ag/AgCl ground electrode mounted in a 3 M KCl agar bridge was used. Positive pressure was applied before the pipette entered the bath and until cell contact. Whole-cell currents were recorded using a patch clamp amplifier (L/M-EPC7; Heka, Lambrecht/Pfalz, Germany), as described.<sup>7,27</sup> Data acquisition and command potentials were controlled with patch clamp software (pClamp 9.0; Axon Instruments, Sunnyvale, CA) using a digitizer (Digidata 1320A; Axon Instruments). After breaking into the whole-cell configuration, cells were allowed to stabilize and dialyze for 3 to 4 minutes before recording was begun. Whole-cell currents were recorded at 10 kHz. Cells were clamped at 0 mV, and 500-ms ramps from -100 to +100 mV were applied every 5 seconds. Data were corrected for the calculated theoretical junction potential values for each solution with the Junction Potential Calculator feature of the patch clamp software (pClamp 9.0; Axon Instruments), which uses the Henderson equation to calculate the liquid junction potential. Devel-

opment of the current was assessed from the current amplitudes at potential of -80 mV recorded during voltage ramps. The first three ramps of the protocol or the three previous to the addition of the drug were used for leak subtraction in the subsequent current records.

In the whole-cell perforated patch technique, pipettes were filled back with intracellular solution in which a polyene antifungal (Nystatin, 150 µg mL<sup>-1</sup>; Sigma) was dissolved. The solution was from a stock solution (3 mg/60 µL dimethyl sulfoxide) and sonicated to the final concentration. Slowly developing capacitative transients indicated establishment of the whole-cell perforated patch configuration. We continuously monitored series resistance to avoid sudden drops in this parameter, indicating the ruptured-patch configuration was achieved. Only experiments with constant series resistance during the whole recording were considered for analysis.

The intracellular pipette solution contained 145 mM CsMethanesulfonate, 8 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM MgATP, 0.2 mM EGTA, 10 mM Hepes (pH 7.2) adjusted with CsOH. In some experiments, 10 mM EGTA was used, as indicated. The standard isotonic bath solution contained 145 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CsCl, 10 mM glucose, 10 mM Hepes (pH 7.4) adjusted with NaOH. In some experiments, divalent-free solution (DVF) was used, as follows: 145 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 10 mM CsCl, 2 mM EGTA, 10 mM glucose, 10 mM Hepes (pH 7.4) adjusted with NaOH.

### Western Blot Analysis

SDS-PAGE was performed using the Laemmli method. Samples were electrophoresed in 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) according to the standard procedure. Nonspecific protein-binding sites were blocked with a solution containing 2% BSA and 0.1% Tween-20 in Tris-buffered saline (TBS; 20 mM Tris-HCl [pH 7.4] and 137 mM NaCl; TBT-BSA) for 1 hour. Membranes were then incubated with rabbit anti-TRPC1, anti-TRPC3, anti-TRPC4, anti-TRPC5, anti-TRPC6 IgG (Alomone Laboratories Ltd., Jerusalem, Israel) at 1:200 in TBT-BSA for 1 hour. Membranes were washed three times with TBT-BSA and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibodies at 1:2500 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) in TBS-T (0.1% Tween-20 in TBS) for 1 hour. Finally, the membranes were washed three times in TBS-T and twice in PBS. Detection was performed by a chemiluminescence method with substrate (Immuno-HRPTM Star Substrate; Bio-Rad).

### Measurement of Cell Contraction

Measurement of cell contraction was assessed by traction microscopy, as previously described in detail.<sup>28</sup> Briefly, cells were seeded in thin collagen-coated polyacrylamide gel disks, as described by Pelham and Wang.<sup>29</sup> Green fluorescent latex beads 0.2 µm in diameter were mixed with 2% acrylamide and 0.3% bis-acrylamide solution (1:125 vol/vol bead solution volume of acrylamide mixture). Gel disks approximately 70 µm thick and 8 mm in diameter attached to a glass coverslip were prepared with 10 µL of this solution and subsequently coated with 3 µg/cm<sup>2</sup> collagen I.

Coverslips containing cells cultured on polyacrylamide disks were mounted on the stage of an inverted fluorescence microscope (Eclipse TE2000; Nikon) placed on a vibration isolation table (Isostation; Newport, Irvine, CA). Bright-field and fluorescence images were acquired with a 12-bit resolution cooled CCD camera (Orca; Hamamatsu Photonics). The apparent pixel size after magnification (40×) was 0.16 µm, with a resultant field of view of 161 × 161 µm<sup>2</sup>. A bright-field image of an isolated cell was captured to determine its boundary. Subsequently, the apical surface of the gel was focused, and fluorescence images of the microbeads embedded near the surface of the gel were acquired at 1 image/min. After 5 minutes of baseline recording, BK or ET-1 was added, and fluorescent images were acquired for an additional 10 to 20 minutes. At the beginning of the recording, a bright-field image was captured to define the area of the cell. At the end of the experiment, the cells were removed from the gel by

exposure to trypsin. Finally, an additional fluorescent image was recorded to determine the position of the beads in the unstrained gel (reference image). A small percentage of isolated cells showed partial detachment from the substrate after agonist addition. Detached cells were discarded for traction microscopy measurements.

Cell boundary was determined using a Sobel edge detector algorithm implemented in a graphics program (LabView; National Instruments, Austin, TX). The projected area of the cell was computed as the area enclosed by the cell boundary. To compute traction forces ( $T$ )

exerted by the cell on the substrate,<sup>28</sup> the displacement field of the gel substrate was first determined from the stored fluorescence bead images. The displacement field between each fluorescence image and the reference image was computed using the image correlation method. Spatial resolution of the displacement and traction maps was 1.3  $\mu\text{m}$ . For each traction field, the total force magnitude ( $F$ ) was computed by integrating the magnitude of  $T(x, y)$  over the projected area of the cell. Although the net vectorial force over the contact area was zero, the integral of the modulus provided a useful index of the cell contractile strength. The average traction of the cell was computed as  $F/\text{cell area}$ .

### Statistical Analysis

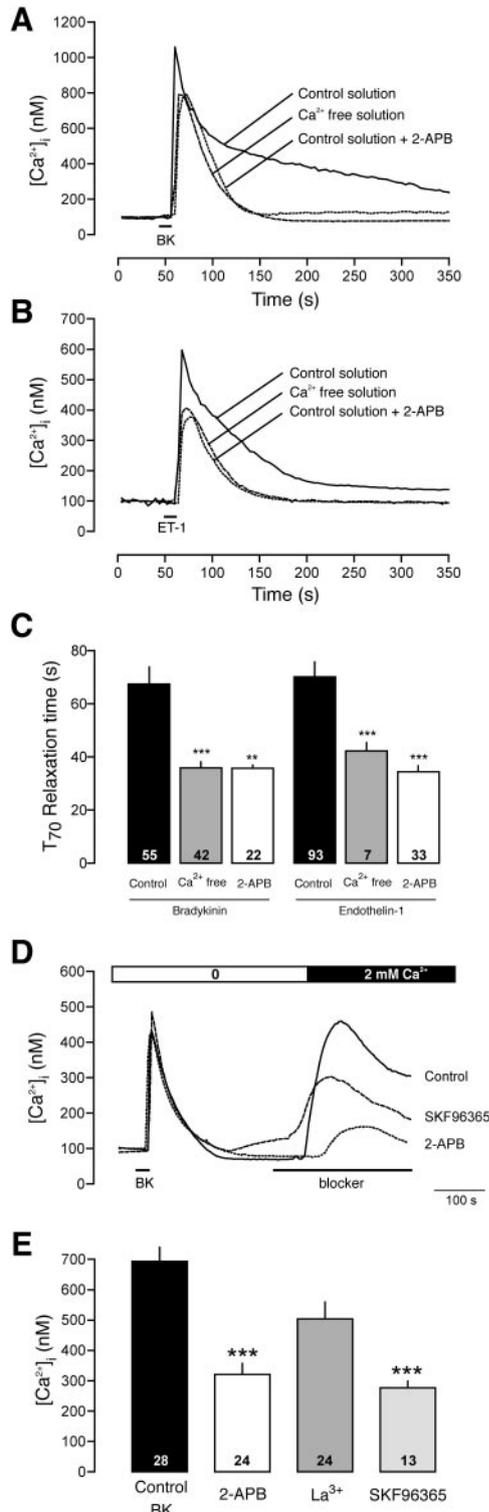
Data are presented as mean  $\pm$  SEM and were analyzed using paired or unpaired  $t$ -tests and statistical analysis software (Prism 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Two-tailed tests were used, with statistical significance set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Characterization of Extracellular Ca<sup>2+</sup> Entry in TM Cells

