



**DEPARTAMENT DE CIÈNCIES FISIOLÒGIQUES I
LABORATORI DE NEUROFISIOLOGIA**

TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LA
SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA
EN LA RED TRABECULAR**

**DAVID SOTO DEL CERRO
2005**

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efectos del ATP sobre el Ca^{2+} intracelular

En primer lugar, se evaluó el método de aplicación de sustancias sobre las células trabeculares y como éste podía afectar a los niveles de Ca^{2+} intracelular. Para ello en el grupo control ($n=275$ células) se añadió una cantidad de tampón de lectura (vehículo) de $10 \mu\text{l}$ en la cámara de registro con el fin de conocer la respuesta espontánea en el Ca^{2+} intracelular debido a las manipulaciones propias de la técnica. Los niveles basales de Ca^{2+} intracelular en este grupo de células fueron de 64 ± 5 nM (media \pm desviación estándar; $n=275$). De esta forma, el porcentaje de respuesta espontánea fue del 3 %, obteniéndose respuestas significativas en 7 de las 275 células estudiadas (Tabla 4.1)

La adenosina 5'-trifosfato (ATP) es un ligando natural de los receptores purinérgicos pudiendo activar la gran mayoría de los subtipos de receptores purinérgicos (Ralevic, 1998). Así pues, se probó el efecto del agonista purinérgico ATP sobre las células trabeculares para estudiar si se producían variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y, en caso positivo, la dinámica de estas variaciones. Sobre las células trabeculares bovinas (BTMs) se estudió el efecto del ATP en el rango de 10^{-13} a 10^{-4} M. El porcentaje de células que respondieron a la aplicación de ATP incrementando su concentración basal de Ca^{2+} en más del doble fue del 99 % para las concentraciones entre 10^{-6} y 10^{-4} M. A concentraciones entre 10^{-9} y 8×10^{-7} M la respuesta varió entre 11% y 98%. (Tabla 4.1) El porcentaje de respuesta tras la estimulación con ATP sigue una curva dosis respuesta sigmoidea con una EC_{50} de 2.64×10^{-8} M (Figura 4.1A). En la Figura 4.2 se muestran las variaciones típicas en la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) tras la estimulación con ATP a la concentración de 10^{-6} M. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ incrementa rápidamente y el pico máximo se produce dentro de los 8 segundos siguientes a la estimulación. Después de este pico inicial se produce un lento descenso a los valores basales. Los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ siguen una curva dosis respuesta con un incremento máximo de 509 ± 17 nM (Figura 4.1B).

Es interesante resaltar que durante el tiempo de experimento en el que se monitorizaron las variaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la aplicación de ATP a diferentes concentraciones (10^{-8} y 10^{-4} M), las células trabeculares mostraron un patrón de segundos picos transcurridos entre 5 y 7 minutos del primer pico (Figura 4.3). A la concentración de

10^{-6} M un 76% de las células (236 de 311) presentaron como mínimo un segundo pico de calcio.

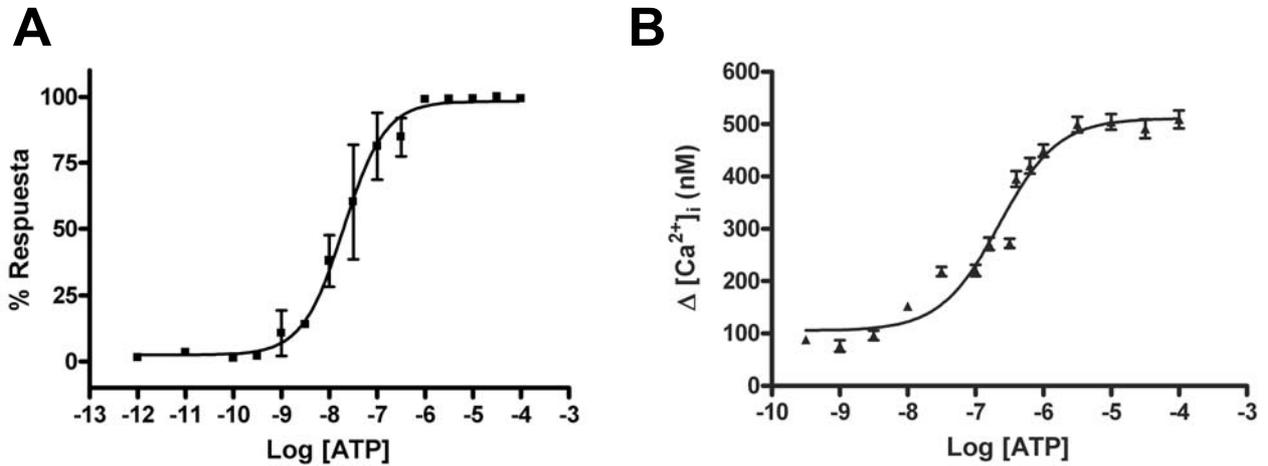


Figura 4.1. Curvas dosis-respuesta para el agonista ATP en células trabeculares bovinas (BTMs). En **A** se muestra el porcentaje de respuesta en ordenadas frente al logaritmo de la concentración utilizada en abcisas. En **B** se muestran en ordenadas los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ en nM respecto al basal producidos por el agonista ATP respecto al logaritmo de las diferentes concentraciones en abcisas.

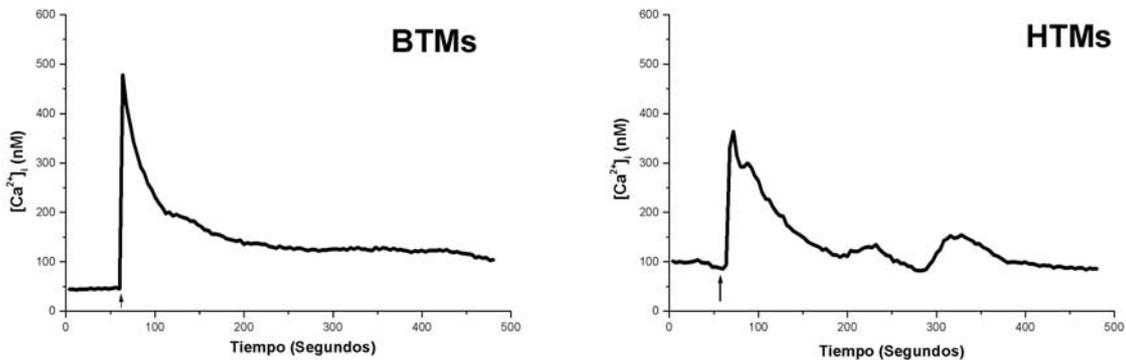


Figura 4.2. Movilizaciones del $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a ATP 10^{-6} M en células trabeculares bovinas (BTMs; gráfica izquierda) y humanas (HTMs; gráfica de la derecha). En ordenadas se muestra la concentración de calcio en nM mientras que en abcisas se muestra el tiempo en segundos. La flecha indica el lugar de aplicación de la droga.

La aplicación de ATP sobre células trabeculares humanas (HTMs) provocó un máximo de respuesta del 81 % (43 células de 53) a la concentración de 5×10^{-4} M mientras que a concentraciones inferiores a 10^{-6} M el porcentaje de respuesta fue nulo (Tabla 4.2). La cinética en los cambios del $[Ca^{2+}]_i$ fue igual a la mostrada por las células bovinas, con

un aumento rápido de la $[Ca^{2+}]_i$ y un disminución sostenida (Figura 4.2B). A la concentración de $10^{-6}M$, concentración mínima a la cual respondieron las células HTMs, la cantidad de Ca^{2+} movilizada fue de 300 ± 34 nM.

Tabla 4.1. Efecto del ATP sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en células trabeculares bovinas en cultivo.

| [ATP] | Nº Respuestas / células analizadas | % respuesta | $[Ca^{2+}]_i$ basal (nmol/L) | $\Delta[Ca^{2+}]_i$ máximo (nmol/L) |
|-----------------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------|---|
| Control (Vehículo) | 7/275 | 3% | 64 ± 5 | 108 ± 20 |
| 10^{-13} M | 1/71 | 1% | 80 ± 8 | 81 |
| 10^{-12} M | 1/67 | 1% | 77 ± 12 | 220 |
| 10^{-11} M | 3/72 | 4% | 70 ± 20 | 115 ± 6 |
| 10^{-10} M | 2/122 | 2% | 76 ± 6 | 147 |
| 5×10^{-10} M | 2/105 | 2% | 59 ± 6 | 88 |
| 10^{-9} M | 11/96 [§] | 11% | 68 ± 8 | 76 ± 11 |
| 5×10^{-9} M | 10/74 [§] | 14% | 72 ± 14 | 96 ± 9 |
| 10^{-8} M | 109/304 ^{§§} | 36% | 84 ± 8 | 152 ± 6 |
| 5×10^{-8} M | 103/149 ^{§§} | 69% | 106 ± 19 | $218 \pm 9^{\text{¶}}$ |
| 10^{-7} M | 97/139 ^{§§} | 70% | 87 ± 12 | $220 \pm 11^{\text{¶}}$ |
| 2×10^{-7} M | 132/187 ^{§§} | 71% | 65 ± 5 | $271 \pm 12^{\text{¶}}$ |
| 5×10^{-7} M | 221/254 ^{§§} | 87% | 83 ± 6 | $272 \pm 9^{\text{¶}}$ |
| 6×10^{-7} M | 125/128 ^{§§} | 98% | 68 ± 12 | $395 \pm 15^{\text{¶¶}}$ |
| 8×10^{-7} M | 155/165 ^{§§} | 94% | 68 ± 3 | $420 \pm 15^{\text{¶¶}}$ |
| 10^{-6} M | 311/315 ^{§§} | 99% | 64 ± 8 | $449 \pm 12^{\text{¶¶}}$ |
| 5×10^{-6} M | 113/114 ^{§§} | 99% | 66 ± 4 | $499 \pm 15^{\text{¶¶}}$ |
| 10^{-5} M | 128/129 ^{§§} | 99% | 62 ± 9 | $504 \pm 15^{\text{¶¶}}$ |
| 5×10^{-5} M | 79/79 ^{§§} | 100% | 66 ± 2 | $491 \pm 18^{\text{¶¶}}$ |
| 10^{-4} M | 82/83 ^{§§} | 99% | 79 ± 9 | $509 \pm 17^{\text{¶¶}}$ |

Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. Los picos de $[Ca^{2+}]_i$ se consideraron significativos cuando alcanzaron al menos dos veces los valores basales. Las comparaciones entre la proporción de células que respondieron en el grupo control y en los grupos tratados con ATP ([§]) se hicieron usando un test de Fisher donde ([§]) $p < 0.05$ y (^{§§}) $p < 0.001$. Las comparaciones entre la medida del pico de $[Ca^{2+}]_i$ mostrado por las células trabeculares en el grupo control y los grupos tratados con ATP ([¶]) se hicieron usando una t de Student desapareada donde ([¶]) $p < 0.01$, (^{¶¶}) $p < 0.001$.

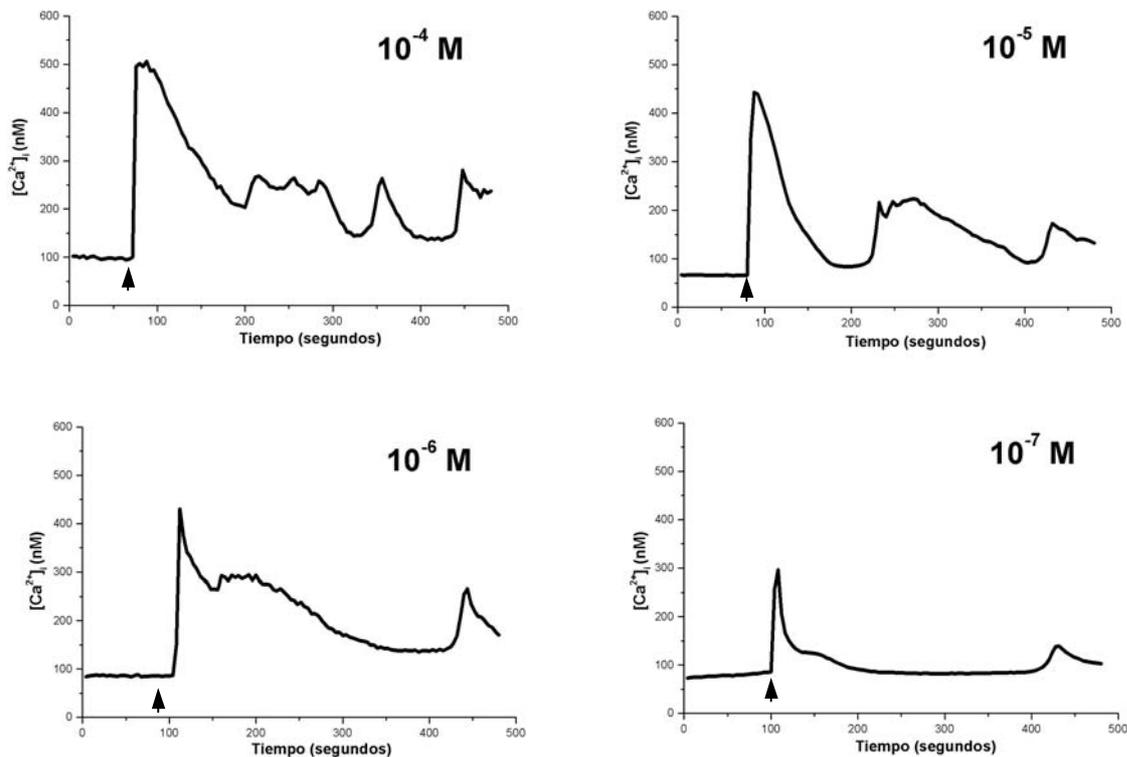


Figura 4.3. Movilizaciones del $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a diferentes concentraciones de ATP donde se puede apreciar la aparición de segundos picos y oscilaciones de calcio entre 3 y 5 minutos después del primer pico. En ordenadas se muestra la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ en nM mientras que en abcisas se muestra el tiempo en segundos. La flecha en cada una de las gráficas muestra el punto donde se aplicó la droga.

Tabla 4.2. Efecto del ATP en el rango 10^{-8} y 10^{-4} M sobre el $[Ca^{2+}]_i$ en células trabeculares humanas en cultivo.

| [ATP] | Nº Respuestas / células analizadas | % respuesta | $[Ca^{2+}]_i$ basal (nmol/L) | $[Ca^{2+}]_i$ máximo (nmol/L) |
|----------------------|------------------------------------|-------------|------------------------------|-------------------------------|
| Control (Vehículo) | 0/46 | 0% | 92 ± 5 | - |
| 10^{-8} M | 0/33 | 0% | 107 ± 3 | - |
| 10^{-7} M | 0/235 | 0% | 109 ± 10 | - |
| 10^{-6} M | 9/60 [§] | 15% | 82 ± 13 | 301 ± 34 |
| 10^{-5} M | 51/249 ^{§§} | 20% | 104 ± 6 | 285 ± 9 |
| 10^{-4} M | 14/46 ^{§§} | 30% | 124 ± 8 | 300 ± 34 |
| 5×10^{-4} M | 43/53 ^{§§} | 81% | 118 ± 19 | 611 ± 59 |
| 10^{-3} M | 49/64 ^{§§} | 77% | 109 ± 5 | 763 ± 84 |

Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. Los picos de $[Ca^{2+}]_i$ se consideraron significativos la alcanzar dos veces los valores basales. Las comparaciones entre % de células que respondieron en el grupo control y en los grupos tratados ([§]) se hicieron usando un test de Fisher donde ([§]) $p < 0.05$ y (^{§§}) $p < 0.001$.

4.2. Caracterización farmacológica

Una vez comprobados los efectos del ATP sobre la $[Ca^{2+}]_i$, se planteó averiguar el subtipo de receptores purinérgicos presentes en las células trabeculares. Para ello se realizaron experimentos de monitorización del Ca^{2+} intracelular tras la aplicación de diferentes agonistas o antagonistas purinérgicos.

4.2.1. Efecto de agonistas sobre el Ca^{2+} intracelular

γ,γ -methylene ATP y γ,γ -methylene ATP

En la caracterización farmacológica de los receptores purinérgicos de las células trabeculares se probó, en primer lugar, el efecto de dos agonistas de receptores ionotrópicos (P2X) como son el $\Omega\Omega$ -methylene ATP ($\Omega\Omega$ meATP) y $\Omega\Omega$ -methylene ATP ($\Omega\Omega$ meATP) sobre las células BTMs a la concentración de 10^{-6} M. A dicha concentración, el porcentaje de respuesta para el $\Omega\Omega$ meATP fue del 2% (2 células de 101; Figura 4.4), siendo la respuesta para el $\Omega\Omega$ meATP también del 2% (3 células de 180; Figura 4.4). Las elevaciones de $[Ca^{2+}]_i$ en las células que respondieron fueron de 135 nM y 252 ± 83 nM para el $\Omega\Omega$ meATP y el $\Omega\Omega$ meATP respectivamente (Tabla 4.3).

Sobre las células trabeculares humanas (HTMs) el compuesto $\Omega\Omega$ meATP a la concentración de 10^{-6} M no causó respuesta (0 células de 49) ni por tanto movilización de la $[Ca^{2+}]_i$. Estos resultados parecen mostrar que las células trabeculares tanto humanas como bovinas no expresan receptores purinérgicos ionotrópicos.

Otros nucleótidos trifosfato: ATP- γ -S, UTP y 2-MeSATP

Para la caracterización de los posibles receptores metabotrópicos P2Y presentes en las células trabeculares se utilizaron una serie de nucleótidos trifosfato en cuanto a su habilidad para movilizar el $[Ca^{2+}]_i$ como son la uridina 5'-trifosfato (UTP), la adenosina 5'-O-(3-thiotrifosfato) (ATP- Ω S) y la 2-methylthio adenosina 5'-trifosfato (2-MeS-ATP). El nucleótido trifosfato UTP se muestra como buen agonista de ciertos receptores P2Y, como el P2Y₂, el P2Y₄ o el P2Y₁₁. El derivado ATP- Ω S es un buen agonista P2Y₂, que se

muestra inactivo sobre receptores P2Y₄ (Wildman, 2003), facilitando de esta manera la distinción entre estos dos tipos de receptor. Por su parte, el 2-MeS-ATP es un buen agonista del receptor P2Y₁.

Frente al UTP a 10⁻⁶M se observó un 99 % de respuesta (516 de 522 células), como se muestra en la Figura 4.4, y las movilizaciones de [Ca²⁺]_i fueron de 413.62 ± 7.49 nM (media ± desviación estándar; n=516 células; Tabla 4.3). El patrón de oscilaciones de Ca²⁺ fue igual al mostrado por las células tras ser estimuladas con ATP, observándose un incremento rápido de los niveles de [Ca²⁺]_i y un retorno lento a los niveles basales, que se situaban en 71 ± 3 nM (media ± desviación estándar; n=522 células). En la Figura 4.5 se muestra un experimento típico tras la estimulación con UTP 10⁻⁶M. Un 31% de las células que respondieron a la estimulación con UTP (158 de 516) mostraron un segundo pico de calcio transcurridos entre 5 y 7 minutos.

El UTP se testó en células HTMs a la concentración de 10⁻⁶M. Tan sólo el 27% de las células doblaron sus niveles de [Ca²⁺]_i (51 de 186 células). Las que así lo hicieron mostraron unos Δ[Ca²⁺]_i de 314 ± 17 nM.

La estimulación con el análogo del ATP no hidrolizable, ATP-ΩS, a 10⁻⁶M produjo un 95% de respuesta (414 de 438 células; Figura 4.4) e incrementó los niveles de [Ca²⁺]_i en 370.51 ± 7.31 nM (media ± desviación estándar; n=414 células) (Tabla 4.3). Las oscilaciones en la [Ca²⁺]_i fueron semejantes a las mostradas por el ATP (Figura 4.5). En un 31% de las células que respondieron (129 de 414) se produjo un segundo pico de calcio a la concentración de 10⁻⁶M.

Por último, se probó el efecto del compuesto 2-MeS-ATP a 10⁻⁶M sobre las células BTMs. El porcentaje de respuesta frente a este compuesto fue el menor de los diferentes nucleótidos trifosfato testados situándose en un 27% (29 de 101 células) y los incrementos de [Ca²⁺]_i fueron de 422.02 ± 39.70 nM (media ± desviación estándar; n=29 células; Figura 4.4 y Tabla 4.3).

Nucleótidos difosfato: UDP y ADP.

Los nucleótidos difosfato ADP y UDP son dos buenos agonistas de los receptores P2Y₁ y P2Y₆, respectivamente, además de activar otros subtipos de receptores P2Y en menor medida (Ralevic, 1998).

El agonista purinérgico uridina 5'-difosfato (UDP) a la concentración de 10⁻⁶M produjo respuesta en un 33% de las células (108 de 324; Figura 4.4 y Tabla 4.3) siendo los $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 313.75 ± 14.19 nM. Con la adenosina 5'-difosfato (ADP) a 10⁻⁶M se obtuvieron resultados similares, respondiendo el 34% de las células (145 de 427; Figura 4.4 y Tabla 4.3) y siendo el $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 338.99 ± 11.43 nM. A pesar del bajo porcentaje de respuesta, el 54 % de las células que respondieron al ADP (79 de 145) presentaron segundos picos. En la Figura 4.5 se muestran dos experimentos típicos en el registro del Ca²⁺ donde se observa el patrón de movilización del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la estimulación con ADP y UDP.

Perfil farmacológico

Con los porcentajes de respuesta obtenidos frente a los diferentes agonistas utilizados se obtiene el siguiente perfil de respuesta:

$$\text{ATP} = \text{UTP} > \text{ATP-}\Omega\text{S} \gg \text{ADP} = \text{UDP} > \text{2-MeS-ATP}$$

Este perfil farmacológico de respuesta corresponde, según la literatura, con el del receptor del tipo P2Y₂ (Ralevic, 1998).

Tabla 4.3. Efecto de diferentes agonistas purinérgicos a 10^{-6} M sobre el $[Ca^{2+}]_i$ en células trabeculares bovinas en cultivo.

| Agonista | Nº Respuestas / células analizadas | % respuesta | $[Ca^{2+}]_i$ basal (nmol/L) | $\Delta[Ca^{2+}]_i$ máximo (nmol/L) |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------|---|
| Control (Vehículo) | 7/275 | 3% | 64 ± 5 | 108 ± 20 |
| Ω,Ω -methylene ATP | 2/101 | 2% | 76 ± 8 | 135 |
| Ω,Ω -methylene ATP | 3/180 | 2% | 68 ± 6 | $252 \pm 83^{\text{¶}}$ |
| ATP- Ω S | 414/438 [§] | 95% | 72 ± 5 | $371 \pm 7^{\text{¶¶}}$ |
| UTP | 516/522 [§] | 99% | 71 ± 3 | $414 \pm 8^{\text{¶¶}}$ |
| 2-MeS-ATP | 29/106 [§] | 27% | 63 ± 37 | $422 \pm 40^{\text{¶¶}}$ |
| ADP | 145/427 [§] | 34% | 71 ± 5 | $339 \pm 11^{\text{¶¶}}$ |
| UDP | 108/324 [§] | 33% | 85 ± 5 | $314 \pm 14^{\text{¶¶}}$ |

Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. Los picos de $[Ca^{2+}]_i$ se consideraron significativos cuando alcanzaron al menos dos veces los valores basales. Las comparaciones entre la proporción de células que respondieron en el grupo control y en los grupos tratados con los distintos agonistas ([§]) se hicieron usando un test de Fisher donde ([§]) $p < 0.001$. Las comparaciones entre la medida del pico de $[Ca^{2+}]_i$ mostrado por las células trabeculares en el grupo control y los grupos tratados con agonistas ([¶]) se hicieron usando una t de Student desapareada donde ([¶]) $p < 0.05$, (^{¶¶}) $p < 0.001$.

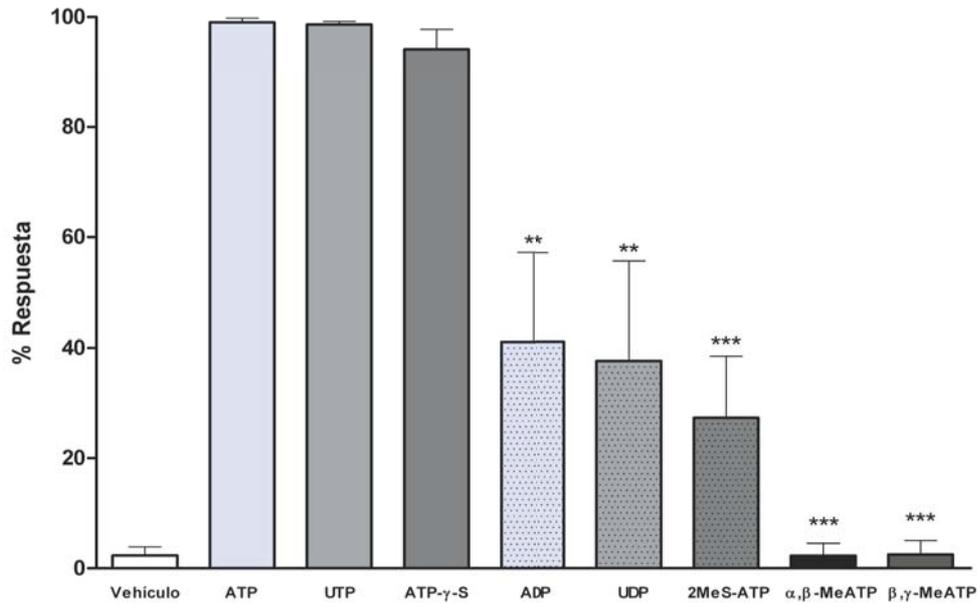


Figura 4.4. Porcentaje de respuesta de las células trabeculares bovinas (BTMs) frente a distintos agonistas purinérgicos a la concentración de 10^{-6} M. En ordenadas se muestra el % de respuesta para cada uno de los agonistas. Las comparaciones entre la proporción de respuesta en el grupo ATP y el resto (*) se realizó mediante t-test donde (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$.

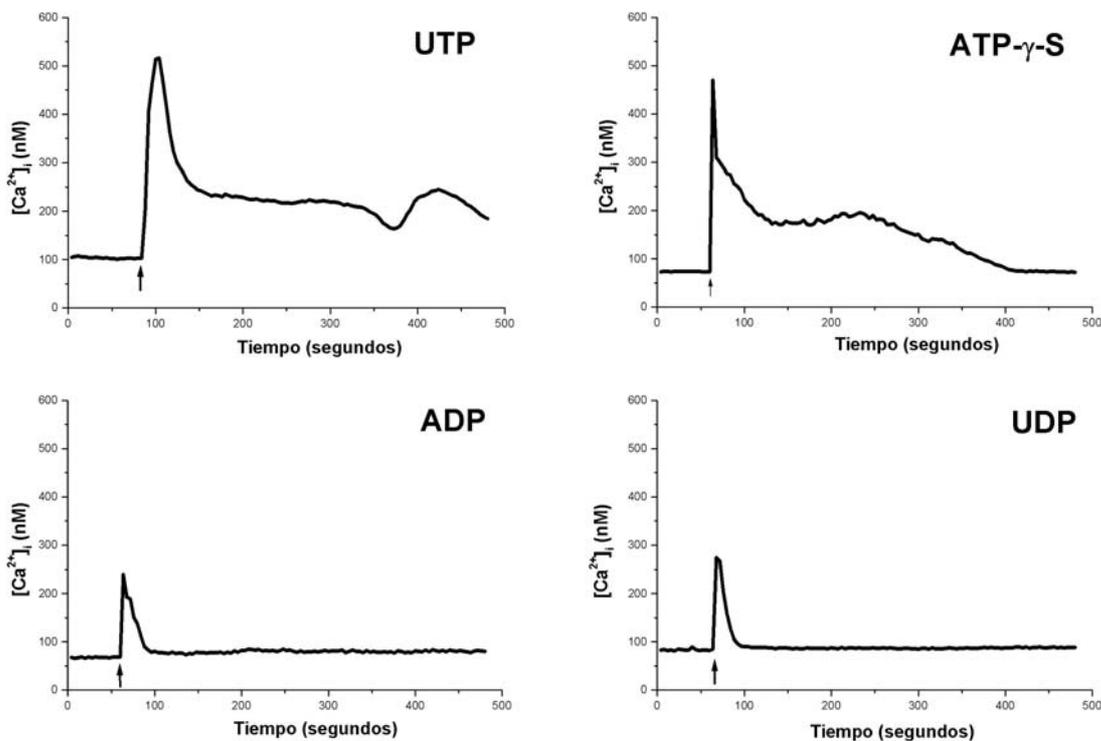


Figura 4.5. Movilizaciones del $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por diferentes agonistas purinérgicos. Los distintos gráficos muestran un experimento típico para cada uno de los diferentes compuestos a la concentración de 10^{-6} M. En ordenadas se muestra la $[Ca^{2+}]_i$ en nM y en abscisas el tiempo en segundos. La flecha indica el momento en el cual se añadió la droga.

4.2.2. Efecto de antagonistas sobre el Ca^{2+} intracelular

Se estudió el efecto de diferentes antagonistas purinérgicos sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ al estimular las células trabeculares con ATP.

Suramina

El efecto del antagonista no selectivo de receptores purinérgicos suramina se testó en las células trabeculares bovinas. Se han descrito receptores P2Y_2 sensibles e insensibles a la suramina mientras que el receptor P2Y_4 humano no se bloquea por este antagonista (Ralevic, 1998).

Primeramente se monitorizaron los niveles de Ca^{2+} en células BTMs tras la adición de suramina a 10^{-4}M para estudiar el efecto de este compuesto sobre los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El porcentaje de células que respondieron a la adición de suramina fue del 1% (1 de 175).

En los experimentos en los que se utilizó la suramina como antagonista, se preincubaron las células trabeculares durante 10 minutos antes del experimento con suramina a una concentración de 10^{-4}M a 37°C . A continuación, se probó la acción del agonista ATP a la concentración de 10^{-6}M sobre las células trabeculares en presencia del antagonista en el baño. Los resultados se muestran en la Tabla 4.4 y las Figuras 4.6 y 4.7.

La adición de ATP 10^{-6}M tras la preincubación con suramina produjo una respuesta del 69% de las células trabeculares (311 de 453) frente al 99% de respuesta a ATP a 10^{-6}M sin el antagonista suramina. A su vez los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en presencia de suramina fueron menores sin el antagonista ($386 \pm 10 \text{ nM}$; Tabla 4.4 y Figura 4.7). En la Figura 4.6 se puede observar la disminución en los incrementos del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en presencia de suramina.

Estos resultados permiten afirmar que la respuesta frente al ATP está mediada en parte por un receptor P2Y_2 sensible a la suramina.

PPADS

Se estudió el efecto del antagonista P2 no selectivo PPADS (ácido piridoxal-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico) sobre las células trabeculares bovinas. Primeramente se midieron los niveles de Ca^{2+} en las células tras la adición de PPADS a la concentración 10^{-5}M para comprobar el efecto de este compuesto sobre los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El porcentaje de células que respondieron a la adición de PPADS fue del 7% (8 de 109 células).

En los experimentos en los que se usó el PPADS como antagonista previamente a la adición del agonista ATP, el antagonista se incubó con las células trabeculares durante 10 minutos antes del experimento a una concentración de 10^{-5}M y a 37°C . A continuación, se probó a acción del ATP a la concentración de 10^{-6}M sobre las células trabeculares en presencia del antagonista PPADS en el baño. La adición de ATP tras la preincubación con PPADS produjo una respuesta del 96% de las células trabeculares (320 de 332). En la Figura 4.6 se muestra un experimento típico. Esta respuesta no resultó estadísticamente diferente a la respuesta del 99% frente al ATP a 10^{-6}M sin el antagonista PPADS. A su vez los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en presencia de PPADS fueron de $387 \pm 10 \text{ nM}$. (Tabla 4.4 y Figura 4.7).

Tabla 4.4. Efecto de diferentes antagonistas purinérgicos sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células trabeculares bovinas en cultivo.

| Droga | Nº Respuestas/ células analizadas | % respuesta | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal (nmol/L) | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ máximo (nmol/L) |
|----------------|--------------------------------------|-------------|--|--|
| ATP | 311/315 | 99% | 64 ± 8 | 449 ± 12 |
| Suramina + ATP | 311/453 ^{§§} | 69% | 89 ± 11 | $386 \pm 11^{\text{¶}}$ |
| PPADS + ATP | 320/332 | 96% | 64 ± 6 | $387 \pm 10^{\text{¶}}$ |

Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. Los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se consideraron significativos cuando alcanzaron al menos dos veces los valores basales. Las concentraciones utilizadas fueron: ATP a 10^{-6}M ; PPADS a 10^{-5}M y Suramina a 10^{-6}M . Las comparaciones entre la proporción de células que respondieron en el grupo ATP y en los grupos tratados con antagonista ([§]) se hicieron usando un test de Fisher donde (^{§§}) $p < 0.001$. Las comparaciones entre la medida del pico de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mostrado por las células trabeculares en el grupo control y los grupos tratados con antagonista ([¶]) se hicieron usando una t de Student desapareada donde ([¶]) $p < 0.001$.

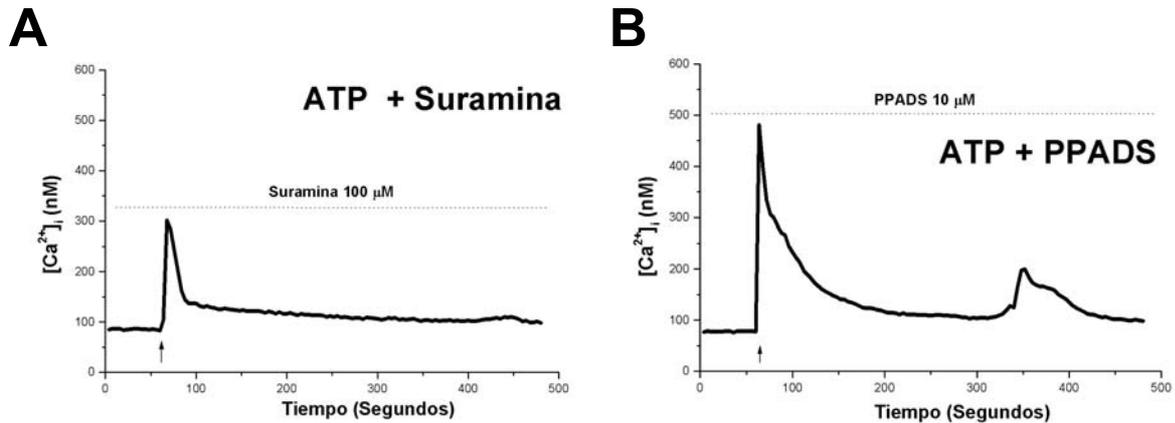


Figura 4.6. Efecto bloqueante de los antagonistas Suramina y PPADS sobre células trabeculares bovinas. En **A** se muestra un experimento típico en presencia de Suramina a 10^{-4} M donde se observan los incrementos del $[Ca^{2+}]_i$ tras la estimulación con ATP 10^{-6} M. En **B** se muestran los efectos sobre el $[Ca^{2+}]_i$ en una célula estimulada con ATP 10^{-6} M en presencia de PPADS a la concentración de 10^{-5} M. En ambos casos se muestra en ordenadas las variaciones en el $[Ca^{2+}]_i$ mientras que en abcisas se muestra el tiempo en segundos. La flecha indica el momento en el cual se añadió el ATP. La línea discontinua indica el tiempo en el cual está el antagonista en el baño.

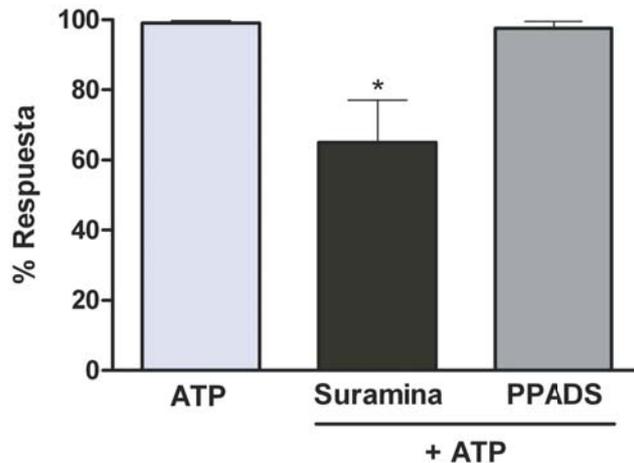


Figura 4.7. Diagrama de barras donde se muestra el porcentaje de respuesta de las células trabeculares bovinas al agonista ATP a 10^{-6} M en presencia de distintos antagonistas purinérgicos. La suramina se utilizó a 10^{-4} M y el PPADS a 10^{-5} M. Las comparaciones entre el porcentaje de respuesta del grupo ATP y los grupos tratados con antagonista (*) se realizaron mediante un t-test donde (*) $p < 0.05$.

4.3. Mecanismos intracelulares activados por el ATP

En este apartado se describen los experimentos encaminados a estudiar los mecanismos intracelulares involucrados en los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por el agonista purinérgico ATP.

4.3.1. Origen del Ca^{2+} intracelular

Efecto de la supresión del Ca^{2+} del medio extracelular

Se realizaron una serie de experimentos en los que se pretendía dilucidar si el Ca^{2+} intracelular movilizado tras la estimulación con ATP tenía un origen intracelular, extracelular o mixto. Para ello, se realizaron experimentos en los que se omitió el Ca^{2+} de la solución extracelular utilizada, manteniendo el resto de composición idéntica a las utilizadas en los otros registros. Se añadió, además, 1 mM EGTA para quelar completamente el Ca^{2+} residual. Se probaron dos agonistas en estas condiciones para incrementar la $[Ca^{2+}]_i$, el ATP y el ATP- Ω S.

Tras estimular las células con ATP 10^{-6} M en las condiciones de cero Ca^{2+} , el 98% de las células (456 de 454) respondieron (Figura 4.8). La $[Ca^{2+}]_i$ movilizada en ausencia de calcio extracelular fue de 464 ± 8 nM (Tabla 4.5).

Para el otro agonista testado, el ATP- Ω S, a la concentración de 10^{-6} M, respondieron el 97% de las células y la $[Ca^{2+}]_i$ movilizada en ausencia de Ca^{2+} extracelular fue de 376 ± 18 nM (Figura 4.8 y Tabla 4.5).