Ca<sup>2+</sup> signaling and homeostasis are important regulators of many processes, triggering proliferation, cell contraction, secretion, and information processing in many cell types.<sup>15</sup> Several substances in the aqueous humor can activate G<sub>q</sub> protein-coupled receptors in the membrane of TM cells to elicit an increase in intracellular Ca<sup>2+</sup>. The pathways involved in this Ca<sup>2+</sup> increase are still unknown in these cells.<sup>6,7,30-34</sup> To first investigate the ionic mechanisms allowing extracellular Ca<sup>2+</sup> to enter TM cells, we compared BK and ET-1 responses in physiological medium (control) or Ca<sup>2+</sup>-free medium or the presence of 2-APB, an alleged blocker of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry.<sup>35</sup> Ca<sup>2+</sup> increase induced by BK or ET-1 (Figs. 1A, 1B) was attributed to an initial release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores followed by a sustained Ca<sup>2+</sup> entry from the extracellular space that was impaired in Ca<sup>2+</sup>-free medium or in the presence of 50  $\mu\text{M}$  2-APB (preincubated for 2-3 minutes). These differences were quantified as a reduction in the time required for the Ca<sup>2+</sup> transient to decrease by 70% from its maximal value ( $T_{70}$ ). Figure 1C shows the difference in the recovery time among the different experimental groups. Extracellular Ca<sup>2+</sup> entry also contributes to total peak amplitude that was smaller in Ca<sup>2+</sup>-free medium or with 2-APB (Figs. 1A, 1B).

To clearly distinguish between the two phases that contribute to Ca<sup>2+</sup> elevation, a second protocol was used, cell stimulation with 1  $\mu\text{M}$  BK in Ca<sup>2+</sup>-free conditions, which caused a transient increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> representing Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores. After the return to basal level,



**FIGURE 1.** Agonists linked to G<sub>q</sub>-coupled receptors activate a store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. (A) Representative Ca<sup>2+</sup> increase after BK (1  $\mu\text{M}$ ) application in a TM cell in control solution (1.3 mM Ca<sup>2+</sup>). In Ca<sup>2+</sup>-free conditions or in the presence of 2-APB (50  $\mu\text{M}$ ), the sustained phase of the Ca<sup>2+</sup> increase was greatly reduced. (B) Experiments similar to these are shown in (A) with endothelin-1 (ET-1, 0.1  $\mu\text{M}$ ). (C) Time to recover the 70% of the Ca<sup>2+</sup> increase as a measurement of the sustained Ca<sup>2+</sup> entry activated by each agonist in different experimental conditions ( $t$ -test, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  control vs. free Ca<sup>2+</sup> or 2-APB). Number of analyzed cells is shown inside the columns. (D) Ca<sup>2+</sup> add-back experiments: after stimulation with BK in Ca<sup>2+</sup>-free bath, Ca<sup>2+</sup> was reintroduced to measure store-activated Ca<sup>2+</sup> entry. 2-APB (50  $\mu\text{M}$ ) and SKF96395 (10  $\mu\text{M}$ ), nonselective blockers of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels, significantly inhibited extracellular Ca<sup>2+</sup> entry. (E) Extracellular Ca<sup>2+</sup> entry in control conditions compared with the increase in the presence of 2-APB, La<sup>3+</sup> (50  $\mu\text{M}$ ), or SKF96365. \*\*\* $P < 0.001$  vs. control.

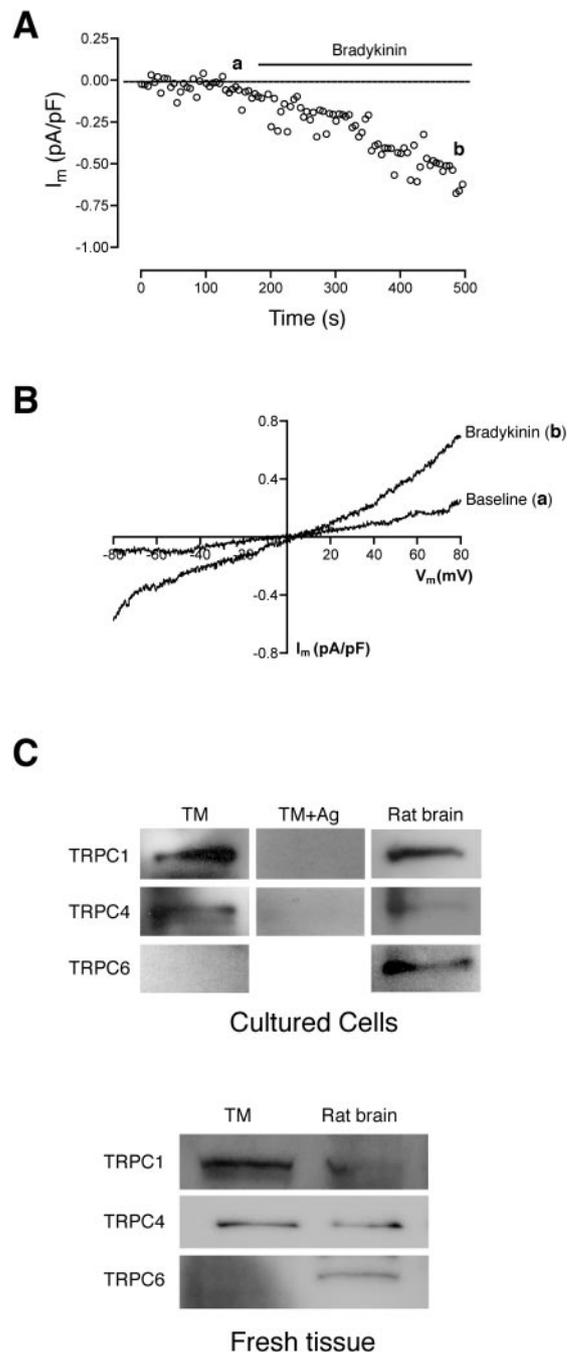
$\text{Ca}^{2+}$  reintroduction elicited a second peak resulting from  $\text{Ca}^{2+}$  entry through open membrane channels (Fig. 1D). This extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry could be partially inhibited in the presence of 2-APB and SKF96365 (54% and 60% respectively;  $P < 0001$ ), alleged blockers of several SOCs (Figs. 1D, 1E).<sup>35-37</sup>  $\text{La}^{3+}$  has also been described as a blocker of some of the channels that may contribute to  $\text{Ca}^{2+}$  entry. A slight decrease in the extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry was observed when tested, but it was not significant compared with the control (27%;  $P > 0.05$ ; Figure 1E).