No se encontraron diferencias en el porcentaje de respuesta ni en la amplitud inicial del pico de Ca^{2+} para ninguno de los dos agonistas testados. Sin embargo una diferencia importante se vio en cuanto al retorno del Ca^{2+} a los niveles basales. La fase de recuperación fue más rápida en los experimentos realizados sin calcio en el medio extracelular. Esto se midió mediante el índice T_{70} . Este índice fue de 61.67 ± 7.84 segundos en presencia de Ca^{2+} extracelular y de 34.60 ± 3.34 sin Ca^{2+} en la solución de registro. En la Figura 4.9 se puede comparar la respuesta al ATP en condiciones de Ca^{2+} fisiológicas (2mM) frente a otra en condiciones de 0 Ca^{2+} .

Efecto de la Tapsigargina

Con el fin de confirmar el origen intracelular del Ca^{2+} movilizado tras la estimulación con ATP, se realizaron experimentos con tapsigargina. La tapsigargina es un compuesto capaz de bloquear la bomba ATPasa dependiente de Ca^{2+} que está presente en la membrana del retículo sarcoendoplásmico (SERCA). El efecto al bloquear esta bomba es el de un vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} .

En nuestros experimentos, la preincubación con tapsigargina 10^{-6}M durante 15 minutos disminuyó de forma significativa la respuesta (t-test; $p < 0.001$) de las células trabeculares al ATP 10^{-6}M , con un porcentaje de respuesta del 3% (6 de 233 células; Figura 4.8). Las células que respondieron incrementaron su $[\text{Ca}^{2+}]_i$ con picos de 331 ± 47 nM (Tabla 4.5). Los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal en las células en este grupo de experimentos se mostraron más elevados de lo habitual, situándose en 151 ± 10 nM.

Se demostró de esta manera que los incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producidos por el ATP se debían a la liberación de Ca^{2+} a partir del retículo endoplasmático.

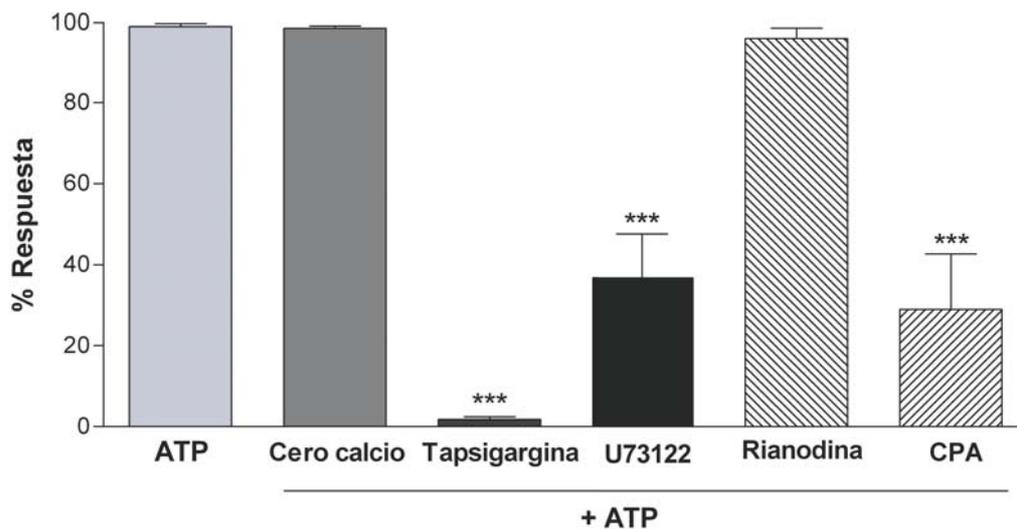


Figura 4.8. Mecanismos intracelulares de la respuesta al ATP. En todos los casos se estimularon las células trabeculares con ATP a 10^{-6}M . La tapsigargina, el U73211, la rianodina y el ácido ciclopiazónico (CPA) se preincubaron entre 10 y 15 minutos a 10^{-6}M previamente a la adición del ATP. Las comparaciones en el porcentaje de respuesta se realizaron entre el grupo ATP y el resto (*) mediante un t-test donde (***) $p < 0.001$.

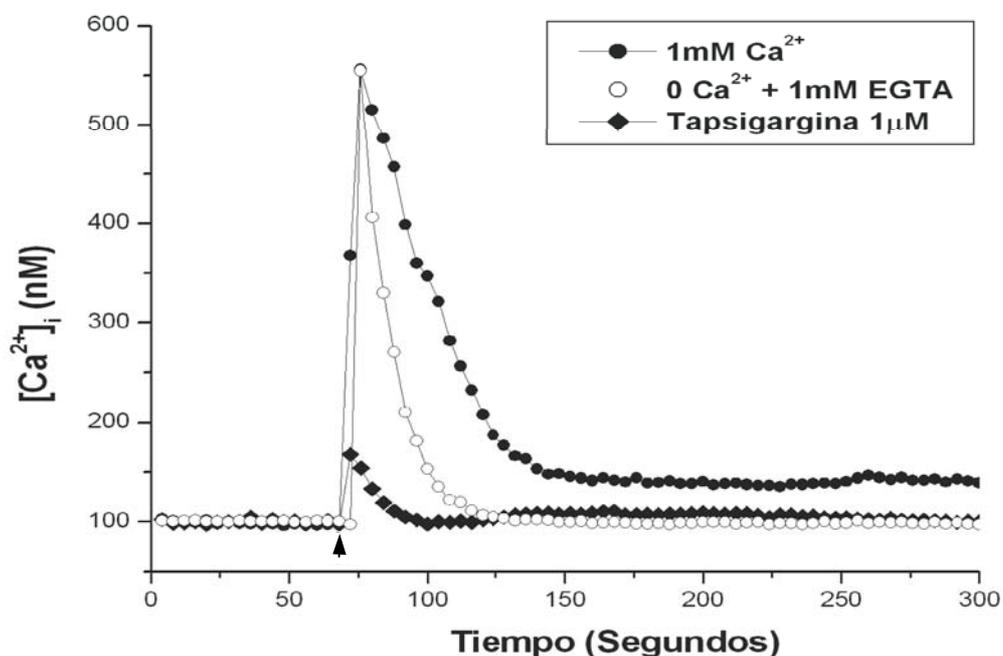


Figura 4.9. Experimentos representativos donde se muestran los efectos del ATP $10^{-6}M$ sobre el $[Ca^{2+}]_i$ en células trabeculares en presencia de Ca^{2+} extracelular (\blacktriangle), sin Ca^{2+} en el medio extracelular (\circ) o tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares con tapsigargina $10^{-4}M$ (\blacktriangle). En ordenadas se muestra la $[Ca^{2+}]_i$ y en abscisas el tiempo en segundos. La flecha indica el momento de la adición de la droga.

4.3.2. Vías de señalización intracelular

Es habitual que aquellos receptores metabotrópicos cuya activación produce un incremento en el Ca^{2+} intracelular se encuentren acoplados a una proteína $G_{q/11}$ que activa la fosfolipasa C, que a su vez produce un incremento de los niveles de inositol trifosfato (IP_3) y una liberación del Ca^{2+} de los depósitos intracelulares.

Efecto del U73122

Con la finalidad de testar si la estimulación con ATP activaba la fosfolipasa C (PLC), se probó en las células trabeculares el compuesto U73122, cuyos efectos inhibitorios sobre la fosfolipasa C han sido demostrados en diferentes tipos celulares (Bleasdale, 1993; Hilderbrandt, 1997).

La preincubación con U73122 a la concentración de 10^{-6} M durante 10 minutos disminuyó la respuesta de las células trabeculares a la aplicación de ATP 10^{-6} M. El porcentaje de respuesta fue del 44% (185 de 419 células). Las células que respondieron incrementaron su $[Ca^{2+}]_i$ con picos de 324 ± 10 nM. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.5 y en la Figura 4.8.

Efectos del CPA y la rianodina

Se ha demostrado que el ácido ciclopiazónico (CPA), un inhibidor de la SERCA, es un compuesto que actúa vaciando los depósitos celulares sensibles a IP_3 (Seidler, 1989).

La preincubación con CPA a la concentración de 10^{-6} M se realizó a 37°C durante 10 minutos. Tras este periodo, la aplicación de ATP 10^{-6} M en presencia del CPA produjo un porcentaje de respuesta de las células trabeculares del 29% (86 de 292 células) que fue significativamente diferente del obtenido sin CPA (t-test; $p < 0.001$). Las células que respondieron incrementaron su $[Ca^{2+}]_i$ con picos de 338 ± 10 nM. Estos resultados están mostrados en la Tabla 4.5 y en la Figura 4.8.

Los receptores de rianodina que están presentes en ciertos depósitos intracelulares pueden ser estimulados con diferentes sustancias, como la cafeína o la rianodina. Se utilizó en estos experimentos la rianodina para vaciar los depósitos intracelulares sensibles a rianodina (Pozzan, 1994) antes de la estimulación con el agonista ATP.

La preincubación con rianodina a 10^{-6} M se realizó a 37°C durante 10 minutos. Tras este periodo de preincubación, se aplicó ATP 10^{-6} M en presencia de la rianodina y el porcentaje de respuesta de las células trabeculares fue del 97% (171 de 176 células). Este porcentaje no fue estadísticamente diferente del obtenido con ATP sin la utilización de rianodina (Tabla 4.5) Las células que respondieron incrementaron su $[Ca^{2+}]_i$ con picos de 371 ± 14 nM. Estos resultados quedan reflejados en la Tabla 4.5 y en la Figura 4.8.

Estos experimentos muestran que los receptores de IP_3 del retículo endoplasmático están involucrados en la vía de señalización activada por el ATP extracelular, mientras que no existen evidencias que involucren a los receptores de rianodina en esta vía.

Tabla 4.5. Mecanismos intracelulares de los $\Omega[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células trabeculares bovinas en cultivo.

| Droga | Nº Respuestas / células analizadas | % respuesta | $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal (nmol/L) | $\Omega[\text{Ca}^{2+}]_i$ máximo (nmol/L) |
|--|------------------------------------|-------------|-------------------------------------|--|
| ATP- $\Omega\text{S } 10^{-6}\text{M}$ | 414/438 | 95% | 72 ± 5 | 371 ± 7 |
| ATP- $\Omega\text{S } 10^{-6}\text{M}$ (0 Ca^{2+}) | 113/116 | 97% | 70 ± 7 | 376 ± 18 |
| ATP 10^{-6}M | 311/315 | 99% | 64 ± 8 | 449 ± 12 |
| ATP 10^{-6}M (0 Ca^{2+}) | 456/464 | 98% | 81 ± 6 | 464 ± 8 |
| Tapsigargina 10^{-6}M + ATP 10^{-6}M | 6/233 [§] | 3% | 151 ± 1 | $331 \pm 47^{\text{¶}}$ |
| U73122 10^{-6}M + ATP 10^{-6}M | 185/419 [§] | 44% | 103 ± 14 | $324 \pm 10^{\text{¶}}$ |
| CPA 10^{-6}M + ATP 10^{-6}M | 86/292 [§] | 29% | 89 ± 15 | $338 \pm 10^{\text{¶}}$ |
| Rianodina 10^{-6}M + ATP 10^{-6}M | 171/176 | 97% | 52 ± 2 | $371 \pm 14^{\text{¶}}$ |

Los datos se muestran como media \pm desviación estándar. Los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se consideraron significativos cuando alcanzaron al menos dos veces los valores basales. Las comparaciones entre la proporción de células que respondieron en el grupo control y en los grupos tratados con ATP ([§]) se hicieron usando un test de Fisher donde ([§]) $p < 0.001$. Las comparaciones entre la medida del pico de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mostrado por las células trabeculares en el grupo control y los grupos tratados con ATP ([¶]) se hicieron usando una t de Student desapareada donde ([¶]) $p < 0.001$.

4.4. Modulación de corrientes iónicas por el ATP extracelular

En las células trabeculares se ha descrito el canal de K^+ de alta conductancia sensible a Ca^{2+} y voltaje BK_{Ca} (Stumpff, 1997). Este canal se activa como consecuencia de la despolarización de la membrana, permitiendo la salida de iones K^+ fuera de la célula e hiperpolarizando, de esta manera, la membrana plasmática. El BK_{Ca} desarrolla diferentes funciones según el tejido donde se encuentre y en el caso de la red trabecular se ha sugerido un papel en la regulación de la relajación del tejido (Stumpff, 1997). Ya que este canal está modulado finamente por el Ca^{2+} intracelular, se estudió el efecto del ATP (agente que incrementa la $[Ca^{2+}]_i$) sobre las corrientes de K^+ mediadas por este canal.

4.4.1. Efectos del ATP sobre las corrientes del BK_{Ca}

Para el estudio de la acción del ATP sobre las corrientes de K^+ en las células trabeculares se realizaron experimentos en la configuración de *whole-cell* con parche perforado tal y como se describe en la sección de material y métodos. En esta configuración el contenido citoplasmático no se dializa hacia la pipeta permitiendo, de esta manera, que los mensajeros intracelulares como el Ca^{2+} no se vean afectados a lo largo del registro. El potencial de membrana se fijó a -60 mV y el protocolo utilizado fue la aplicación de pulsos despolarizantes en pasos de +20 mV desde -80 mV hasta +100mV. A partir de la corriente obtenida para cada potencial se realizaron curvas corriente-voltaje. El ATP se aplicó al baño mediante sistema de perfusión a la concentración de $10^{-5}M$ disuelto en solución fisiológica. Se utilizó a esta concentración ya que en los experimentos de registro del Ca^{2+} intracelular la respuesta que se había obtenido había sido del 99%.

Las células bovinas presentaron una capacitancia de membrana de 31.00 ± 5.23 pF. La corriente de K^+ en condiciones control (perfusión de solución fisiológica sin ATP) en células BTMs fue de 24.86 ± 4.94 pA/pF al potencial de +100 mV. El ATP produjo un aumento significativo ($p < 0.001$; *two-way* ANOVA) de las corrientes del 116% en el 100% de las células ($n=6$) hasta un máximo de 53.90 ± 14.66 pA/pF a +100 mV. La retirada del ATP del baño produjo un retorno de la corriente a los valores basales, siendo concretamente la corriente en condiciones de retorno de 23.09 ± 6.79 pA/pF a +100 mV (Figuras 4.10 y 4.11). Las corrientes de salida fueron inhibidas por el bloqueante selectivo del canal BK_{Ca} , iberitoxina a $10^{-8}M$ (Figura 4.11).

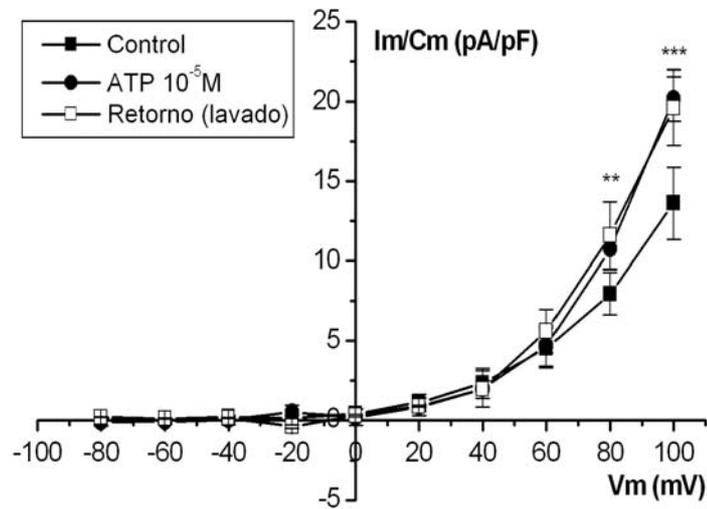
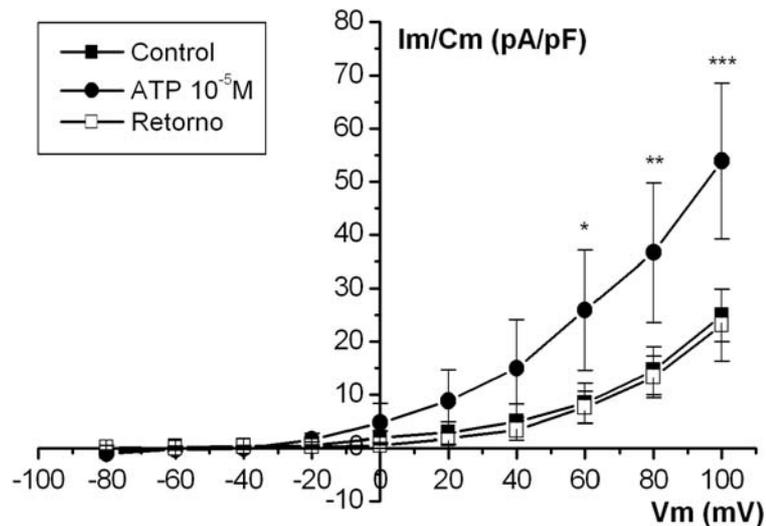
A**B**

Figura 4.10. Curvas corriente-voltaje (I-V) normalizadas por la capacitancia en las que se muestra el efecto del ATP sobre las corrientes de K^+ en células trabeculares humanas (HTMs, **A**; n=5) y bovinas (BTMs, **B**; n=6). En abcisas se muestra el voltaje (mV). En ordenadas se muestra la corriente corregida por la capacitancia de la membrana (pA/pF) para cada uno de los voltajes aplicados. La adición al baño de ATP 10^{-5} M produce un aumento significativo de las corrientes de K^+ en BTMs y HTMs (** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.5$; two-way ANOVA).

Este patrón de aumento de corriente tras la aplicación de ATP también se observó en células HTMs aunque con importantes diferencias. En primer lugar el porcentaje de células que respondieron al ATP fue del 55 % (5 de 9 células) en lugar del 100% observado en BTMs. Por otro lado, las amplitudes máximas de las corrientes en condiciones control que se observaron en HTMs fueron aproximadamente la mitad de las observadas en células BTMs para valores de capacitancia de membrana (C_m) semejantes (C_m en HTMs: 35.60 ± 3.98 pF; $n=5$), situándose los valores de corriente en 13.61 ± 2.26 pA/pF a +100 mV (Figura 4.12). Otra diferencia radicó en el efecto del ATP sobre las corrientes (Figura 4.12), siendo el aumento de éstas del 48% en HTMs (20.17 ± 1.39 pA/pF a +100 mV). Estos aumentos en las corrientes de membrana producidas por el ATP en HTMs, a pesar de ser menores en magnitud que los producidos en BTMs, fueron estadísticamente significativos ($p < 0.001$; *two-way* ANOVA). Por último, los aumentos producidos en las corrientes por el ATP no disminuyeron tras 10 minutos de la retirada de la droga del baño a diferencia de lo que ocurría con las células trabeculares bovinas (Figura 4.10).

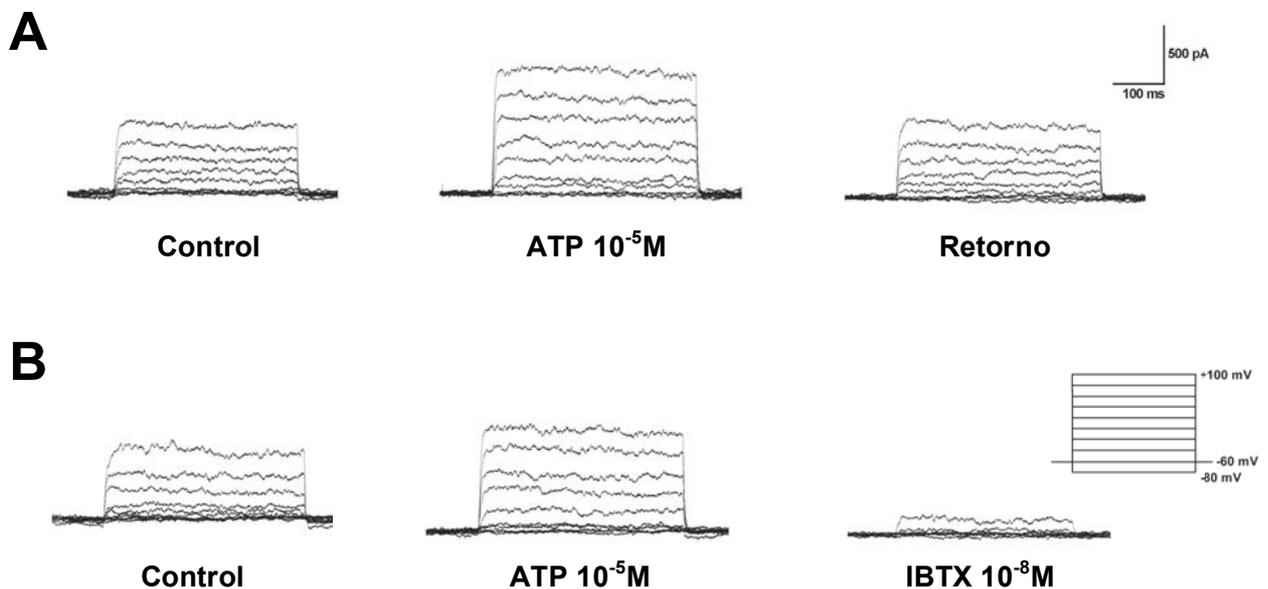


Figura 4.11. Experimentos representativos en la configuración de *whole-cell* con parche perforado donde se muestran corrientes de K^+ en células trabeculares bovinas. Las células se fijan a -60 mV y se aplican pulsos de voltaje de 300 ms de duración desde -80 mV hasta 100 mV en incrementos de 20 mV. **A:** Experimento típico donde la aplicación de ATP 10^{-5} M en el baño produce un incremento de las corrientes que es reversible al retirar la droga del baño. **B:** Experimento en el cual se bloquean las corrientes de K^+ en las células trabeculares con el bloqueante selectivo del canal BK_{Ca} iberitoxina (IBTX) a 10^{-8} M, demostrando así que estas corrientes son mediadas por este canal.

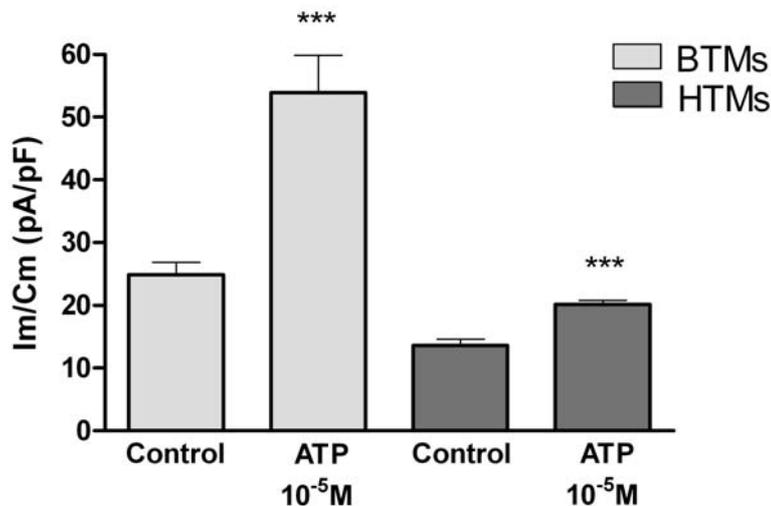


Figura 4.12. Efecto del ATP sobre las corrientes totales de K⁺ en células trabeculares bovinas y humanas al potencial de membrana de +100 mV. El ATP a la concentración de 10⁻⁵M produce un aumento en las corrientes basales de K⁺ del 116% en BTMs y del 48% en HTMs. Las significaciones son las mismas que las mostradas en la Figura 4.10.

4.4.2. Implicación del receptor P2Y₂

La suramina es un antagonista no selectivo de receptores purinérgicos que se muestra eficaz en el bloqueo de receptores P2Y₂ (Ralevic, 1998). En los estudios previos sobre el efecto del ATP en el Ca²⁺ intracelular se demostró la sensibilidad de los receptores P2Y₂ presentes en las células trabeculares bovinas a la suramina. Se quiso estudiar, por tanto, la participación de este receptor en el aumento de corrientes de K⁺ producidas por el ATP. Para ello se utilizó la suramina a la concentración de 10⁻⁴M, la misma que en los estudios del Ca²⁺.

Las corrientes en condiciones control fueron de 35.41 ± 11.59 pA/pF a +100 mV. La adición de suramina al baño no produjo aumentos significativos en las corrientes de K⁺ (36.26 ± 12.89 pA/pF a +100 mV; Figuras 4.13 y 4.14). En presencia del antagonista se añadió ATP a 10⁻⁵M, el cual, en esta ocasión, no incrementó las corrientes de manera significativa (40.43 ± 13.68 pA/pF a +100 mV; n=5; Figuras 4.13 y 4.14).

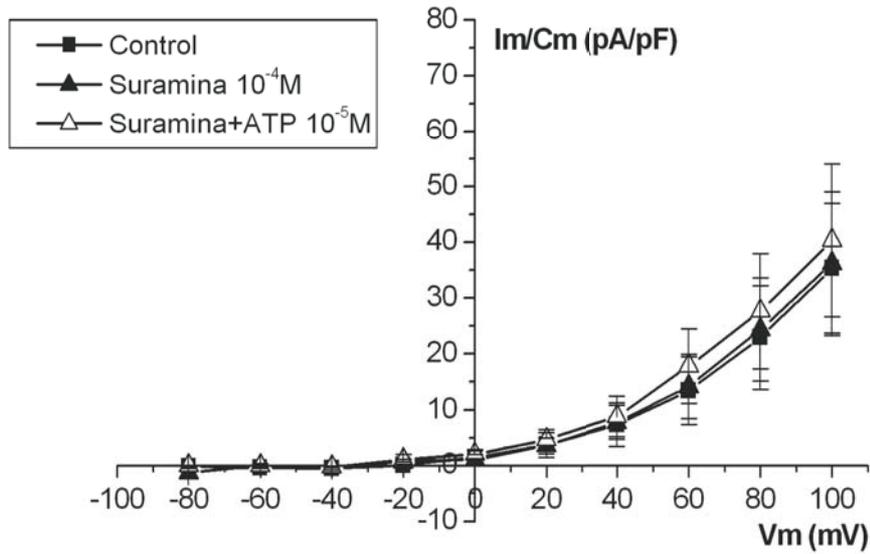


Figura 4.13. Implicación de receptores purinérgicos en el efecto del ATP sobre las corrientes de K^+ en las células trabeculares. Curva corriente-voltaje (I-V) en la que se muestra la corriente normalizada por la capacitancia de la membrana (46.80 ± 6.73 pF; $n=5$). La adición al baño de Suramina 10^{-4} M o Suramina 10^{-4} M + ATP 10^{-5} M no produjo un aumento significativo de las corrientes de K^+ . En abscisas se muestra el voltaje (mV). En ordenadas se muestra la corriente normalizada (pA/pF) para cada uno de los voltajes aplicados.

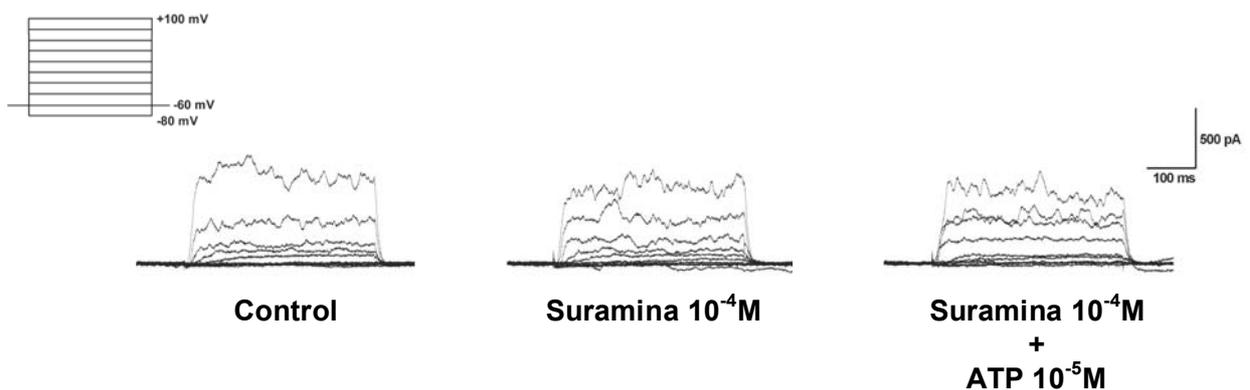


Figura 4.14. Experimentos realizados en la configuración de *whole-cell* con parche perforado donde se muestra que la aplicación de suramina 10^{-4} M previene el aumento de las corrientes de K^+ producidas por el ATP 10^{-5} M en las células trabeculares bovinas. El potencial de membrana de las células se fija a -60 mV y se aplican pulsos de voltaje de 300 ms de duración desde -80 mV hasta 100 mV en incrementos de 20 mV.

4.4.3. Dependencia del Ca^{2+} intracelular

El canal BK_{Ca} es un canal regulado en gran medida por la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y así se ha descrito en estas mismas células (Gasull, 2003). Para estudiar la dependencia del Ca^{2+} intracelular en el aumento de las corrientes de K^+ mediadas por el BK_{Ca} se realizaron experimentos con un quelante de Ca^{2+} de alta afinidad, el BAPTA.

Las células trabeculares se preincubaron previamente a los experimentos electrofisiológicos con BAPTA esterificado (BAPTA-AM), de manera que el quelante quedaba secuestrado en el interior del citoplasma al ser roto el enlace éster por las esterasas intracelulares. La concentración de BAPTA utilizada en la incubación fue de $5 \times 10^{-6} \text{M}$ y el tiempo de incubación de 1 hora. Tras este periodo, las células fueron lavadas con PBS y colocadas en la cámara de registro. Los experimentos se realizaron en la configuración de *whole-cell* con parche perforado y el potencial de membrana se fijó a -60 mV. Tras alcanzar dicha configuración se procedió a pasar un protocolo de pulsos de +20 mV desde -80 mV hasta +100 mV para estudiar las corrientes.

Una diferencia importante en este grupo de experimentos en los que se queló el Ca^{2+} intracelular se vio en las corrientes de K^+ observadas en condiciones control, las cuales eran claramente inferiores a las corrientes control habituales. Las células trabeculares en las que no se modificó el Ca^{2+} intracelular disponían de una corriente en condiciones control de $24.86 \pm 4.94 \text{ pA/pF}$ al potencial despolarizante de +100 mV (Figura 4.10 y 4.15B; $n=6$). En las células en las que se preincubó con BAPTA, la corriente de K^+ en condiciones control fue de $2.04 \pm 0.81 \text{ pA/pF}$ al mismo potencial de +100 mV (Figura 4.15A y 15B; $n=6$). La diferencia en las corrientes basales de K^+ fue significativamente distinta a los potenciales de +80 y +100 mV, como se puede observar en la Figura 4.15B (** $p < 0.001$; *two-way ANOVA*).

La aplicación de $\text{ATP } 10^{-5} \text{M}$ en el baño no aumentó de manera significativa las corrientes de K^+ , situándose el aumento de éstas en $4.65 \pm 2.51 \text{ pA/pF}$ a +100 mV (Figura 4.15A). Una segunda aplicación de $\text{ATP } 10^{-5} \text{M}$ tras un periodo de 10 minutos de lavado donde la corriente era de $5.71 \pm 4.12 \text{ pA/pF}$ a +100 mV, produjo un ligero aumento de las corrientes hasta $18.71 \pm 10.04 \text{ pA/pF}$ a +100 mV, que tampoco resultó significativamente distinto.

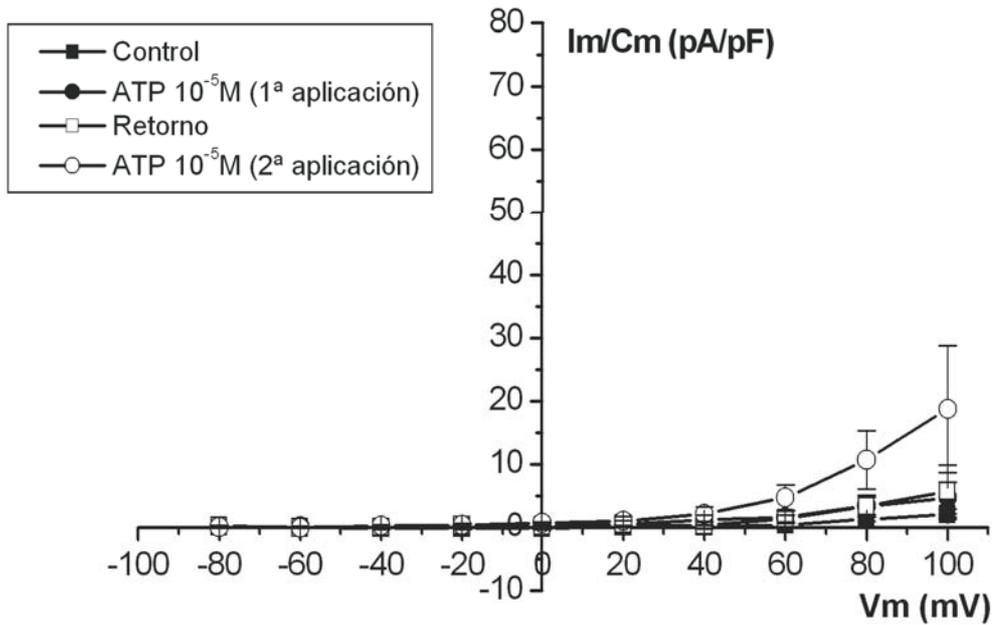
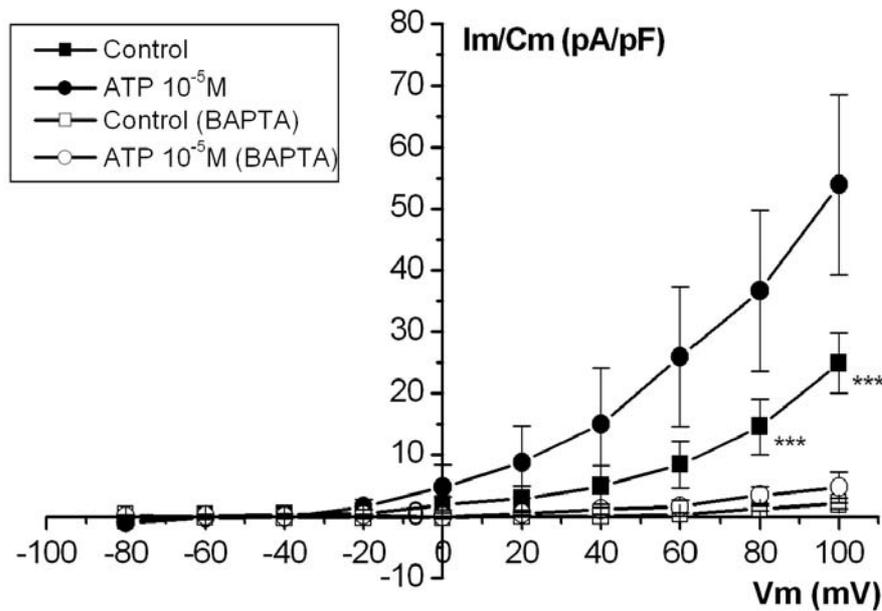
A**B**

Figura 4.15. A. Curva corriente-voltaje (I-V) en la que se muestra el efecto del quelante de Ca^{2+} , el BAPTA $5 \times 10^{-6} \text{M}$, sobre las corrientes de K^+ en células trabeculares tanto en condiciones control como tras la estimulación con $\text{ATP } 10^{-5} \text{M}$. **B.** Curva I-V comparativa en la que se muestran las diferencias existentes entre los experimentos control (\square) y en aquellos en los que se cuele el Ca^{2+} intracelular con BAPTA (\triangle). En abcisas se muestra el voltaje (mV). En ordenadas se muestra la corriente normalizada con la capacitancia de la membrana (C_m) en pA/pF para cada uno de los voltajes aplicados. La C_m de las células preincubadas con BAPTA fue de $36.17 \pm 5.36 \text{ pF}$; $n=6$. Se observaron diferencias significativas entre las corrientes basales de K^+ en condiciones control (\square) y en células preincubadas con BAPTA (\square) (***) (***) $p < 0.001$; two-way ANOVA).

Así pues, los experimentos parecían indicar que el Ca^{2+} intracelular movilizado por la estimulación purinérgica era quelado rápidamente por el BAPTA, evitando de esta manera la modulación del canal BK_{Ca} y el aumento de las corrientes. Para comprobar esto, se preincubaron células trabeculares procedentes de los mismos pases que las utilizadas para los experimentos de *patch-clamp* con Fura-2 y BAPTA durante 1 hora o simplemente con Fura-2. Transcurrido este tiempo se realizaron medidas de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante fluorimetría. Como se muestra en la Figura 4.16, las células incubadas tan sólo con Fura-2 ($n=74$ células) produjeron un aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 549 ± 21 nM, siendo el porcentaje de respuesta del 99 % tras ser estimuladas con ATP 10^{-5} M. Las células tratadas con BAPTA ($n=109$ células) mostraron una respuesta del 8 % y las movilizaciones de Ca^{2+} no fueron significativas al ser estimuladas con ATP 10^{-5} M. El Ca^{2+} intracelular de este grupo de células presentó una ligera tendencia a aumentar a lo largo del tiempo en el que se monitorizaron sus niveles. Dichos aumentos se muestran en la Figura 4.16A y los incrementos lentos fueron desde 67 nM antes de la estimulación hasta 150 nM al final de los 8 minutos que duró el experimento.

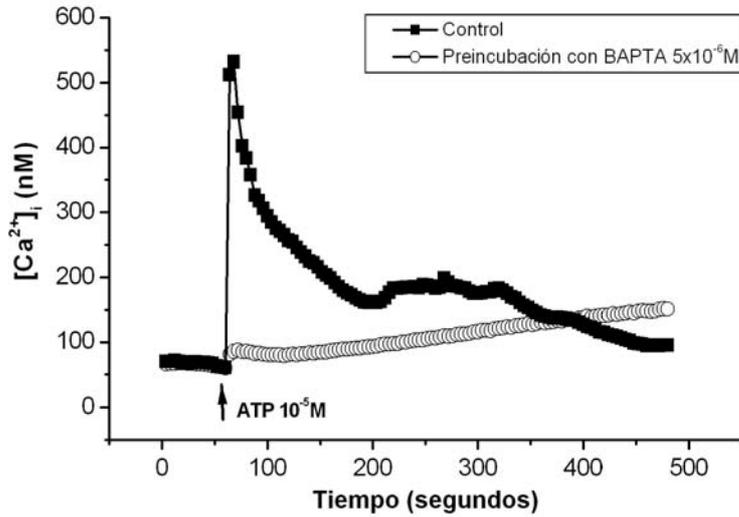
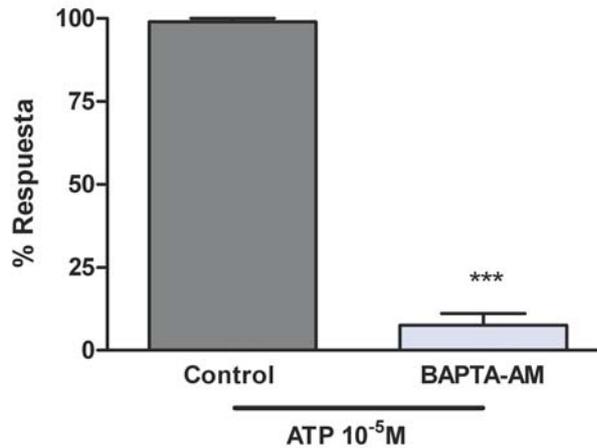
A**B**

Figura 4.16. Efecto del ATP sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en células trabeculares tratadas con el quelante de Ca^{2+} BAPTA. **A.** La preincubación de BTMs con el quelante de Ca^{2+} permeable a membrana BAPTA-AM a la concentración de $5 \times 10^{-6}M$ durante 1 hora previene los incrementos de Ca^{2+} que se producen tras la estimulación con ATP a $10^{-5}M$ (\square , $n=74$ células; \blacktriangle , $n=109$ células). Se muestran en abcisas el tiempo en segundos y en ordenadas la $[Ca^{2+}]_i$ en nM. **B.** El % de respuesta frente al ATP está significativamente disminuido en las células trabeculares preincubadas con BAPTA en comparación a los experimentos control (***, $p < 0.001$).