We further investigated this extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathway by studying  $\text{Ca}^{2+}$  currents across the cell membrane using the perforated-patch configuration with recording solutions for SOC detection (10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  external solution). Whole-cell currents were recorded using voltage ramps from  $-100$  to  $+100$  mV applied every 5 seconds. Stimulation with BK ( $1 \mu\text{M}$ ) activated an inward current (Fig. 2A; mean of 10 cells) that slowly developed over several minutes ( $-0.53 \pm 0.18$  pA/pF at  $-80$  mV after 300 seconds). Current-to-voltage ( $I$ - $V$ ) relationships before (a) and after (b) BK stimulation are shown in Figure 2B. The current activated in the presence of BK increased at depolarized and hyperpolarized potentials compared with the baseline current, showed a slight inward rectification at hyperpolarized potentials, and presented a reversal potential near  $+6$  mV. These experiments were performed in the presence of tetraethyl ammonium (TEA; 10 mM) to block outward potassium currents that could be activated by depolarization (Fig. 2B). Similar  $I$ - $V$  curves were obtained in the absence of TEA, but larger outward currents were present probably because of the outflow of  $\text{K}^+$  or  $\text{Cs}^+$  ions (not shown). It has been reported that  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$  currents ( $I_{\text{CRAC}}$ ) show a prominent inward rectification and a very positive reversal potential close to  $+60$  mV.<sup>14</sup> A common observation in other cell types is the activation of  $I_{\text{CRAC}}$  currents together with other nonselective cation currents.<sup>38</sup> In this scenario,  $I$ - $V$  curves are almost linear with a slight inward rectification at hyperpolarized potentials, similar to the ones activated by BK in TM cells (Fig. 2B).

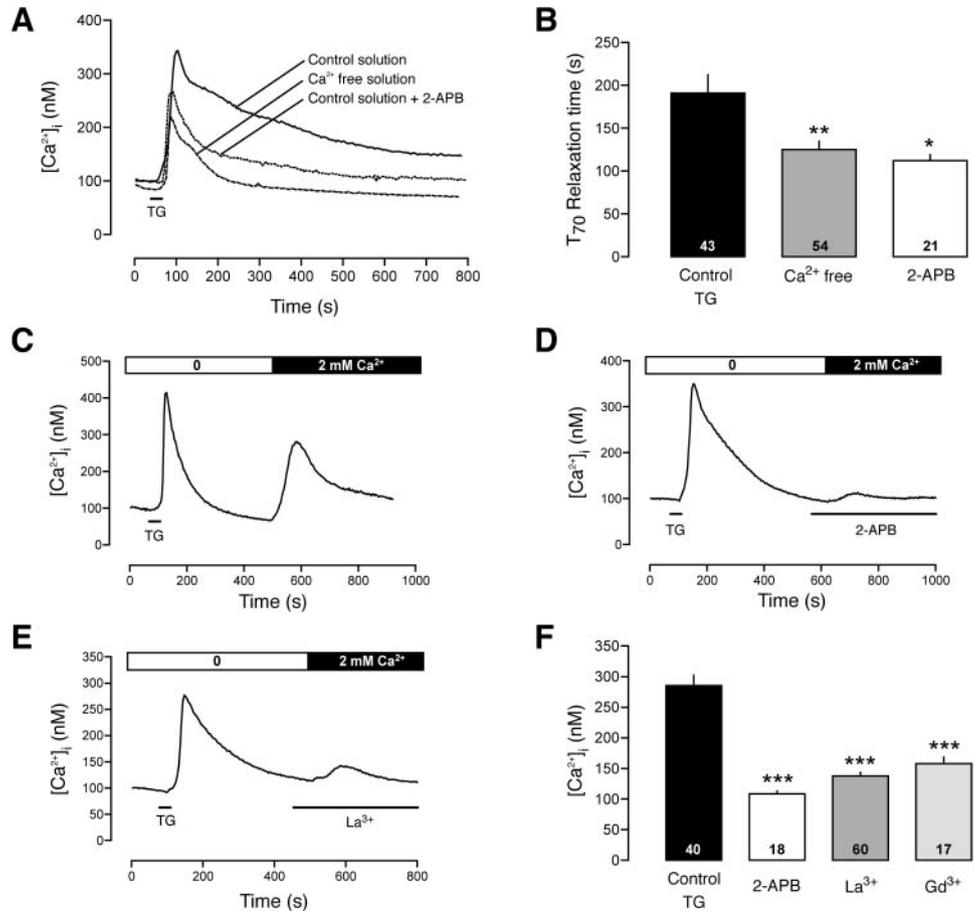
In addition to the electrophysiological recordings, the presence of putative nonselective cation currents was assessed by Western blot. Given that members of the canonical subfamily of TRP channels have been proposed to function as SOCs,<sup>21,22</sup> we tested for their presence in TM cells in culture. TRPC1 and TRPC4 proteins were detected, whereas TRPC6 levels were undetectable in bovine TM cells (Fig. 2C, upper panel). Protein bands were absent when antibodies were preincubated with their antigens. As a positive control, the same channel proteins were found in rat brain extracts. No clear bands were detected at the appropriate molecular weights for TRPC3 and TRPC5 with the antibodies used, though the presence of these channels in TM cells cannot be totally discarded. In addition to the studies in cultured cells, we also tested bovine TM tissue extracts for the presence of TRPC channels. In the native tissue, TRPC1 and TRPC4 were also found, but TRPC6 was not detected (Fig. 2C, lower panel).

### Store-Operated Calcium Entry in TM Cells

To study whether TM cells present a store-operated calcium entry activated by the depletion of intracellular stores without the participation of  $\text{G}_q$ -coupled receptors, we measured intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  transients activated by thapsigargin (TG), a blocker of the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase pump that depletes intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. TG ( $1 \mu\text{M}$ ) induced a  $\text{Ca}^{2+}$  increase in TM cells that lasted several minutes, with a  $T_{70}$  of  $190.8 \pm 21.2$  seconds (Figs. 3A, 3B). Again, a TG-induced  $\text{Ca}^{2+}$  increase was greatly reduced in  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution ( $T_{70} = 125.1 \pm 10$  seconds;  $P < 0.01$ ) or in the presence of  $50 \mu\text{M}$



**FIGURE 2.** Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  currents activated by BK. (A) In perforated patch experiments, application of BK ( $1 \mu\text{M}$ ) progressively activated extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry. Cells were clamped at 0 mV, and 500-ms ramps from  $-100$  to  $+100$  mV were applied every 5 seconds. Inward currents were measured at  $-80$  mV (mean curve of 10 cells is presented; SEM is omitted for clarity). (B) Current-to-voltage relationship for the experiments shown in (A) (a, b time points). Curves before (a; baseline) and during (b) BK application are shown. (C) Detection of TRP channels in cultured bovine TM cells and fresh tissue. *Upper:* total cell lysate proteins ( $2-4 \mu\text{g}$ ) were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-TRPC1, anti-TRPC4, and anti-TRPC6 (*upper left*). Results are representative of three experiments. *Upper middle:* antibodies were previously preincubated with their specific antigen (Ag). *Upper right:* positive controls were performed by assaying the same antibodies in total rat brain lysate proteins. *Lower:* similar experiments were performed using protein extracts from fresh bovine TM tissue.