4.5. Papel del ATP como mediador autocrino/paracrino

Se ha demostrado anteriormente en este trabajo que las células trabeculares poseen receptores purinérgicos funcionales cuyo ligando natural es el ATP. El origen del ATP en el humor acuoso es controvertido. Parece ser que ciertos tipos celulares, como las células del epitelio ciliar no pigmentado (Mitchell, 1998) o células del epitelio del cristalino (Eldred, 2003), son capaces de liberar ATP frente a estímulos hipotónicos. De la misma forma, cabe la posibilidad que el ATP pueda ser liberado por las mismas células trabeculares como consecuencia de diferentes estímulos tanto físicos como químicos, suponiendo de esta manera una señal autocrina-paracrina en la red trabecular. En estos experimentos se testó la capacidad de las células trabeculares bovinas de liberar ATP frente a un estímulo hipotónico. Se estudió, asimismo, de que manera afectaba un estímulo hipotónico a la $[Ca^{2+}]_i$.

4.5.1. Liberación de ATP por las células trabeculares

Para los experimentos en los que se estudió la liberación de ATP, se utilizó el ensayo de la luciferina-luciferasa, mediante el cual se detectan las moléculas de ATP que son secretadas desde las células al medio extracelular. Se sabe que el *shear stress* (equivalente hidrodinámico de lo que se conoce como tensión de cizalladura en los sólidos) provoca una liberación de ATP en diferentes tipos celulares (Grierson, 1995; Burnstock, 1999). Por esta razón, tras lavar las células con tampón de lectura para extraer los restos de suero, se dejaron reposar durante 30 minutos sobre el sistema de registro para permitir que los niveles de ATP se estabilizaran.

En los experimentos en los que se estimuló las células con solución isotónica no se observó liberación de ATP a la solución extracelular 0.004 ± 0.0006 picomoles (pmol; media \pm desviación estándar; $n=3$; equivalente a 0.001 ± 0.002 nM) como se muestra en la Figura 4.17. Cuando la osmolaridad del medio se redujo en un 20%, las células trabeculares liberaron 2.76 ± 0.18 pmoles de ATP (equivalente a 1.15 ± 0.07 nM) (t-student $p<0.001$ vs. isotónico; $n=5$), como se muestra en la Figura 4.17. Tras el pico inicial de liberación de ATP, la cantidad de nucleótido secretado fue disminuyendo de manera exponencial hasta recuperar los niveles de liberación basales dentro de un periodo de 400-500 segundos tras la estimulación. Cuando la osmolaridad del medio se redujo en un 40%

se liberaron 4.35 ± 0.23 pmoles de ATP (equivalente a 1.56 ± 0.08 nM; t-student $p < 0.001$ vs. isotónico; $n=4$) y la cinética de liberación fue similar.

Para comprobar que el ATP detectado tras añadir las distintas soluciones hiposmóticas no provenía de la lisis celular, se recogieron muestras del medio extracelular antes de la estimulación y al finalizar los experimentos en cada una de las tres condiciones experimentales (isotónico, 20% y 40% de hiposmolaridad) y se realizó un ensayo para detectar la actividad del enzima intracelular lactato deshidrogenasa. No se encontró actividad significativa del enzima en ninguna de las muestras analizadas, descartándose así la lisis celular.

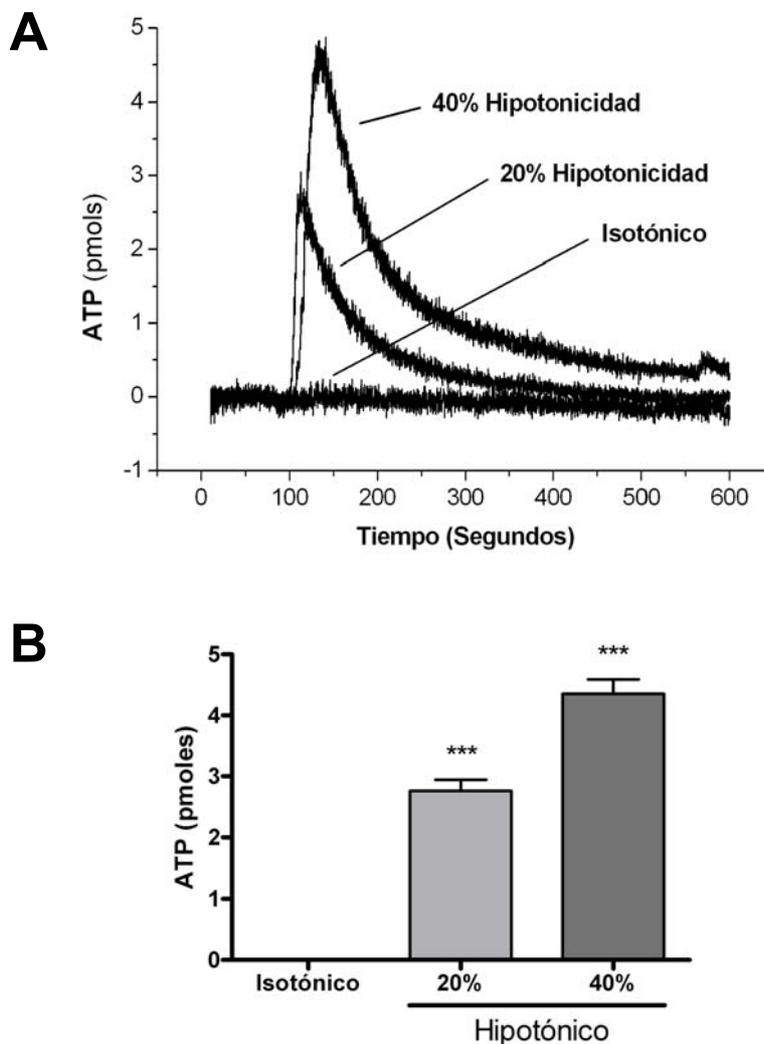


Figura 4.17. A. Experimento típico donde se muestra la liberación de ATP frente a estímulos hipotónicos del 20 % y el 40%. En abcisas se muestra el tiempo en segundos mientras que en ordenadas se muestra la cantidad de ATP liberado por las células trabeculares en picomoles. **B.** Diagrama de barras donde se evidencian las diferencias significativas entre la adición de solución isotónica y la de diferentes soluciones hipotónicas (** $p < 0.001$; t-student).

4.5.2. Efectos sobre el Ca^{2+} y regulación por ectonucleotidasas

En estos experimentos se quiso estudiar de qué manera afectaba un estímulo hiposmótico a la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Se demostró con anterioridad la liberación de ATP por parte de las células trabeculares tras estímulos hiposmóticos y también se vio la capacidad de movilizar Ca^{2+} intracelular frente al ATP extracelular vía receptores purinérgicos de membrana en estas mismas células. Cabía pensar, pues, que un estímulo hiposmótico capaz de liberar ATP al medio extracelular provocase un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por la estimulación de los receptores purinérgicos presentes en las células trabeculares.

Primeramente se monitorizaron los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras someter a las células trabeculares a una solución hiposmótica del 40% (205 mOsm/Kg). Las células trabeculares no mostraron picos de Ca^{2+} , siendo los incrementos de los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 129 ± 3 nM; (n = 86 células; Figura 4.18).

Se planteó la posibilidad que el ATP liberado por el estímulo hiposmótico fuera degradado por ectonucleotidasas presentes en la superficie de las células, no llegando así a estimular los receptores de las células trabeculares. Así pues, pensando en esta posibilidad, se preincubaron las células con un inhibidor de las ectonucleotidasas, el ARL67156 durante 4 minutos a la concentración de 10^{-4} M, previamente a la adición de una solución hiposmótica. En estas condiciones, el choque hipotónico producía picos de Ca^{2+} de magnitud de 418 ± 97 nM; (n = 119 células; Figura 4.18).

Por último y para testar una posible implicación del receptor P2Y_2 , se miró la cantidad de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se movilizaba en las células trabeculares tras un estímulo hiposmótico en presencia del inhibidor de la ectonucleotidasas ARL67165 y el antagonista purinérgico suramina. Se preincubaron las células a 37°C durante 4 minutos en presencia de suramina 10^{-4} M y ARL67156 a 10^{-4} M. Tras este periodo se sometió a las células a una solución hiposmótica del 40%. Los picos de calcio que se produjeron fueron de 198 ± 95 nM (n=49 células). Esta serie de experimentos se muestran en la Figura 4.18.

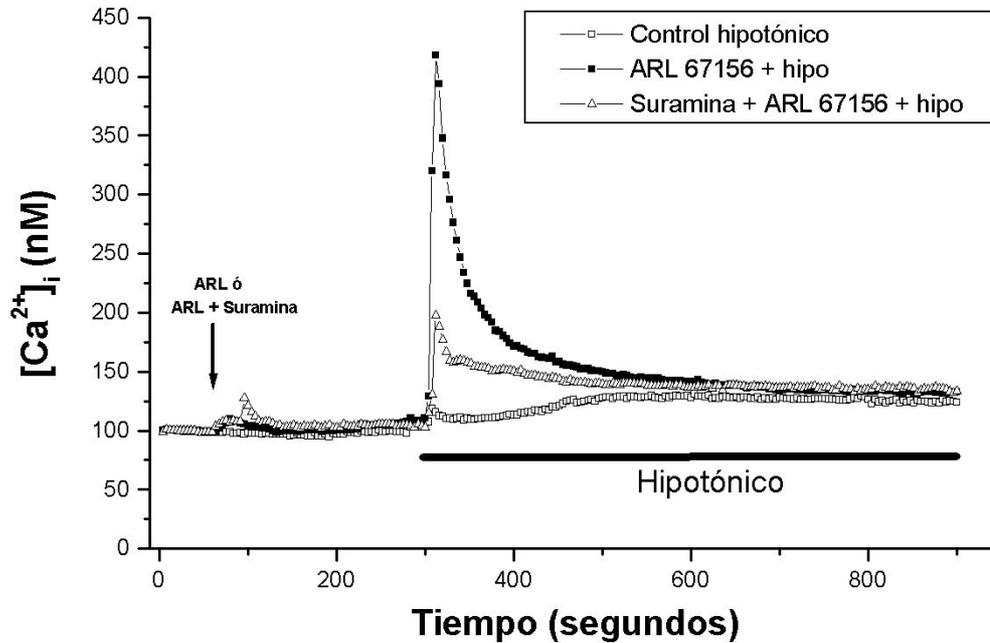


Figura 4.18. Movilizaciones de $[Ca^{2+}]_i$ como consecuencia de un choque hiposmótico. Se muestran las medias de tres grupos de experimentos. El grupo control (\square ; $n=96$ células) fue sometido a una solución hipotónica del 40% (205 mOsm/Kg). En un segundo grupo de experimentos (\blacksquare ; $n=119$ células) se preincubó 4 minutos con ARL67156 10^{-4} M previamente a la aplicación de la solución hipotónica. En el grupo (\triangle ; $n=49$ células) se preincubó con ARL67156 y suramina, ambas sustancias a la concentración de 10^{-4} M durante 4 minutos previos a la adición de solución hipotónica. En ordenadas se muestra el $[Ca^{2+}]_i$ en nM y en abcisas el tiempo en segundos. La flecha indica el lugar de adición del ARL67156 o ARL65167 + suramina, mientras que la línea horizontal muestra el tiempo de experimento en el cual las células estuvieron sometidas a la solución hipotónica.

4.6. Efecto del ATP sobre la facilidad de evacuación

Debido a los efectos observados a nivel celular, se quiso estudiar la capacidad del ATP en la modulación de la facilidad de evacuación a través de su actuación a nivel de la red trabecular.

Con el fin de establecer las condiciones control, se realizaron una serie de experimentos en los que se llevó a cabo el mismo protocolo experimental que el que se utilizó en el resto de experimentos en el que en el periodo de droga se perfundió únicamente con medio de perfusión (Tabla 4.6, Figura 4.19). En este grupo no se detectaron variaciones significativas en la facilidad de evacuación (C) a lo largo del experimento.

La perfusión con ATP a la concentración de $10^{-5}M$ no modificó la C en los segmentos anteriores bovinos perfundidos *in vitro* (Figura 4.19; Tabla 4.6) a lo largo del periodo de droga, como tampoco en el periodo de post-droga. Ante la posibilidad de degradación se perfundió en otro grupo de experimentos con el análogo del ATP de lenta hidrólisis, el ATP- ΩS a la concentración de $10^{-5}M$, el cual pese a mostrar una ligera tendencia a disminuir la C tampoco tuvo efectos significativos sobre ésta. En el periodo de post-droga la C alcanzó sus niveles basales.

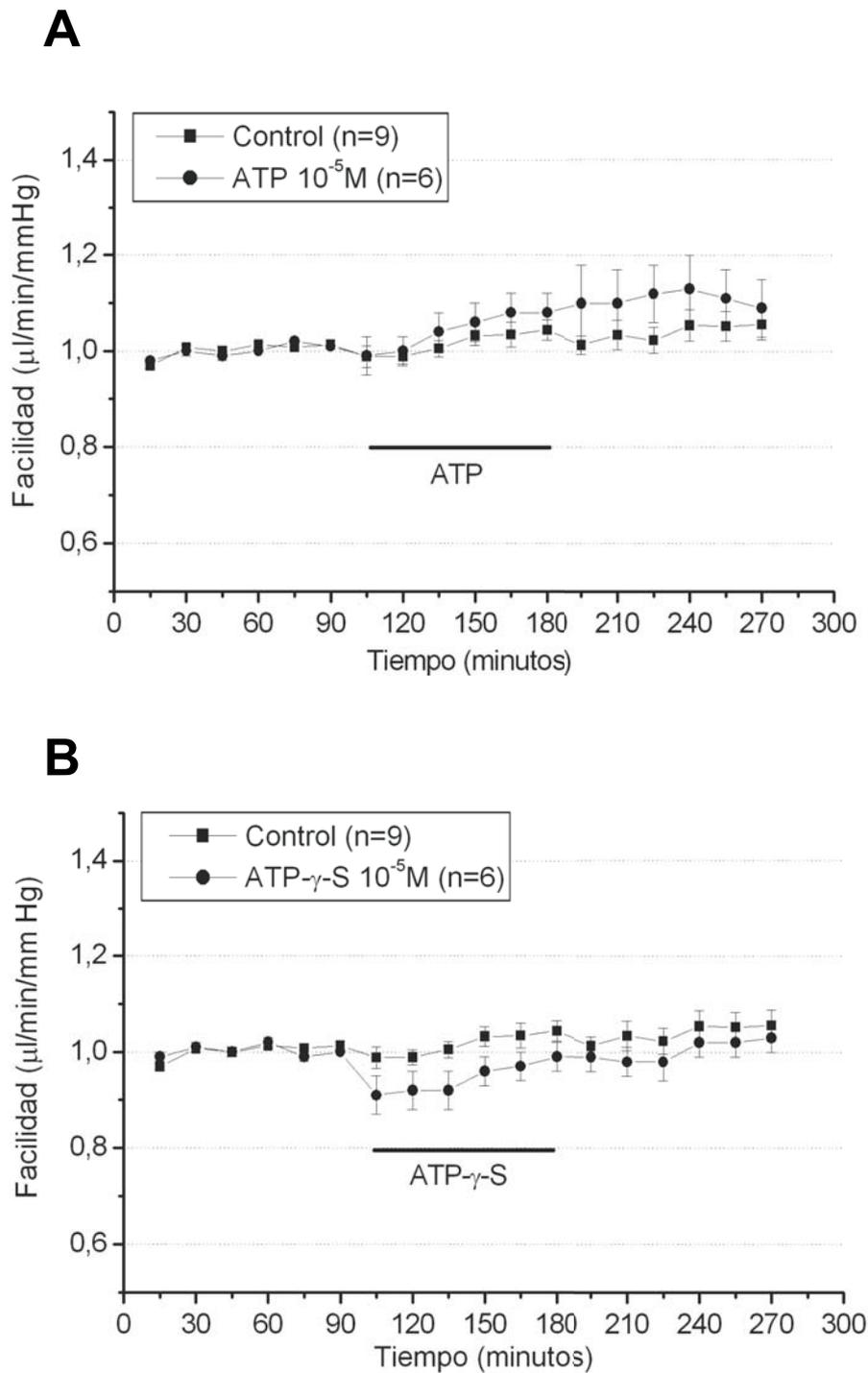


Figura 4.19. Efecto del agonista ATP (**A**) y el análogo resistente del ATP, ATP- Ω S (**B**) sobre la facilidad de evacuación de humor acuoso. En abcisas se muestra el tiempo en minutos, mientras que en ordenadas se muestra la facilidad de evacuación para cada punto expresada como $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mmHg}$. El periodo de perfusión con droga está mostrado por la línea horizontal.

Tabla 4.6. Efectos del ATP y el ATP- Ω S sobre la facilidad de evacuación (C) en segmentos anteriores bovinos.

| Droga y concentración | Periodo basal (C_0) | | | Periodo de droga (C_d) | | | Periodo post droga (C_{pd}) | | |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------|--|----------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|----|------------------------|
| | n | Media | | 30 | 60 | 90 | 30 | 60 | 90 (minutos) |
| Control (DMEM) | 9 | 0.72 \pm 0.005 (100%) | | 0.71 \pm 0.09 (98%) | 0.74 \pm 0.09 (102%) | 0.74 \pm 0.08 (102%) | | | 0.75 \pm 0.09 (104%) |
| ATP 10 ⁻⁵ M | 6 | 0.98 \pm 0.005 (100%) | | 0.97 \pm 0.08 (99%) | 1.02 \pm 0.10 (104%) | 1.05 \pm 0.10 (107%) | | | 1.06 \pm 0.10 (108%) |
| ATP- Ω S 10 ⁻⁵ M | 6 | 0.79 \pm 0.003 (100%) | | 0.74 \pm 0.11 (94%) | 0.76 \pm 0.11 (96%) | 0.79 \pm 0.12 (100%) | | | 0.82 \pm 0.12 (104%) |

C_0 = facilidad de evacuación basal; C_d = facilidad de evacuación en presencia de droga; C_{pd} = facilidad de evacuación en el periodo postdroga. Los datos se muestran como media \pm desviación estándar; n = número de segmentos anteriores perfundidos. El promedio de la relación C_d/C_0 o C_{pd}/C_0 se muestra entre paréntesis en porcentaje. Las comparaciones entre C_0 y C cada 15 minutos de experimento para todos los grupos se realizaron mediante el análisis de la varianza (One-Way ANOVA) con la corrección del test de Bonferroni. No se encontraron diferencias significativas. Las comparaciones entre las relaciones C_d/C_0 y C_{pd}/C_0 en los grupos tratados vs. los mismos parámetros (C_d/C_0 y C_{pd}/C_0) para el grupo control (DMEM) se realizaron mediante el análisis de la varianza con la corrección de Bonferroni no encontrándose diferencias significativas.

4.7. Expresión de receptores purinérgicos en las células trabeculares

Los resultados que se obtuvieron en los estudios del Ca^{2+} intracelular mostraron el siguiente perfil farmacológico de respuesta: $\text{ATP} = \text{UTP} > \text{ATP-}\Omega\text{S} \gg \text{ADP} = \text{UDP}$, lo que indicaba la existencia de un receptor P2Y_2 funcional en las células trabeculares. En estos mismos estudios de caracterización se pudo observar una respuesta en las movilizaciones de Ca^{2+} intracelular por parte de algunos de los agonistas utilizados, que podrían indicar la presencia de otros subtipos de receptores P2Y además del P2Y_2 . Concretamente, el ADP es un buen agonista del P2Y_1 además de mostrar actividad sobre otros subtipos de receptores purinérgicos. El ADP produjo respuesta en el 34% de las células con movilizaciones de Ca^{2+} significativas. De la misma forma, el estímulo con UDP provocó respuesta en el 33% de las células, respuestas que podrían deberse a la capacidad del UDP de activar con baja afinidad el receptor P2Y_2 (Ralevic, 1998). Pero por otro lado, este dinucleótido se muestra como un buen agonista del P2Y_6 , cuya presencia no podía ser desestimada. Por último, tanto el ATP como el UTP son capaces de estimular el receptor P2Y_4 con la misma sensibilidad que para el P2Y_2 . Los estudios farmacológicos no permitieron presentar evidencias de la presencia o ausencia del receptor, ya que sus efectos podrían estar enmascarados por la actividad de otros receptores. Con todas estas consideraciones surgía la posibilidad de la existencia de otros receptores purinérgicos que podrían coexistir junto con el P2Y_2 en las células de la red trabecular. Así pues, se decidió analizar la expresión de los receptores P2Y_1 , P2Y_4 , P2Y_6 y P2Y_{11} además de confirmar la de P2Y_2 en las células trabeculares en cultivo.

Respecto a los receptores ionotrópicos, se decidió no examinar su expresión en las células trabeculares ya que los datos farmacológicos obtenidos en los estudios de los efectos del ATP sobre las células trabeculares excluían su existencia en estas células de manera clara. Por un lado la falta de respuesta frente a agonistas P2X ($\Omega,\Omega\text{meATP}$ y $\Omega,\Omega\text{meATP}$) y por otro la absoluta independencia del Ca^{2+} extracelular en las respuestas, demuestran la inexistencia de receptores ionotrópicos P2X . Los experimentos de inmunocitoquímica realizados en cultivos primarios de células trabeculares demostraron la existencia de los receptores P2Y_1 , P2Y_2 y P2Y_4 . La expresión de P2Y_6 y P2Y_{11} no fue detectada en las células trabeculares (Figura 4.20 A). Mediante los experimentos de Western blot se corroboró el mismo patrón de expresión de receptores P2 que con los resultados de Inmunocitoquímica (Figura 4.20 B). Se encontraron bandas de pesos aproximados de 66 KDa para el P2Y_1 , 55 KDa para el P2Y_2 y 70 KDa para el P2Y_4 .

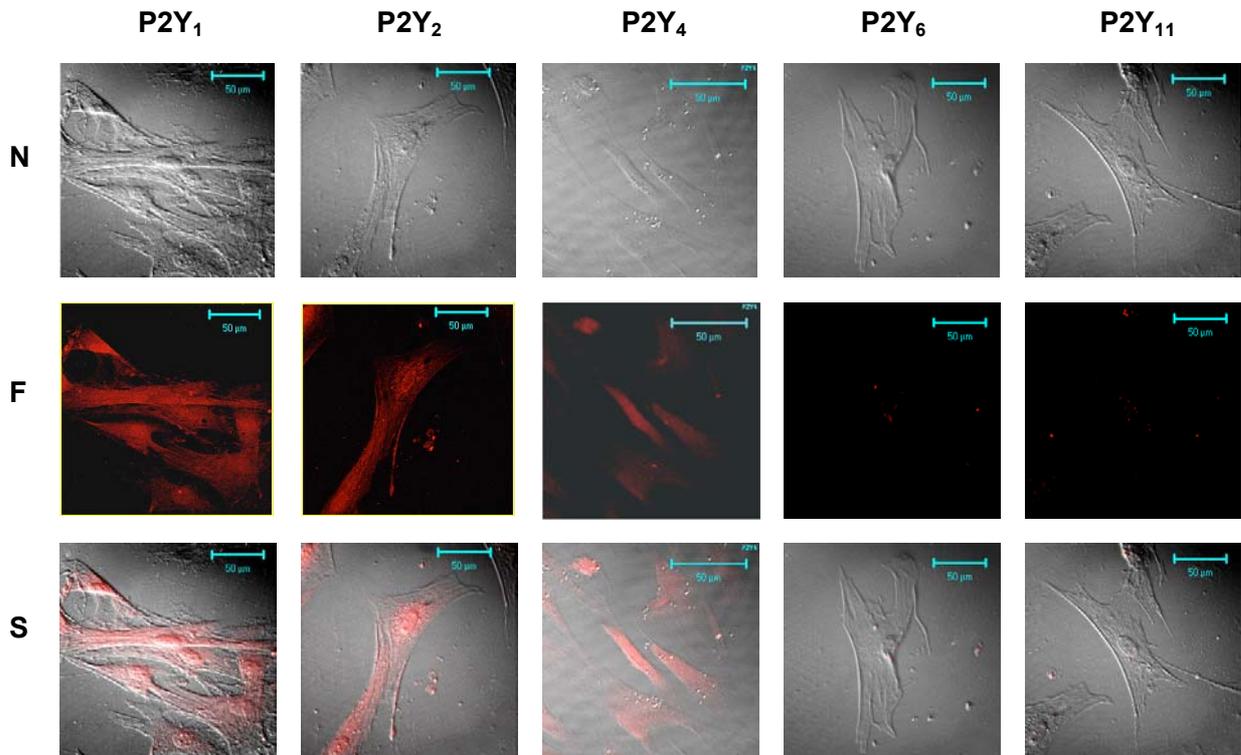
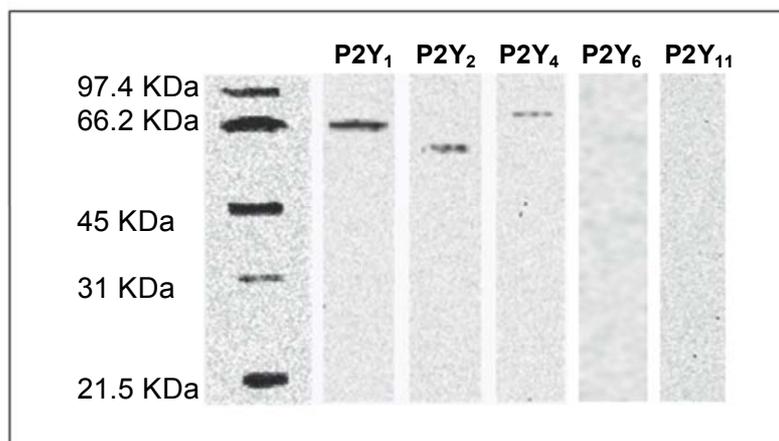
A**B**

Figura 4.20. A. Inmunocitoquímica de células trabeculares bovinas mostrando la expresión de los receptores P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₄. N, Imagen de contraste diferencial de interferencia (Nomarski); F, imagen de fluorescencia; S, superposición. **B.** Western Blot a partir de lisados de células trabeculares bovinas en los que se puede observar la expresión de los mismos receptores encontrados en A. Los receptores P2Y₆ y P2Y₁₁ parecen no encontrarse presentes en las células trabeculares.

4.8. Efecto de los dinucleótidos polifosfato en la fisiología trabecular

Los dinucleótidos polifosfato son compuestos naturales cuya presencia se ha demostrado en el humor acuoso siendo capaces de modificar la IOP (Pintor, 2003a). Estos compuestos activan diversos receptores purinérgicos y debido a la presencia de éstos en las células trabeculares, los dinucleótidos podrían mostrar efectos sobre la facilidad de evacuación mediante la activación de estos receptores. Así pues, se probaron los efectos de diferentes dinucleótidos polifosfato sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y sus efectos sobre la facilidad de evacuación.

4.8.1. Efectos sobre el Ca^{2+} intracelular

4.8.1.1 Ap_3A

El compuesto P^1, P^3 -diadenosina trifosfato (Ap_3A) se probó a diferentes concentraciones en el rango de 10^{-3} a 10^{-8} M. La máxima respuesta se consiguió a la concentración de 10^{-3} M y fue del 81% mientras que a concentraciones inferiores a 10^{-6} M el porcentaje de respuesta fue casi nulo (1% a 10^{-7} M; 3 de 216 células). Con los valores de porcentaje de respuesta se construyó una curva dosis respuesta con una EC_{50} de 11×10^{-6} M que se muestra en la Figura 4.22.

En cuanto a su habilidad para movilizar calcio intracelular, el Ap_3A elevó la $[Ca^{2+}]_i$ en 629.68 ± 34.33 nM a la máxima concentración utilizada (10^{-3} M). Con los datos obtenidos a concentraciones entre 10^{-7} y 10^{-4} M se construyó una curva dosis respuesta con una EC_{50} de 60×10^{-6} M que se muestra en la Figura 4.22. Los incrementos de Ca^{2+} a las diferentes concentraciones del agonista se muestran en la Tabla 4.7.

Se estudió la cinética de los incrementos de calcio mediante el parámetro de la T_{70} como se explica en material y métodos a la concentración de 10^{-5} M, ya que a concentraciones menores el porcentaje de respuesta frente al agonista resultaba muy pobre. El tiempo transcurrido desde el máximo incremento de calcio hasta la recuperación del 70 % del pico fue de 33.71 ± 4.27 segundos ($n = 86$ células; Figura 4.23 y Tabla 4.7).

A la misma concentración de 10^{-5} M, de las células que respondieron de manera positiva, el 26% (22 de 86 células) mostró más de un pico, como se muestra en la Figura 4.21.

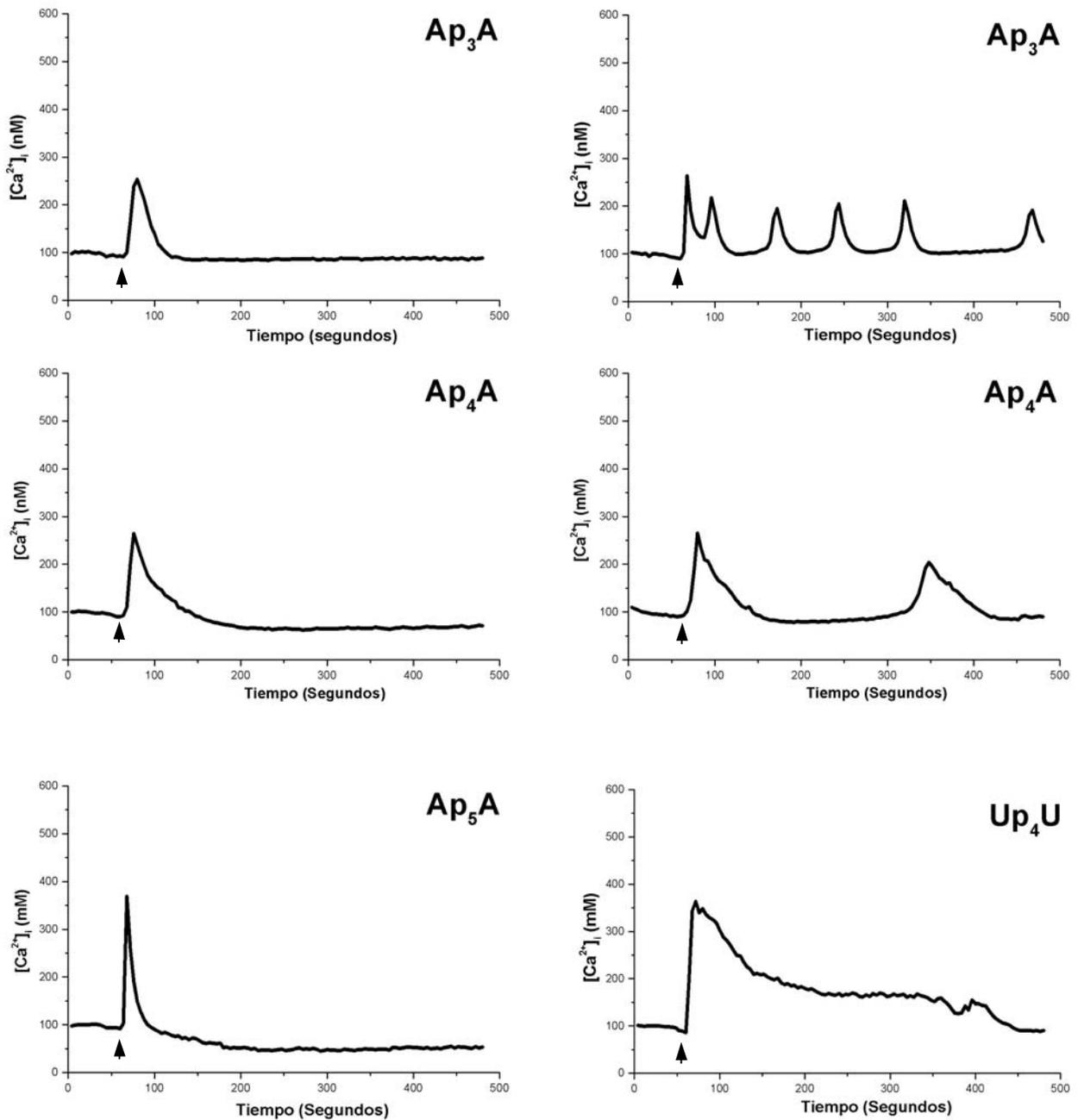


Figura 4.21. Movilizaciones de Ca^{2+} intracelular inducidas por dinucleótidos polifosfato en células trabeculares bovinas. Se muestran experimentos representativos con los distintos dinucleótidos a 10^{-5} M. Para el Ap_3A y el Ap_4A están representados experimentos en los cuales se observan diferentes perfiles de respuesta. Cabe destacar la diferente respuesta de las células frente al Up_4U (más larga y sostenida) con respecto a las obtenidas con los compuestos diadenosina polifosfatos (más cortas). La flecha indica el momento en el que se aplica la droga.

4.8.1.2 Ap₄A

El compuesto P¹,P⁴-diadenosina tetrafosfato (Ap₄A) se probó a diferentes concentraciones en el rango de 10⁻³ a 10⁻⁹M. La máxima respuesta se consiguió a la concentración de 10⁻³M y fue del 86 % mientras que a concentraciones inferiores a 10⁻⁶M el porcentaje de respuesta fue igual al de los experimentos control (2% a 10⁻⁷M; 4 de 186 células). Con los valores de respuesta se construyó una curva dosis respuesta con una EC₅₀ de 61 x 10⁻⁶M que se muestra en la Figura 4.22.

El Ap₄A elevó la [Ca²⁺]_i en 667.95 ± 31.60 nM a la máxima concentración testada (10⁻³M). Los picos de calcio movilizado frente al resto de concentraciones (10⁻⁹ y 10⁻⁴M) de agonista se muestran en la Tabla 4.7. Con estos datos se construyó una curva dosis respuesta con una EC₅₀ de 11 x 10⁻⁶M mostrada en la Figura 4.22.

El tiempo transcurrido desde el máximo incremento de calcio hasta la recuperación del 70% del pico (T₇₀) a la concentración de 10⁻⁵M fue de 33.22 ± 1.61 segundos (n = 60 células; Figura 4.23). A esta concentración, el 60% de las células (36 de 60) mostraron más de un pico de calcio.

4.8.1.3 Ap₅A

El compuesto P¹,P⁵-diadenosina pentafosfato (Ap₅A) se probó a diferentes concentraciones en el rango de 10⁻³ a 10⁻⁷M. La máxima respuesta fue del 97 % a la concentración de 10⁻³M. A concentraciones inferiores a 10⁻⁵M la respuesta no fue significativamente diferente a la del control. Con estos valores de respuesta se elaboró una curva dosis respuesta con una EC₅₀ de 45 x 10⁻⁶M (Figura 4.22)

El pico máximo de [Ca²⁺]_i fue de 532.75 ± 12.82 nM a la concentración de 10⁻³M. Con los datos obtenidos a concentraciones inferiores del agonista (Tabla 4.7) se construyó una curva dosis respuesta con una EC₅₀ de 64 x 10⁻⁶M (Figura 4.22).

La T₇₀ a la concentración de 10⁻⁵M para el Ap₅A fue de 15.00 ± 2.08 segundos (n = 14 células; Figura 4.23). Ninguna de estas células mostró segundos picos. En la Figura 4.21 se muestra la respuesta típica de una célula trabecular a la aplicación de Ap₅A a 10⁻⁵M.

4.8.1.4 Up₄U

El P¹,P⁴-diuridina tetrafosfato (Up₄U) es un compuesto derivado del UTP de reciente diseño (Pendergast, 2001) que se ha mostrado como un buen agonista de los receptores P2Y₂ y P2Y₄. Dicha droga fue usada a diferentes concentraciones en el rango de 10⁻⁴ a 10⁻⁹M para estimular las células trabeculares. El máximo porcentaje de respuesta se consiguió a la concentración de 10⁻⁴M y fue del 82 %. A concentraciones inferiores a 10⁻⁷M el porcentaje de respuesta fue del 2% (10⁻⁸ y 10⁻⁹M). Con los valores de respuesta se construyó una curva dosis respuesta que se muestra en la Figura 4.22. El Up₄U se mostró como el dinucleótido más potente de todos los testados con una EC₅₀ de 0.68 x 10⁻⁶M.

El Up₄U elevó el [Ca²⁺]_i en 402.75 ± 10.25 nM a la máxima concentración testada (10⁻⁴M). Los picos de calcio movilizado frente al resto de concentraciones (10⁻⁹ y 10⁻⁴M) de agonista se muestran en la Tabla 4.7. Con estos datos se construyó una curva dosis respuesta con una EC₅₀ de 1.38 x 10⁻⁶M (Figura 4.22).

El tiempo transcurrido desde el máximo incremento de calcio hasta la recuperación del 70 % del pico (T₇₀) a la concentración de 10⁻⁵M fue de 123.4 0 ± 7.47 segundos (n = 101 células; Figura 4.23). A 10⁻⁵M, el 22% de las células que respondieron al Up₄U mostraron más de un pico de calcio.