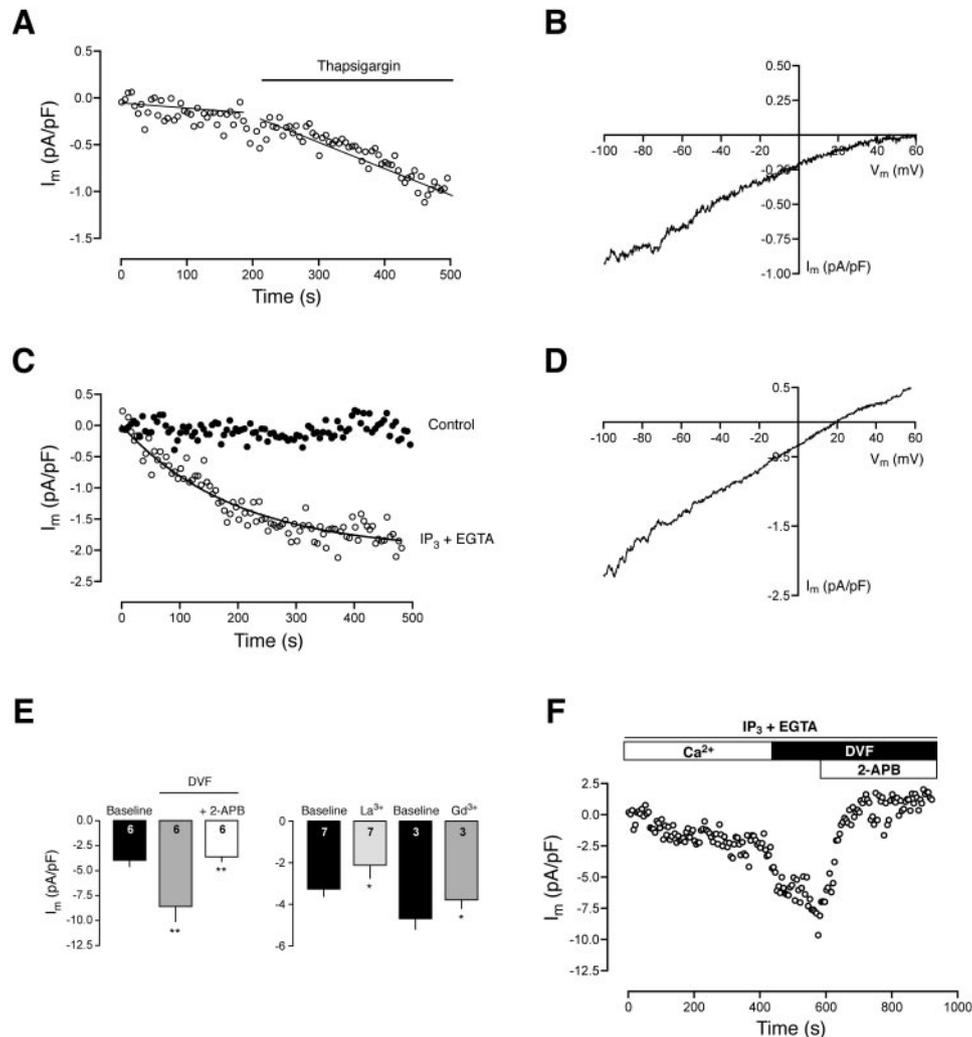
**FIGURE 3.** Store depletion activates a store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. **(A)** Representative Ca<sup>2+</sup> increase after TG (1  $\mu$ M) application in a TM cell in control solution (1.3 mM Ca<sup>2+</sup>). In Ca<sup>2+</sup>-free conditions or in the presence of 2-APB (50  $\mu$ M), the sustained phase of the Ca<sup>2+</sup> transient was greatly reduced. **(B)** Time to recover the 70% of the Ca<sup>2+</sup> increase as a measurement of the sustained Ca<sup>2+</sup> entry activated in each condition (*t*-test, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 control vs. free Ca<sup>2+</sup> or 2-APB). Number of analyzed cells is shown inside the columns. Ca<sup>2+</sup> add-back experiments: after stimulation with TG in Ca<sup>2+</sup>-free bath, Ca<sup>2+</sup> was reintroduced to measure store-activated Ca<sup>2+</sup> entry **(C)**. 2-APB (50  $\mu$ M; **D**) and SKF96395 (10  $\mu$ M; **E**), nonselective blockers of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels, significantly blocked the extracellular Ca<sup>2+</sup> entry. **(F)** Extracellular Ca<sup>2+</sup> entry in control conditions compared with the increase in the presence of 2-APB, La<sup>3+</sup> (20  $\mu$ M), or Gd<sup>3+</sup> (20  $\mu$ M). \*\*\**P* < 0.001 vs. control.

2-APB ( $T_{70} = 112.04 \pm 7.2$  seconds; *P* < 0.05), thus showing that the release of intracellular Ca<sup>2+</sup> in TM cells activated an extracellular Ca<sup>2+</sup> entry without the involvement of membrane receptors. To corroborate these findings, a protocol similar to the one previously used with BK was used here. In all the cells tested (*n* = 40), after an initial Ca<sup>2+</sup> transient in Ca<sup>2+</sup>-free medium, TG induced a second Ca<sup>2+</sup> increase when extracellular Ca<sup>2+</sup> was reintroduced (Fig. 3C). SOC blocker 2-APB and trivalent cations such as La<sup>3+</sup> and Gd<sup>3+</sup> have been reported to inhibit TG-activated Ca<sup>2+</sup> entry.<sup>14</sup> When we tested 2-APB at 50  $\mu$ M by incubating it just before reintroducing extracellular Ca<sup>2+</sup>, the second Ca<sup>2+</sup> peak was greatly blocked (62.1%; *P* < 0.001; *n* = 18; Figure 3D). Similar inhibitions were found when 20  $\mu$ M La<sup>3+</sup> or Gd<sup>3+</sup> were assayed (51.7% and 44.6%; *P* < 0.001; *n* = 60 and 17, respectively; Figs. 3E, 3F), which also indicated the presence of SOCs in the membranes of TM cells.

SOCs can be activated by any procedure that empties the intracellular Ca<sup>2+</sup> stores.<sup>14</sup> We used the whole-cell patch clamp technique to record the activated membrane currents using two different protocols to deplete intracellular stores. First, using the same protocol as experiments shown in Figure 2 and after recording baseline currents, cells were challenged with 1  $\mu$ M TG (+0.2 mM EGTA). When this drug was applied, a slowly developing inward current activated that was more prominent at hyperpolarized potentials ( $-1.11 \pm 0.20$  pA/pF at  $-80$  mV after 460 seconds; Fig. 4A; *n* = 6). This type of current is characteristic of CRAC channel activation, as described.<sup>39,40</sup> The I-V relationship showed a clear inward rectification, and the current asymptotically approached to zero at very positive voltages ( $> +60$  mV) without a clear reversal potential, which indicates a high selectivity for Ca<sup>2+</sup> (Fig. 4B).

In a series of parallel experiments, using a more physiological stimulus, Ca<sup>2+</sup> store depletion was achieved by dialyzing the cell with an intracellular solution containing 30  $\mu$ M IP<sub>3</sub> (+10 mM EGTA). Under these conditions and at  $-80$  mV, an inward current ( $-1.77 \pm 0.53$  pA/pF after 460 seconds; *n* = 6) activated in an exponential manner ( $\tau = 194$  seconds), lasting for several minutes until the end of the recording protocol (Fig. 4C). Interestingly, the I-V relationship was different from the one obtained in TG experiments: inward rectification was not as prominent, the current reversed at +19 mV, and the outward current was observed at depolarized potentials, though it was smaller than the inward current (Fig. 4D). This I-V relationship was similar to the one obtained when BK was used (Fig. 2). It may be that more than one conductance—probably I<sub>CRAC</sub> and nonselective cation channels—was activated, as described in other cell types.<sup>38</sup> Control recordings were carried out by omitting IP<sub>3</sub> from the pipette intracellular solution (+0.2 mM EGTA, as in TG experiments). Under these conditions, no current activation was observed ( $-0.16 \pm 0.20$  pA/pF; *n* = 5), further confirming that store depletion is required for activation of SOCs in TM cells (Fig. 4C, control).

An important characteristic of SOCs is their Ca<sup>2+</sup> selectivity, but in DVF, these channels become permeable to monovalent cations. We tested this feature by activating the current in the presence of IP<sub>3</sub> + EGTA (as in previous experiments) and then switching to a DVF. As reported in other cell types,<sup>41</sup> a 2.2-fold increase in the current was found in DVF (*P* < 0.01; Figure 4E left; see example in Fig. 4F) which was significantly blocked in the presence of 100  $\mu$ M 2-APB (58%; *P* < 0.01 vs. current in DVF). We also tested the blocking effects of trivalent cations on the activated current by applying La<sup>3+</sup> or Gd<sup>3+</sup> (100  $\mu$ M). A significant reduction in currents was observed for both



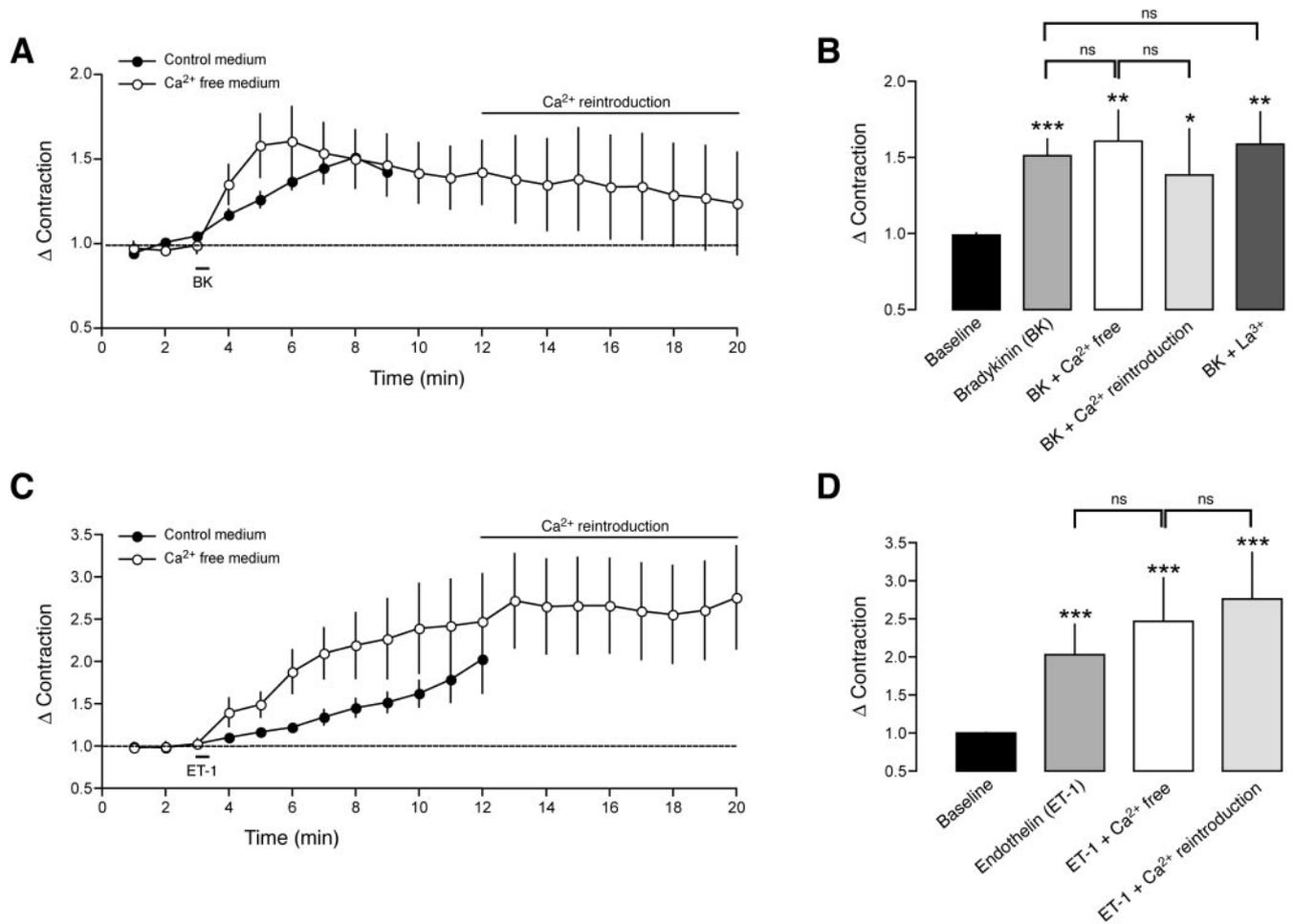
**FIGURE 4.** Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  currents activated by store depletion. (A) In whole-cell patch clamp experiments, application of TG ( $1 \mu\text{M}$ ) progressively activated extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry. Cells were clamped at  $0 \text{ mV}$ , and 500-ms ramps from  $-100$  to  $+100 \text{ mV}$  were applied every 5 seconds. Inward currents were measured at  $-80 \text{ mV}$  (mean curve of 6 cells is presented; SEM is omitted for clarity). (B) Current-to-voltage relationship for the experiments shown in (A) displays a clear inward rectification and very positive reversal potential that supports the presence of CRAC channels. (C) Whole-cell patch clamp experiments with  $30 \mu\text{M}$   $\text{IP}_3$  +  $10 \text{ mM}$  EGTA in the recording pipette. Cell dialysis with  $\text{IP}_3$  + EGTA activates an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry that is absent in control experiments in which  $\text{IP}_3$  was omitted ( $+0.2 \text{ mM}$  EGTA). Same experimental protocol used in (A). Mean curve of six cells ( $\text{IP}_3$  + EGTA) and five cells (control) is presented. SEM is omitted for clarity. (D) Current-to-voltage relationship for  $\text{IP}_3$  + EGTA experiments shown in (C) displays a slightly inward rectification with a reversal potential at  $+19 \text{ mV}$  that reflects the combination of CRAC currents together with nonselective cation currents. (E) Effects of different store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current blockers on  $\text{IP}_3$  + EGTA activated currents. *Left*: current was activated with the same protocol used in (C). After current activation, bath solution was replaced with a DVF. The increase in current magnitude in DVF conditions was blocked by 2-APB ( $100 \mu\text{M}$ ).  $**P < 0.01$  (baseline vs. DVF or DVF vs. 2-APB). *Right*:  $100 \mu\text{M}$   $\text{La}^{3+}$  or  $\text{Gd}^{3+}$  significantly blocked  $\text{IP}_3$  + EGTA activated currents.  $*P < 0.05$  (baseline vs.  $\text{La}^{3+}$  or  $\text{Gd}^{3+}$ ). (F) Representative experiment using the protocol described in (E, left).

cations ( $P < 0.05$ ; Fig. 4E, right) with  $\text{La}^{3+}$  more effective (35%) than  $\text{Gd}^{3+}$  (19%). These results further confirm that TM cells present SOC channels with characteristics of  $I_{\text{CRAC}}$  currents described in other cell types.<sup>14</sup>

### Contribution of Extracellular $\text{Ca}^{2+}$ Entry to TM Cellular Contraction

Several substances, such as BK, ET-1, or carbachol, induce cell or tissue contraction in the TM, which likely contributes to decreased outflow facility.<sup>6,31,42,43</sup> The contribution of extra-

cellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry after SOC activation was investigated by measuring single-cell contractions in culture using the traction microscopy technique that allows measurement of traction forces exerted by cells on a deformable substrate.<sup>28</sup> Therefore, we measured the force exerted by TM cells in culture before and after a BK or an ET-1 ( $1$  and  $0.1 \mu\text{M}$ , respectively) challenge. BK application induced a progressive increase in cell contraction that reached a maximum within 5 minutes (53% increase vs. baseline;  $P < 0.001$ ;  $n = 7$ ; Figs. 5A, 5B). A bigger contraction force was found when challenging cells with ET-1,