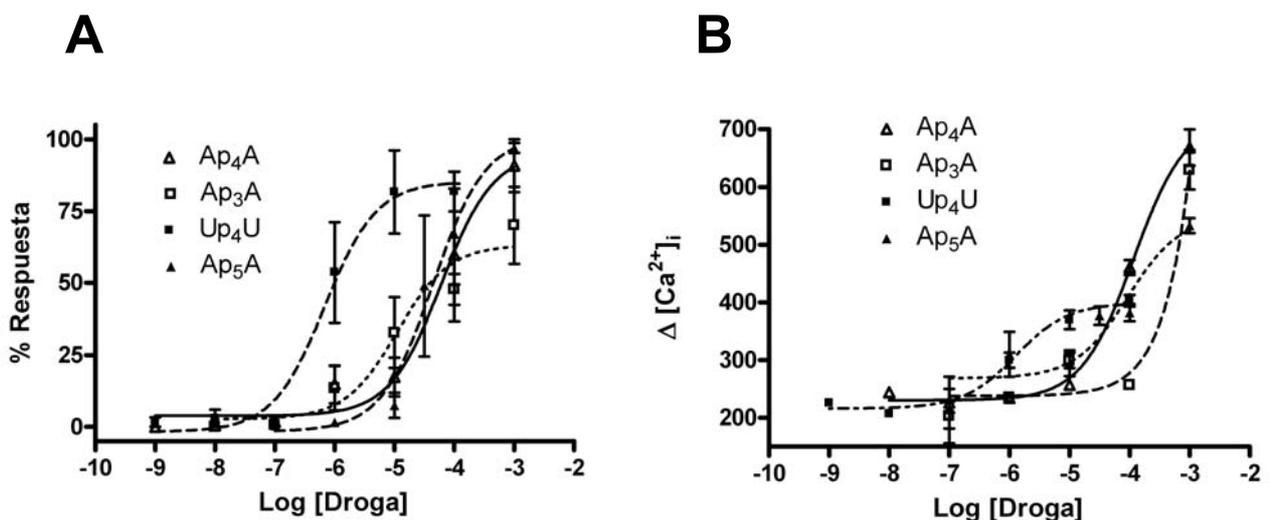


Figura 4.22. Curvas dosis-respuesta para los diferentes dinucleótidos polifosfato en células BTMs. En **A**, se muestra en ordenadas el porcentaje de respuesta y en abscisas el logaritmo de la concentración utilizada. En **B**, se muestran en el eje de ordenadas los incrementos de [Ca²⁺]_i producidos por los dinucleótidos frente al logaritmo de la concentración de droga en abscisas.

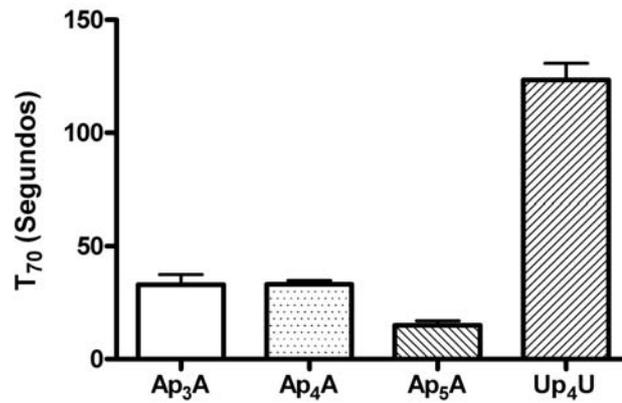


Figura 4.23. El parámetro de la T_{70} (tiempo en que los incrementos del $[Ca^{2+}]_i$ tardan en recuperarse hasta el 70% de los niveles basales, en segundos) del Ap₃A (T_{70} de 33.71 ± 4.28 segundos) y el Ap₄A (T_{70} de 33.22 ± 1.61 segundos) indica que los picos producidos por los Ap_nAs son más breves que los producidos por el Up₄U. El Up₄U provoca incrementos en el Ca^{2+} más sostenidos a lo largo del tiempo, con valores de T_{70} de 123.40 ± 7.47 segundos.

Tabla 4.7. Efecto de los dinucleótidos polifosfato sobre el $[Ca^{2+}]_i$ en células trabeculares bovinas en cultivo.

| Ap_nAs | Nº Respuestas / células analizadas | % respuesta | $[Ca^{2+}]_i$ basal (nmol/L) | $\Omega[Ca^{2+}]_i$ máximo (nmol/L) | T_{70} (seg) |
|---------------------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------|---|-------------------|
| Control (Vehículo) | 7/275 | 3% | 64 ± 5 | 108 ± 20 | - |
| Ap_3A | | | | | |
| 10 ⁻⁸ M | 0/144 | 0% | 69 ± 12 | - | - |
| 10 ⁻⁷ M | 3/216 | 1% | 65 ± 10 | 248 ± 21 ^(¶¶) | - |
| 10 ⁻⁶ M | 25/209 ^(§§) | 2% | 77 ± 23 | 235 ± 7 ^(¶¶¶) | - |
| 10 ⁻⁵ M | 85/269 ^(§§) | 32% | 71 ± 9 | 299 ± 13 ^(¶¶¶) | - |
| 10 ⁻⁴ M | 82/166 ^(§§) | 49% | 87 ± 9 | 257 ± 7 ^(¶¶¶) | 33.7 |
| 10 ⁻³ M | 132/162 ^(§§) | 81% | 79 ± 8 | 630 ± 34 ^(¶¶¶¶) | - |
| Ap_4A | | | | | |
| 10 ⁻⁹ M | 0/88 | 0% | 88 ± 11 | - | - |
| 10 ⁻⁸ M | 1/176 | 1% | 86 ± 10 | 244 | - |
| 10 ⁻⁷ M | 4/186 | 2% | 79 ± 12 | 226 ± 45 ^(¶¶) | - |
| 10 ⁻⁶ M | 46/230 ^(§§) | 20% | 78 ± 8 | 235 ± 4 ^(¶¶¶) | - |
| 10 ⁻⁵ M | 60/301 ^(§§) | 20% | 66 ± 7 | 257 ± 7 ^(¶¶¶) | 33.2 |
| 10 ⁻⁴ M | 146/241 ^(§§) | 61% | 76 ± 16 | 460 ± 13 ^(¶¶¶) | - |
| 10 ⁻³ M | 243/282 ^(§§) | 86% | 77 ± 8 | 668 ± 32 ^(¶¶¶¶) | - |
| Ap_5A | | | | | |
| 10 ⁻⁷ M | 2/124 | 2% | 72 ± 7 | 219 ^(¶) | - |
| 10 ⁻⁶ M | 11/317 | 3% | 64 ± 7 | 310 ± 39 ^(¶¶) | - |
| 10 ⁻⁵ M | 14/186 ^(§) | 8% | 73 ± 26 | 294 ± 23 ^(¶¶¶) | 15.0 |
| 5 x 10 ⁻⁵ M | 53/128 ^(§§) | 41% | 55 ± 5 | 377 ± 16 ^(¶¶¶) | - |
| 10 ⁻⁴ M | 131/187 ^(§§) | 70% | 61 ± 5 | 382 ± 15 ^(¶¶¶) | - |
| 10 ⁻³ M | 97/100 ^(§§) | 97% | 110 ± 3 | 533 ± 13 ^(¶¶¶) | - |
| Up_4U | | | | | |
| 10 ⁻⁹ M | 3/161 | 2% | 100 ± 13 | 223 ± 7 ^(¶¶) | - |
| 10 ⁻⁸ M | 2/132 | 2% | 103 ± 20 | 207 ^(¶) | - |
| 10 ⁻⁷ M | 19/160 ^(§§) | 12% | 83 ± 13 | 373 ± 30 ^(¶¶¶) | - |
| 10 ⁻⁶ M | 49/109 ^(§§) | 45% | 100 ± 8 | 300 ± 13 ^(¶¶¶) | - |
| 10 ⁻⁵ M | 101/137 ^(§§) | 74% | 113 ± 13 | 369 ± 16 ^(¶¶¶) | 123.4 |
| 10 ⁻⁴ M | 244/297 ^(§§) | 82% | 84 ± 8 | 403 ± 10 ^(¶¶¶) | - |

Las comparaciones entre la proporción de células que respondieron en el grupo control y en los grupos tratados con Ap_nAs ([§]) se hicieron usando un test de Fisher donde ([§]) $p < 0.05$ y (^{§§}) $p < 0.001$. Las comparaciones entre la medida del pico de $[Ca^{2+}]_i$ mostrado por las células trabeculares en el grupo control y los grupos tratados con Ap_nAs ([¶]) se hicieron usando una t de Student desapareada donde ([¶]) $p < 0.05$, (^{¶¶}) $p < 0.01$ y (^{¶¶¶}) $p < 0.001$.

4.8.2. Efectos sobre la facilidad de evacuación

Los dinucleótidos polifosfato han demostrado su capacidad para modificar la IOP. El Ap₃A y el Ap₅A provocan un aumento de la IOP tras ser aplicados tópicamente, mientras que por el contrario, el Ap₄A posee una acción hipotensora (Pintor, 2003a). Se probaron los mismos dinucleótidos que en el estudio anterior sobre la facilidad de evacuación por la vía trabecular.

El Ap₃A a 10⁻⁶M no modificó significativamente la facilidad de evacuación (C) basal durante el periodo de droga (Tabla 4.8 y Figura 4.24A), aunque incrementó (P<0.01; *two-way* ANOVA) la C al final del periodo post droga en el que se perfundió únicamente con DMEM.

En la Figura 4.24B se muestra que el Ap₄A a la concentración de 10⁻⁶M incrementó significativamente la C al final del periodo de droga (P<0.01; *two-way* ANOVA; Tabla 4.8). En el periodo de retorno la C continuó la tendencia a aumentar hasta llegar a un incremento máximo del 25%, al final de los 90 minutos de protocolo post-droga.

El efecto del compuesto Ap₅A a 10⁻⁶M fue una disminución discreta de la C (6%) en el periodo de droga, que no presentó diferencias significativas con las perfusiones control (Figuras 4.25A y Tabla 4.8). Tras retirar el compuesto del medio de perfusión, la C retornó a los niveles basales al final del protocolo experimental.

La perfusión con Up₄U (INS365) a la concentración de 10⁻⁶M no modificó significativamente la C basal ni durante el periodo de droga ni en el periodo post droga (Figura 4.25B y Tabla 4.8).

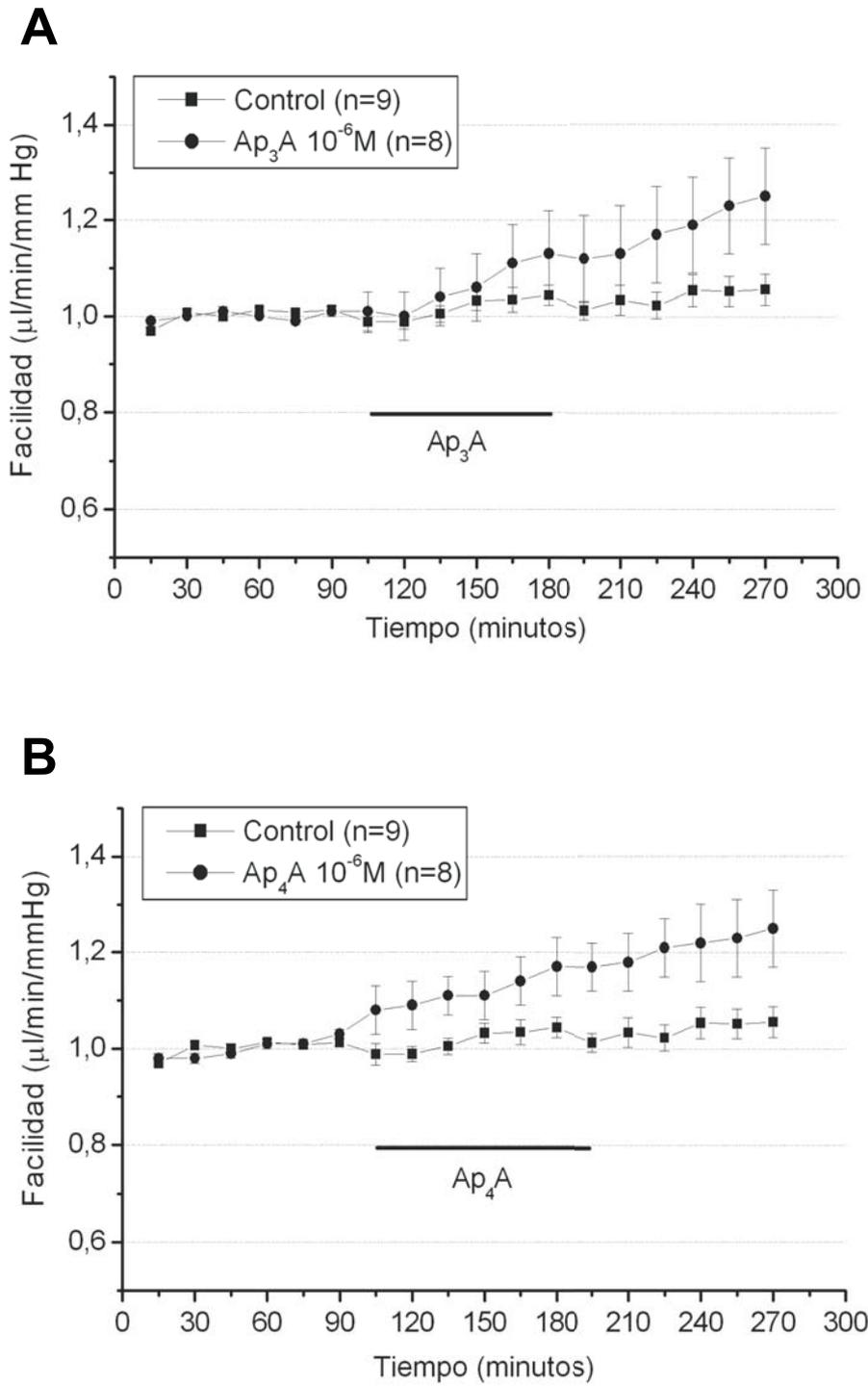


Figura 4.24. Efecto de los dinucleótidos polifosfato Ap₃A (**A**) y Ap₄A (**B**) sobre la facilidad de evacuación de humor acuoso. En abcisas se indica el tiempo en minutos mientras que en ordenadas se muestra la facilidad de evacuación para cada punto. El periodo en el cual se perfunde medio con droga se muestra en la línea horizontal.

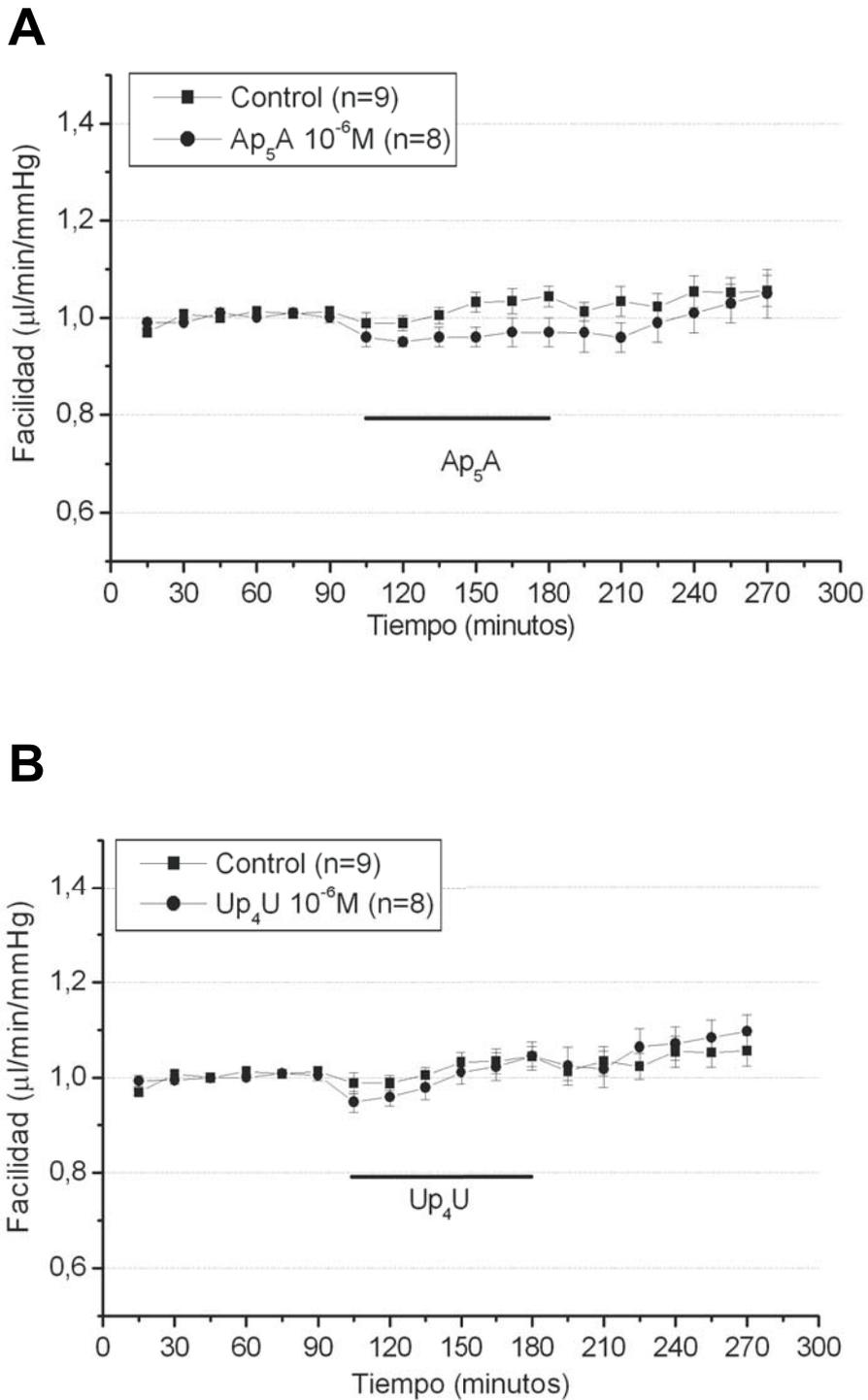


Figura 4.25. Efecto de los dinucleótidos polifosfato Ap_5A (**A**) y Up_4U (**B**) sobre la facilidad de evacuación de humor acuoso. En abscisas se muestra el tiempo en minutos mientras que en ordenadas se muestra la facilidad de evacuación para cada punto. El periodo en el cual se perfunde medio con droga se muestra en la línea horizontal.