**FIGURE 5.** Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry is not necessary for cell contraction, but it modulates the process. **(A)** Increase in cell contraction after BK (1 μM) application in physiological solution (control medium; *n* = 7) or in Ca<sup>2+</sup>-free medium (*n* = 10). **(B)** Summary of effects on cell contraction: initial baseline is compared with the maximal contraction exerted in the presence of BK in control or Ca<sup>2+</sup>-free solution, after Ca<sup>2+</sup> reintroduction or in the presence of 100 μM La<sup>3+</sup> (*n* = 4). \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001 (baseline vs. each condition). Nonsignificant (ns) comparisons are also displayed. **(C)** Increase in cell contraction after endothelin-1 (0.1 μM; ET-1) application in physiological solution (control medium; *n* = 7) or in Ca<sup>2+</sup>-free medium (*n* = 6). **(D)** Summary of effects on cell contraction: initial baseline is compared with the maximal contraction exerted in the presence of ET-1 in control or Ca<sup>2+</sup>-free solution and after Ca<sup>2+</sup> reintroduction. \*\*\**P* < 0.001 (baseline vs. each condition). Nonsignificant (ns) comparisons are also displayed.

which induced a maximal 202% increase over baseline contraction (*P* < 0.001; *n* = 7; Figs. 5C, 5D). Interestingly, when Ca<sup>2+</sup> was omitted from the extracellular solution, the same drugs induced cell contractions that were even bigger and developed more quickly (compare contraction time-course in control and Ca<sup>2+</sup>-free medium in Figs. 5A and 5C). No differences were found between the baseline force values in the presence or in the absence of Ca<sup>2+</sup> (262.5 ± 48.2 vs. 235.4 ± 63; arbitrary units, *n* = 11 and *n* = 16 cells, respectively). These results show that extracellular Ca<sup>2+</sup> entry may not be necessary to achieve full TM cell contraction after stimulation with drugs through the G<sub>q</sub>-coupled receptors. In the same experiments performed in Ca<sup>2+</sup>-free medium, this ion was reintroduced at minute 12. In BK experiments and after Ca<sup>2+</sup> reintroduction, contraction was still increased compared with baseline (*P* < 0.05) and did not show statistical differences compared with the period in Ca<sup>2+</sup>-free conditions (Fig. 5B). Similar results were found in ET-1 experiments in which the reintroduction of Ca<sup>2+</sup> did not further modify cell contractions (Fig. 5D). Finally, we tested whether preincubation with 100 μM La<sup>3+</sup> (a blocker of I<sub>CRAC</sub> currents that did not significantly block BK-stimulated extracellular Ca<sup>2+</sup> entry [Figs. 1E, 3E, 3F, 4E]), was able to modify cell contraction in the presence of extracellular Ca<sup>2+</sup>.

As shown in Figure 5B, La<sup>3+</sup> did not reduce cell contraction, similar to what occurred in Ca<sup>2+</sup>-free medium.

## DISCUSSION

Results of this study demonstrate that TM cells activate two different types of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels in response to agonist-mediated G<sub>q</sub>-coupled receptor stimulation. The first SOC identified in TM cells shows electrophysiologic and pharmacologic characteristics of CRAC channels (Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels) after TG-induced store depletion (Figs. 4A, 4B).<sup>14,44</sup> Similarly, evidence for CRAC channels has also been reported in monkey TM cells after store depletion with TG.<sup>45</sup> Recently, molecular counterparts of CRAC channels have been identified as composed of Orai1 (the pore-forming unit) and STIM1 (the endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> sensor).<sup>16–19</sup> Heterologous expression of one of these proteins alone is insufficient to produce functionally active Ca<sup>2+</sup> currents, but their coexpression reconstitutes SOC function, which demonstrates that these two proteins are essential and sufficient components of CRAC currents.<sup>46</sup> Loss of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores promotes the mobilization of STIM1 close

to the cell surface, where it interacts with Orai1 and permits extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry.<sup>18,47</sup>

Interestingly, when store depletion in TM cells was stimulated by bradykinin or by cell dialysis with  $\text{IP}_3$  + EGTA, extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry appeared to be mediated by more than one current. Although CRAC currents show a clear inward rectification and almost no reversal potential (Fig. 4), activation of other nonselective currents with CRACs results in an almost linear I-V relationship, with the current reversing between +10 to +20 mV (Figs. 2B, 4D), as observed in other cell types.<sup>38</sup>  $\text{La}^{3+}$  results also indicate this because the blocking effect appears stronger on TG-mediated SOCs and weaker when SOC activation is mediated by agonist-receptor activation (Figs. 1, 3). In the latter situation, a more prominent activation of TRPs, which are less selective for  $\text{Ca}^{2+}$ , is assumed. It is conceivable that the nonblockable parts of the  $\text{Ca}^{2+}$  responses arose from the participation of different channels and not from differential blocker sensitivity of the channels. Several studies have proposed that members of the TRPC channel family behave as SOCs because their activation after stimulation of G-coupled membrane receptors produces an extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry.<sup>48–51</sup> TRPC1, TRPC4, and TRPC5 appear to be the most likely candidates to perform as SOCs, whereas TRPC3 and TRPC6 indirectly function as SOCs when they heteromultimerize with other TRPC channels.<sup>52</sup> In particular, TRPC1 and TRPC4 expression has been found in bovine TM cells (Fig. 2C), and the mRNA for TRPC4 and TRPC6 has recently been reported in porcine cells (Li G, et al. *IOVS* 2007;48: ARVO E-Abstract 2066), which supports the hypothesis that members of this family of channels are activated on store depletion or by means of the  $\text{G}_q$ -PLC-PKC pathway, thus behaving as SOCs. In fact, two recent reports link the activation of CRAC channels and TRPC channels by means of STIM1, which is able to interact with Orai1 and with TRPC1, TRPC4, and TRPC5 to determine their function as SOCs.<sup>20,52</sup> Therefore, a common mechanism stimulates different membrane channels (CRAC and TRPCs) to act as SOCs and permits the entry of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . Our electrophysiological and  $\text{Ca}^{2+}$  imaging results after BK application or cell dialysis with  $\text{IP}_3$  are in agreement with such a scenario. In addition to BK and ET-1, compounds such as ATP,<sup>7</sup> histamine,<sup>53</sup> and carbachol<sup>12</sup> among others, induce similar  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization involving SOCs. Unfortunately, channel characterization remains a challenge because specific blockers for each subtype of SOCs are lacking. The poor selectivity of the SOC blockers available did not allow us to reach strong conclusions about the channel subtypes present, but the differential effects of  $\text{La}^{3+}$ , depending on the SOC activator, can reflect the different pharmacologic profiles of the channels involved, namely CRACs and TRPCs. Nevertheless, care should be taken when interpreting the results reported because, despite the proved effect in different SOC channels,<sup>35,37</sup> 2-APB has inhibitory effects on currents through connexins<sup>54</sup> and  $\text{IP}_3$  receptors. In addition, SKF96365 is widely used to study SOC-mediated currents but is selectivity limited.<sup>36</sup> In the present study, though we used the minimum concentration necessary and short incubation times to minimize the poor selectivity of these compounds, undesired side effects could not be completely ruled out.

Although the initial function proposed for store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry was to replenish emptied stores, it was later involved in other cellular processes.<sup>44</sup> In addition, store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry has been linked to agonist-induced cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, which in turn encode information to evoke cellular responses, including exocytosis, mitochondrial ATP production, and gene transcription.<sup>55</sup> Interestingly,  $\text{Ca}^{2+}$  entry through SOCs, but not  $\text{Ca}^{2+}$  release from the endoplasmic reticulum, is an effective regulator of  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive adenylyl cyclase, suggesting that an intimate spatial relationship be-

tween SOCs and these enzymes must exist.<sup>56</sup> Similar results have been found for endothelial nitric oxide synthase in COS-7 cells<sup>57</sup> and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent phospholipase  $\text{A}_2$  in mast cells, where local  $\text{Ca}^{2+}$  entry through CRAC channels triggers arachidonic acid production and leukotriene  $\text{C}_4$  secretion.<sup>58</sup> Finally,  $\text{Ca}^{2+}$  entry in nonexcitable cells is an important signal to activate cell growth and proliferation, thus regulating gene transcription through a variety of transcription factors, including NFAT, NF $\kappa$ B, and AP-1 and early genes such as *c-fos*.<sup>58,59</sup>

Another important cellular event linked to  $\text{Ca}^{2+}$  is cell contraction.<sup>15</sup> This is especially important in the TM because contractile tone equilibrium is an important regulator of outflow facility.<sup>3</sup> To assess the role of receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry on TM cells, we studied cellular contraction by using traction microscopy, a cellular technique that allows the measurement of contractile forces exerted by a cell attached to a deformable substrate.<sup>28</sup> Our results show that TM cells contract in response to BK or ET-1, as previously reported.<sup>6,31,42,43</sup> Interestingly, the release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is sufficient to induce agonist-mediated cell contraction because contraction can be elicited in the absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 5), thus confirming previous results found in whole tissue.<sup>31,60</sup> Similar effects were reported with muscarinic agonists in TM strips, though in the total absence of  $\text{Ca}^{2+}$  (extra and intracellular), carbachol was unable to contract the tissue.<sup>31</sup> Nevertheless, even in the total absence of  $\text{Ca}^{2+}$ , the phorbol ester phorbol 12-myristate 13-acetate (but not carbachol) is still able to slightly contract the cells,<sup>60</sup> an effect that can be blocked with a Y-27632, a Rho-kinase inhibitor.

A growing body of evidence has shown that the Rho/Rho-kinase pathway is involved in TM cell contraction and outflow facility regulation.<sup>9,43,60–62</sup> Agonists such as ET-1, thromboxane  $\text{A}_2$  mimetics, and angiotensin II induce myosin light chain (MLC) phosphorylation in TM cells through the activation of Rho GTPase.<sup>9</sup> It appears clear that many external factors, after interacting with G-protein-coupled receptors, regulate the activity of Rho/Rho-kinase pathway and other intracellular mechanisms, such as  $\text{Ca}^{2+}$ , to influence the phosphorylation status of MLC and, therefore, the contractile state of the outflow pathway, as has been demonstrated for ET-1.<sup>9</sup> By comparing the time-course of cell contraction in the presence or absence of  $\text{Ca}^{2+}$  (Figs. 5A, 5C), it appears that extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry is not necessary for cell contraction but modulates this process probably by promoting the release of relaxing substances such as NO, as described in other cells.<sup>65</sup> Relaxing mechanisms would, therefore, counterbalance the contraction process triggered by the agonist. As previously mentioned,  $\text{Ca}^{2+}$  entry through SOCs has been shown to activate adenylyl cyclases, NO synthase, or  $\text{PLA}_2$ , which contributes to the relaxing effects.<sup>56</sup> Among the possible mechanisms possibly activated, cAMP or cGMP production has been shown to relax TM cells and to increase outflow facility.<sup>64–67</sup> In fact, in addition to increasing TM cell intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , BK induces the production of  $\text{PGE}_2$ <sup>68,69</sup> and enhances the effect of  $\text{PGE}_2$  on cAMP production.<sup>70</sup> It seems plausible that cAMP production is enhanced by extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry stimulation of adenylyl cyclase, as reported in other cell types.<sup>56</sup> Interestingly, BK effects on outflow facility appear to be biphasic, with an initial acute decrease<sup>6</sup> followed by a slowly developing and prolonged increase of outflow facility.<sup>71</sup> Again, extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry induced by BK may be involved in  $\text{PGE}_2$  production, which mediates the increase in outflow facility. Other relaxing effects may be also activated by extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  entry through SOCs. In particular,  $\text{Ca}^{2+}$ -activated potassium channels are activated by several second messengers in TM cells as a mechanism to prevent excessive cell contraction.<sup>7,27,65,72</sup> Therefore, sustained  $\text{Ca}^{2+}$  entry activates these channels together with other mechanisms to reduce tissue contractility, as

shown in human vascular endothelial cells in which Ca<sup>2+</sup> store depletion and extracellular Ca<sup>2+</sup> entry are required to trigger NO production by histamine or ATP.<sup>73</sup> This process is tightly regulated by Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels, which are essential for NO-mediated vasorelaxation.<sup>73</sup> Therefore, receptor- and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry may not be necessary for cell contraction in TM cells but may contribute to modulate cell contractility or to release different substances that regulate outflow facility as a local homeostatic mechanism. Future experiments will test this hypothesis and whether these mechanisms may be pathologically altered by chronic exposure to ET-1, TGF- $\beta$ , or substances elevated in glaucoma.

## References

- Llobet A, Gasull X, Gual A. Understanding trabecular meshwork physiology: a key to the control of intraocular pressure? *News Physiol Sci.* 2003;18:205-209.
- Weinreb RN, Khaw PT. Primary open-angle glaucoma. *Lancet.* 2004;363:1711-1720.
- Wiederholt M, Thieme H, Stumpff F. The regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Prog Retin Eye Res.* 2000;19:271-295.
- Lepple-Wienhues A, Rauch R, Clark AF, Grassmann A, Berweck S, Wiederholt M. Electrophysiological properties of cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res.* 1994;59:305-311.
- Wiederholt M, Bielka S, Schweig F, Lutjen-Drecoll E, Lepple-Wienhues A. Regulation of outflow rate and resistance in the perfused anterior segment of the bovine eye. *Exp Eye Res.* 1995;61:223-234.
- 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.
- Soto D, Comes N, Ferrer E, et al. Modulation of aqueous humor outflow by ionic mechanisms involved in trabecular meshwork cell volume regulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:3650-3661.
- Erickson-Lamy K, Korbmacher C, Schuman JS, Nathanson JA. Effect of endothelin on outflow facility and accommodation in the monkey eye in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32:492-495.
- Rao PV, Deng P, Sasaki Y, Epstein DL. Regulation of myosin light chain phosphorylation in the trabecular meshwork: role in aqueous humor outflow facility. *Exp Eye Res.* 2005;80:197-206.
- Lepple-Wienhues A, Stahl F, Wiederholt M. Differential smooth muscle-like contractile properties of trabecular meshwork and ciliary muscle. *Exp Eye Res.* 1991;53:33-38.
- Wiederholt M, Schafer R, Wagner U, Lepple-Wienhues A. Contractile response of the isolated trabecular meshwork and ciliary muscle to cholinergic and adrenergic agents. *Ger J Ophthalmol.* 1996;5:146-153.
- Shade DL, Clark AF, Pang IH. Effects of muscarinic agents on cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res.* 1996;62:201-210.
- Tao W, Prasanna G, Dimitrijevic S, Yorio T. Endothelin receptor A is expressed and mediates the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> mobilization of cells in human ciliary smooth muscle, ciliary nonpigmented epithelium, and trabecular meshwork. *Curr Eye Res.* 1998;17:31-38.
- Parekh AB, Putney JW Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 2005;85:757-810.
- Berridge MJ. Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:1-21.
- Zhang SL, Yu Y, Roos J, et al. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature.* 2005;437:902-905.
- Vig M, Peinelt C, Beck A, et al. CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science.* 2006;312:1220-1223.
- Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature.* 2006;443:230-233.
- Yeromin AV, Zhang SL, Jiang W, Yu Y, Safrina O, Cahalan MD. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature.* 2006;443:226-229.
- Huang GN, Zeng W, Kim JY, et al. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol.* 2006;8:1003-1010.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:619-647.
- Ambudkar IS. Ca<sup>2+</sup> signaling microdomains: platforms for the assembly and regulation of TRPC channels. *Trends Pharmacol Sci.* 2006;27:25-32.
- Mehta D, Ahmmed GU, Paria BC, et al. RhoA interaction with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and transient receptor potential channel-1 regulates Ca<sup>2+</sup> entry: role in signaling increased endothelial permeability. *J Biol Chem.* 2003;278:33492-33500.
- Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 2006;86:279-367.
- Singh I, Knezevic N, Ahmmed GU, Kini V, Malik AB, Mehta D. G $\alpha$  q-TRPC6-mediated Ca<sup>2+</sup> entry induces RhoA activation and resultant endothelial cell shape change in response to thrombin. *J Biol Chem.* 2007;282:7833-7843.
- 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.
- Gasull X, Ferrer E, Llobet A, et al. 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.* 2003;44:706-714.
- Gavara N, Sunyer R, Roca-Cusachs P, Farre R, Rotger M, Navajas D. Thrombin-induced contraction in alveolar epithelial cells probed by traction microscopy. *J Appl Physiol.* 2006;101:512-520.
- Pelham RJ Jr, Wang Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:13661-13665.
- Karl MO, Fleischhauer JC, Stamer WD, et al. Differential P1-purergic modulation of human Schlemm's canal inner-wall cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288:C784-C794.
- Lepple-Wienhues A, Stahl F, Willner U. Endothelin-evoked contractions in bovine ciliary muscle and trabecular meshwork: interaction with calcium, nifedipine and nickel. *Curr Eye Res.* 1991;10:983-989.
- Kohmoto H, Matsumoto S, Serizawa T. Effects of endothelin-1 on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and pHi in trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res.* 1994;13:197-202.
- Lepple-Wienhues A, Stahl F, Wunderling D, Wiederholt M. Effects of endothelin and calcium channel blockers on membrane voltage and intracellular calcium in cultured bovine trabecular meshwork cells. *Ger J Ophthalmol.* 1992;1:159-163.
- Soto D, Pintor J, Peral A, Gual A, Gasull X. Effects of dinucleoside polyphosphates on trabecular meshwork cells and aqueous humor outflow facility. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314:1042-1051.
- Zhou H, Iwasaki H, Nakamura T, et al. 2-Aminoethyl diphenylborinate analogues: selective inhibition for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352:277-282.
- Merritt JE, Armstrong WP, Benham CD, et al. SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry. *Biochem J.* 1990;271:515-522.
- Xu SZ, Zeng F, Boulay G, Grimm C, Harteneck C, Beech DJ. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. *Br J Pharmacol.* 2005;145:405-414.
- Hogan PG, Rao A. Dissecting ICRCAC, a store-operated calcium current. *Trends Biochem Sci.* 2007;32:235-245.
- Fierro L, Parekh AB. On the characterisation of the mechanism underlying passive activation of the Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> current ICRCAC in rat basophilic leukaemia cells. *J Physiol.* 1999;520 Pt 2:407-416.
- Parekh AB. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J Physiol.* 2003;547:333-348.
- Bakowski D, Parekh AB. Permeation through store-operated CRAC channels in divalent-free solution: potential problems and implica-

- tions for putative CRAC channel genes. *Cell Calcium*. 2002;32:379-391.
42. Thieme H, Schimmat C, Munzer G, et al. Endothelin antagonism: effects of FP receptor agonists prostaglandin F2alpha and fluprostenol on trabecular meshwork contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:938-945.
  43. Rosenthal R, Choritz L, Schlott S, et al. Effects of ML-7 and Y-27632 on carbachol- and endothelin-1-induced contraction of bovine trabecular meshwork. *Exp Eye Res*. 2005;80:837-845.
  44. Parekh AB. Functional consequences of activating store-operated CRAC channels. *Cell Calcium*. 2007;42:111-121.
  45. Shimura M, Yasuda K, Nakzawa T, Kashiwagi K. The effect of unoprostone isopropyl on Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> currents in cultured monkey trabecular meshwork cells and ciliary muscle cells. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2006;22:219-226.
  46. Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem*. 2006;281:20661-20665.
  47. Smyth JT, Dehaven WI, Jones BF, et al. Emerging perspectives in store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763:1147-1160.
  48. Ambudkar IS. TRPC1: a core component of store-operated calcium channels. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:96-100.
  49. Ong HL, Cheng KT, Liu X, et al. Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx: evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J Biol Chem*. 2007;282:9105-9116.
  50. Peppiatt-Wildman CM, Albert AP, Saleh SN, Large WA. Endothelin-1 activates a Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channel with TRPC3 and TRPC7 properties in rabbit coronary artery myocytes. *J Physiol*. 2007;580:755-764.
  51. Paria BC, Bair AM, Xue J, Yu Y, Malik AB, Tiruppathi C. Ca<sup>2+</sup> influx induced by protease-activated receptor-1 activates a feed-forward mechanism of TRPC1 expression via nuclear factor-kappaB activation in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2006;281:20715-20727.
  52. Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol*. 2007;9:636-645.
  53. WoldeMussie E, Ruiz G. Effect of histamine on signal transduction in cultured human trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res*. 1992;11:987-995.
  54. Tao L, Harris AL. 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits channels composed of connexin26 and/or connexin32. *Mol Pharmacol*. 2007;71:570-579.
  55. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:517-529.
  56. Cooper DM, Karpen JW, Fagan KA, Mons NE. Ca(2+)-sensitive adenylyl cyclases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 1998;32:23-51.
  57. Lin S, Fagan KA, Li KX, Shaul PW, Cooper DM, Rodman DM. Sustained endothelial nitric-oxide synthase activation requires capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *J Biol Chem*. 2000;275:17979-17985.
  58. Chang WC, Nelson C, Parekh AB. Ca<sup>2+</sup> influx through CRAC channels activates cytosolic phospholipase A2, leukotriene C4 secretion, and expression of c-fos through ERK-dependent and -independent pathways in mast cells. *FASEB J*. 2006;20:2381-2383.
  59. Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*. 1998;392:933-936.
  60. Thieme H, Nuskovski M, Nass JU, Pleyer U, Strauss O, Wiederholt M. Mediation of calcium-independent contraction in trabecular meshwork through protein kinase C and rho-A. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:4240-4246.
  61. Rao PV, Deng PF, Kumar J, Epstein DL. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:1029-1037.
  62. Tian B, Kaufman PL. Effects of the Rho kinase inhibitor Y-27632 and the phosphatase inhibitor calyculin A on outflow facility in monkeys. *Exp Eye Res*. 2005;80:215-225.
  63. Zhang W, Meng H, Li ZH, Shu Z, Ma X, Zhang BX. Regulation of STIM1, store-operated Ca<sup>2+</sup> influx, and nitric oxide generation by retinoic acid in rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292:F1054-F1064.
  64. Kee C, Kaufman PL, Gabelt BT. Effect of 8-Br cGMP on aqueous humor dynamics in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:2769-2773.
  65. 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.
  66. Wiederholt M, Sturm A, Lepple-Wienhues A. Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:2515-2520.
  67. Gilbert R, Gasull X, Pales J, Belmonte C, Bergamini MV, Gual A. Facility changes mediated by cAMP in the bovine anterior segment in vitro. *Vision Res*. 1997;37:9-15.
  68. Polansky JR, Kurtz RM, Alvarado JA, Weinreb RN, Mitchell MD. Eicosanoid production and glucocorticoid regulatory mechanisms in cultured human trabecular meshwork cells. *Prog Clin Biol Res*. 1989;312:113-138.
  69. Weinreb RN, Mitchell MD. Prostaglandin production by cultured cynomolgus monkey trabecular meshwork cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1989;36:97-100.
  70. Webb JG, Shearer TW, Yates PW, Mukhin YV, Crosson CE. Bradykinin enhancement of PGE2 signalling in bovine trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res*. 2003;76:283-289.
  71. Webb JG, Husain S, Yates PW, Crosson CE. Kinin modulation of conventional outflow facility in the bovine eye. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2006;22:310-316.
  72. Stumpff F, Boxberger M, Krauss A, et al. Stimulation of cannabinoid (CB1) and prostanoid (EP2) receptors opens BKCa channels and relaxes ocular trabecular meshwork. *Exp Eye Res*. 2005;80:697-708.
  73. Sheng JZ, Braun AP. Small and intermediate conductance, Ca-activated K<sup>+</sup> channels directly control agonist-evoked nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293:C458-C467.