Tabla 4.8. Efectos de los dinucleótidos polifosfato sobre la facilidad de evacuación (C) en segmentos anteriores bovinos.

| Droga y concentración | n | Periodo basal (C_0) | | | Periodo de droga (C_d) | | | Periodo post droga (C_{pd}) | | |
|--------------------------------------|---|-------------------------|------------------|------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | | Media | 30 | 60 | 90 | 30 | 60 | 90 | 30 | 60 |
| Control | 9 | 0.72±0.005 (100%) | 0.71±0.09 (98%) | 0.74±0.09 (102%) | 0.74±0.08 (102%) | 0.74±0.09 (102%) | 0.74±0.08 (102%) | 0.75±0.09 (104%) | 0.75±0.09 (104%) | 0.75±0.09 (104%) |
| Ap ₃ A 10 ⁻⁶ M | 8 | 0.69±0.002 (100%) | 0.66±0.06 (95%) | 0.70±0.07 (101%) | 0.74±0.07 (107%) | 0.74±0.07 (107%) | 0.74±0.07 (107%) | 0.82±0.08 (118%) ^{\$\$\$} | 0.82±0.08 (118%) ^{\$\$\$} | 0.82±0.08 (118%) ^{\$\$\$} |
| Ap ₄ A 10 ⁻⁶ M | 8 | 0.60±0.005 (100%) | 0.64±0.11 (106%) | 0.66±0.12 (110%) | 0.70±0.14 (116%) ^{\$\$} | 0.70±0.14 (116%) ^{\$\$} | 0.70±0.14 (116%) ^{\$\$} | 0.75±0.15 (125%) ^{\$\$\$*} | 0.75±0.15 (125%) ^{\$\$\$*} | 0.75±0.15 (125%) ^{\$\$\$*} |
| Ap ₅ A 10 ⁻⁶ M | 8 | 0.97±0.003 (100%) | 0.92±0.10 (94%) | 0.93±0.10 (95%) | 0.94±0.11 (96%) | 0.94±0.11 (96%) | 0.94±0.11 (96%) | 1.01±0.12 (104%) | 1.01±0.12 (104%) | 1.01±0.12 (104%) |
| Up ₄ U 10 ⁻⁶ M | 8 | 0.69±0.002 (100%) | 0.66±0.07 (96%) | 0.70±0.07 (101%) | 0.72±0.08 (104%) | 0.72±0.08 (104%) | 0.72±0.08 (104%) | 0.75±0.08 (108%) ^{\$\$\$} | 0.75±0.08 (108%) ^{\$\$\$} | 0.75±0.08 (108%) ^{\$\$\$} |

C_0 = facilidad de evacuación basal; C_d = facilidad de evacuación en presencia de droga; C_{pd} = facilidad de evacuación en el periodo postdroga. Los datos se muestran como media ± desviación estándar; n = número de segmentos anteriores perfundidos. El promedio de la relación C_d/C_0 o C_{pd}/C_0 se muestra entre paréntesis. Las comparaciones entre C_0 y C cada 15 minutos de experimento para todos los grupos se realizó mediante el análisis de la varianza (One-Way ANOVA) con la corrección de Bonferroni donde, (^{\$\$}) p<0.01 y (^{\$\$\$}) p<0.001. Las comparaciones entre las relaciones C_d/C_0 y C_{pd}/C_0 en los grupos tratados vs. los mismos parámetros (C_d/C_0 y C_{pd}/C_0) para el grupo control (DMEM) se realizaron mediante el análisis de la varianza con la corrección de Bonferroni. La significación en todos los casos se estableció en: (*) p<0.05.

4.9. Caracterización farmacológica del receptor P2Y₁ en la red trabecular

A la vista de los resultados obtenidos, se puede hipotetizar que los efectos sobre la facilidad de evacuación que median el Ap₃A y el Ap₄A podrían ser atribuibles a la actuación sobre receptores P2. La actuación sobre los receptores P2Y₂ y P2Y₄ es poco probable por el nulo efecto del Up₄U (potente agonista de ambos receptores) sobre la facilidad de evacuación. De esta manera, la activación del receptor P2Y₁ podría producir los efectos observados por el Ap₃A y el Ap₄A. Ya que los resultados de inmunocitoquímica y western blot indicaron la presencia del receptor P2Y₁, se consideró llevar a cabo un estudio funcional más detallado del receptor. Así pues, se investigaron los efectos de agonistas y antagonistas del receptor sobre la [Ca²⁺]_i y la facilidad de evacuación.

4.9.1. Efectos de la estimulación del receptor P2Y₁ sobre la [Ca²⁺]_i

La aplicación del agonista purinérgico específico de los receptores P2Y₁, 2-MeS-ADP a 10⁻⁶M, produjo respuesta en el 80% de las células (232 de 290; Figura 4.27 y Tabla 4.9) y elevó los niveles de [Ca²⁺]_i hasta 384.45 ± 10 nM (Figura 4.26 y 4.28). De las 232 células que respondieron, el 25 % (58 de 232) mostraron segundos picos durante el tiempo que duró el experimento.

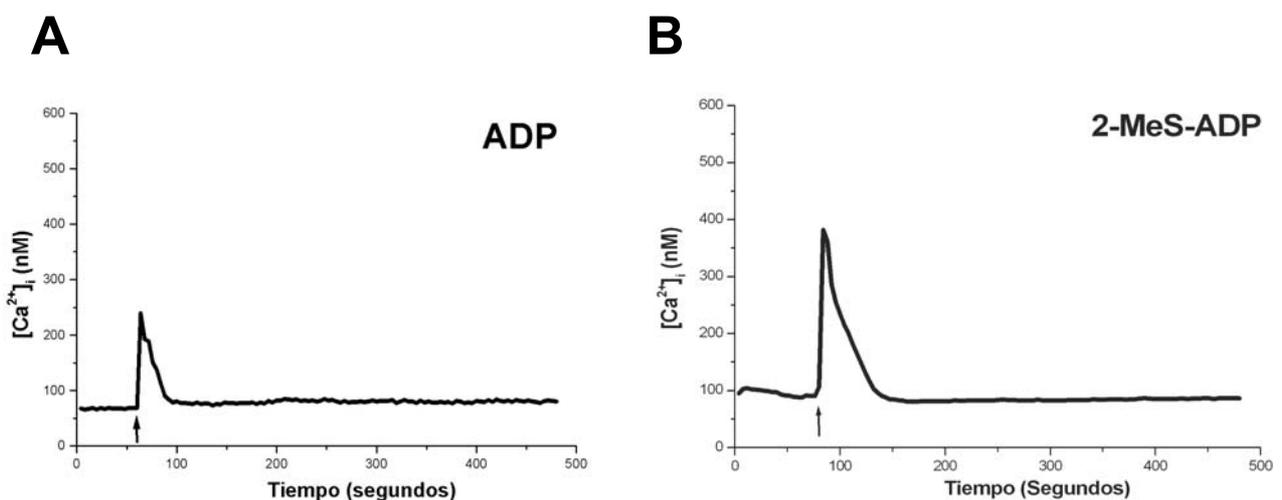


Figura 4.26. Movilizaciones del [Ca²⁺]_i inducidas por dos agonistas purinérgicos del receptor P2Y₁ a la concentración de 10⁻⁶M. Se muestra un experimento típico para el agonista ADP (A) y el agonista selectivo 2-MeS-ADP (B). El patrón de movilización de Ca²⁺ generado es muy similar en los dos compuestos, mostrándose el 2-MeS-ADP como un agonista más efectivo. En ordenadas se muestra la [Ca²⁺]_i en nM y en abcisas el tiempo en segundos. La flecha indica el momento en el cual se añadió la droga.

Se probaron distintos antagonistas no específicos, la suramina, el PPADS y el antagonista específico MRS2179. En los experimentos en los que se utilizó el antagonista suramina, las células trabeculares fueron preincubadas durante 10 minutos antes del experimento con la suramina a una concentración de 10^{-4} M a 37°C . A continuación, se probó la acción del agonista 2-MeS-ADP a la concentración de 10^{-6} M en presencia del antagonista en el baño. Los resultados se muestran en la Tabla 4.9. La respuesta de las células trabeculares preincubadas con suramina al agonista 2-MeS-ADP 10^{-6} M fue del 61% (188 de 306 células). Los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producidos por el 2-MeS-ADP a la concentración de 10^{-6} M en presencia de suramina fueron de 379 ± 12 nM.

En los experimentos en los que se usó el PPADS como antagonista previamente a la adición del 2-MeS-ADP, el antagonista se incubó con las células trabeculares durante 10 minutos antes del experimento a una concentración de 10^{-5} M y a 37°C . A continuación, se probó la acción del 2-MeS-ADP a la concentración de 10^{-6} M sobre las células trabeculares en presencia del antagonista PPADS en el baño. Estos resultados se muestran en la Tabla 4.9. La respuesta de las células trabeculares preincubadas con PPADS al agonista 2-MeS-ADP 10^{-6} M fue del 10% (15 de 155 células) frente al 80% de respuesta positiva sin el PPADS. Los picos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ producidos por el 2-MeS-ADP a 10^{-6} M en presencia del PPADS fueron de 334 ± 18 nM.

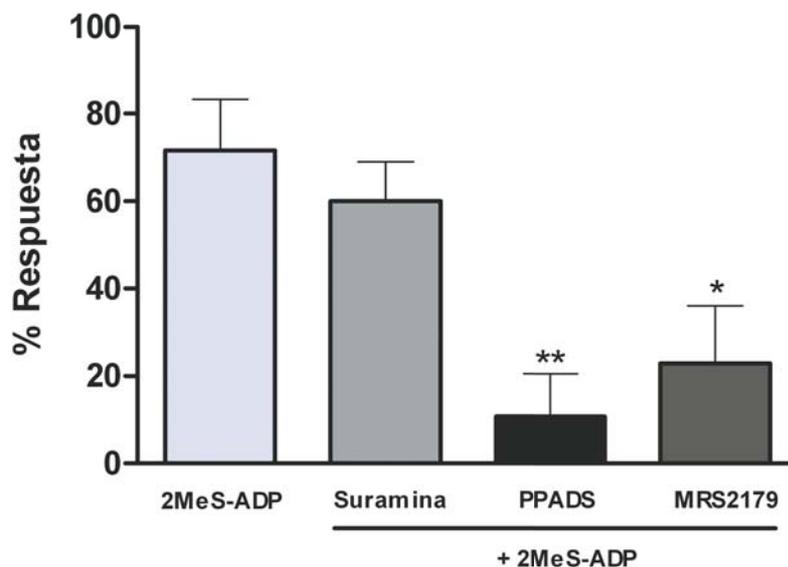


Figura 4.27. Diagrama de barras donde se muestra el porcentaje de respuesta de las células trabeculares bovinas al agonista 2-MeS-ADP a 10^{-6} M en presencia de distintos antagonistas purinérgicos. La suramina se utilizó a 10^{-4} M. El PPADS y el MRS2175 se utilizaron a 10^{-5} M. Las comparaciones entre el porcentaje de respuesta para el grupo de 2-MeS-ADP y los distintos grupos con antagonistas (*) se realizaron mediante un t-test donde (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$.

Se quiso probar el efecto del antagonista selectivo del receptor P2Y₁, MRS2179, en las células trabeculares. En primer lugar, y como control, se miró el efecto de este compuesto sobre los niveles de [Ca²⁺]_i. El porcentaje de células que respondieron a la adición de MRS2179 a 10⁻⁵M fue del 2% (1 de 42; Tabla 4.9).

Tras comprobar el efecto del MRS2179, se estimuló las células con el agonista del receptor P2Y₁, 2-MeS-ADP a 10⁻⁶M. En estos experimentos se preincubó el antagonista MRS2179 durante 10 minutos a 37°C a la concentración de 10⁻⁵M antes del experimento. A continuación, se probó la acción del agonista 2-MeS-ADP en presencia del antagonista en el baño. Los resultados se muestran en la Tabla 4.9 y la Figura 4.27. La adición de 2-MeS-ADP 10⁻⁶M produjo una respuesta en el 19% de las células trabeculares (36 de 194), que resultó significativamente inferior frente al 80% de respuesta sin el antagonista MRS2179. A su vez, los picos de [Ca²⁺]_i en presencia del antagonista fueron de 283 ± 13 nM.

Tabla 4.9. Efecto de diferentes agonistas y antagonistas del receptor P2Y₁ sobre el [Ca²⁺]_i en células trabeculares bovinas en cultivo.

| Droga | Nº Respuestas / células analizadas | % respuesta | [Ca ²⁺] _i basal (nmol/L) | [Ca ²⁺] _i máximo (nmol/L) |
|----------------------|------------------------------------|-------------|---|--|
| Control (Vehículo) | 7/275 | 3% | 64 ± 5 | 108 ± 20 |
| ADP | 145/427 [§] | 34% | 71 ± 5 | 339 ± 11 ^{¶¶} |
| 2-MeS-ADP | 232/290 [§] | 80% | 88 ± 10 | 384 ± 10 ^{¶¶} |
| Suramina + 2-MeS-ADP | 188/290* | 61% | 92 ± 6 | 379 ± 12 |
| PPADS + 2-MeS-ADP | 15/155** | 10% | 103 ± 5 | 334 ± 18 |
| MRS2179 + 2-MeS-ADP | 36/194** | 19% | 150 ± 27 | 283 ± 13 [¥] |

Los datos se muestran como media ± desviación estándar. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: ADP y 2-MeS-ADP a 10⁻⁶M; PPADS y MRS2179 a 10⁻⁵M; Suramina a 10⁻⁴M. Las comparaciones entre el porcentaje de células que respondieron en el grupo control y en los grupos tratados con los distintos agonistas ([§]), se hicieron usando un test de Fisher donde ([§]) p<0.001. De la misma forma, las comparaciones entre el % de células que respondieron al 2-MeS-ADP y en los grupos tratados con antagonistas (*) se hicieron usando un test de Fisher donde (*) p<0.05 y (**) p<0.001. Las comparaciones entre la medida del pico de [Ca²⁺]_i mostrado por las células trabeculares en el grupo control y los grupos tratados con agonistas (^{¶¶}) se hicieron usando una t de Student desapareada donde (^{¶¶}) p<0.05, (^{¶¶¶}) p<0.001. Las comparaciones entre la medida del pico de [Ca²⁺]_i mostrado por las células trabeculares en el grupo 2-MeS-ADP y los grupos tratados con antagonistas ([¥]) se hicieron usando una t de Student desapareada donde ([¥]) p<0.001.

4.9.2. Papel del receptor P2Y₁ sobre la facilidad de evacuación

En la Figura 4.28 se muestran experimentos que se realizaron con el Ap₄A, compuesto cuya habilidad para aumentar la C se había demostrado previamente, conjuntamente con el antagonista selectivo del receptor P2Y₁, el MRS2179. De esta manera se estudiaba la implicación del receptor P2Y₁ en la acción del dinucleótido polifosfato Ap₄A. La perfusión con ambas sustancias presentaba un menor aumento de la C durante todo el periodo posterior a la adición de las drogas, aunque las únicas diferencias significativas con respecto a las perfusiones en las que tan sólo se perfundía con Ap₄A, se encontraron hacia el final del protocolo de perfusión.

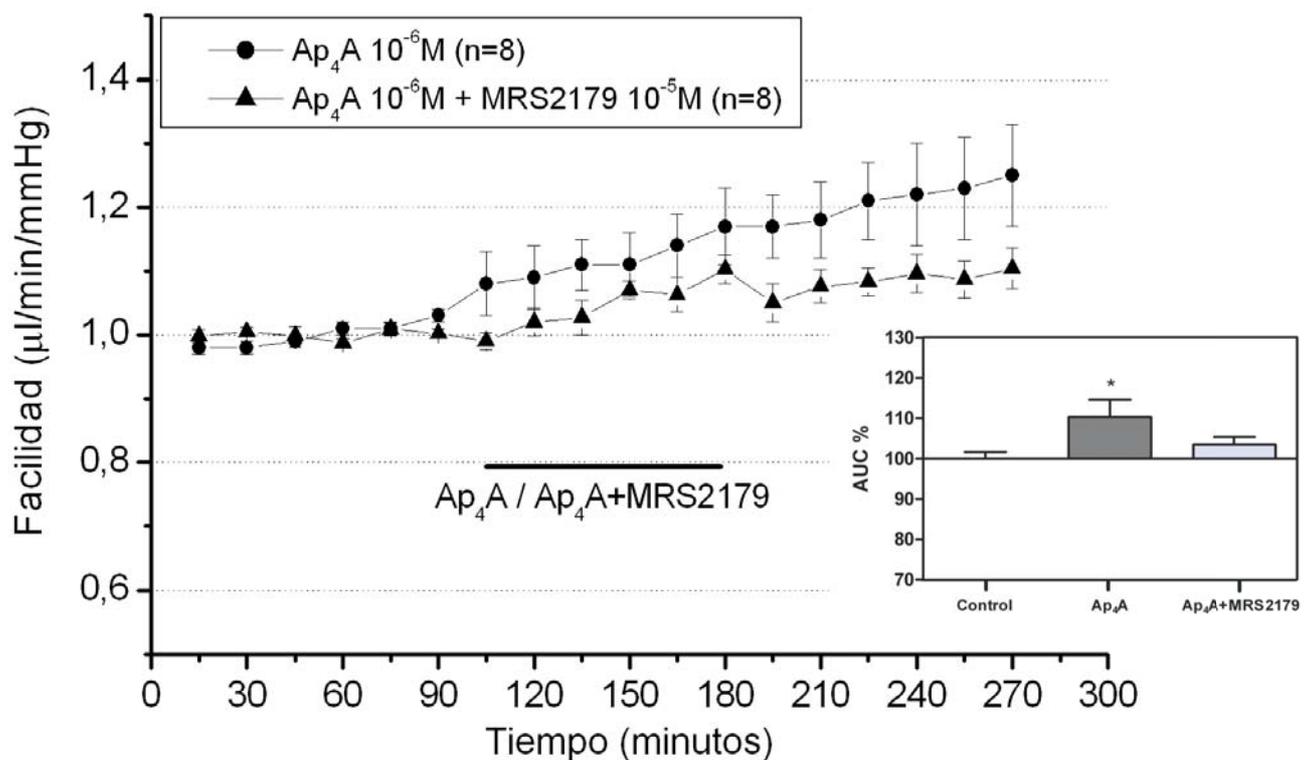


Figura 4.28. Efecto del bloqueo de los efectos del Ap₄A sobre la facilidad de evacuación por parte del MRS2179 (▲). En abscisas se muestra el tiempo en minutos y en ordenadas se muestra la facilidad de evacuación en cada punto. El periodo en el cual se perfunde medio con droga se muestra en la línea horizontal. El inserto de la parte inferior derecha muestra el área bajo la curva (AUC) para cada grupo con respecto al periodo control (DMEM; 100%) y las diferencias estadísticas con respecto al control.

Ya que el receptor P2Y₁ parecía estar implicado en la facilidad de evacuación, se quiso comprobar si el agonista purinérgico de los receptores P2Y₁ 2-MeS-ADP, tenía un efecto similar sobre la facilidad de evacuación (C). Al añadir este compuesto a la concentración de 10⁻⁶M en el medio de perfusión, la C sufrió un aumento de hasta un 20% (Tabla 4.10 y Figura 4.29). Este aumento en la C no disminuyó tras la retirada del compuesto en el periodo de post droga, llegando a un 22% de incremento.

El 2-MeS-ADP es un compuesto que se ha mostrado también capaz de estimular los subtipos de receptor P2Y₁₂ y P2Y₁₃. (Abbracchio, 2003). El MRS2179 es un antagonista del receptor P2Y₁ sin acción sobre los receptores P2Y₁₂ y P2Y₁₃ (Fälker, 2004; Marteau, 2003). Su utilización, por tanto, discriminaría entre P2Y₁ y otros receptores. Se realizaron estudios en los que se perfundió en el periodo de droga con MRS2179 a 10⁻⁵M. Su efecto fue el de disminuir la C en un 14%. La retirada del antagonista del medio de perfusión permitió que los valores de C llegaran a los basales en el periodo de post-droga (Tabla 4.10 y Figura 4.29). En las perfusiones en las que se perfundió conjuntamente con el agonista 2-MeS-ADP y el antagonista del P2Y₁, el MRS2179, la C tanto en el periodo de droga como en el de post-droga no sufrió cambios respecto al periodo basal, de modo que los efectos de aumento de la C producidos por el 2-MeS-ADP quedaron prevenidos por el MRS2179 (Tabla 4.10 y Figura 4.29), descartando una posible activación de receptores P2Y₁₂ y P2Y₁₃.

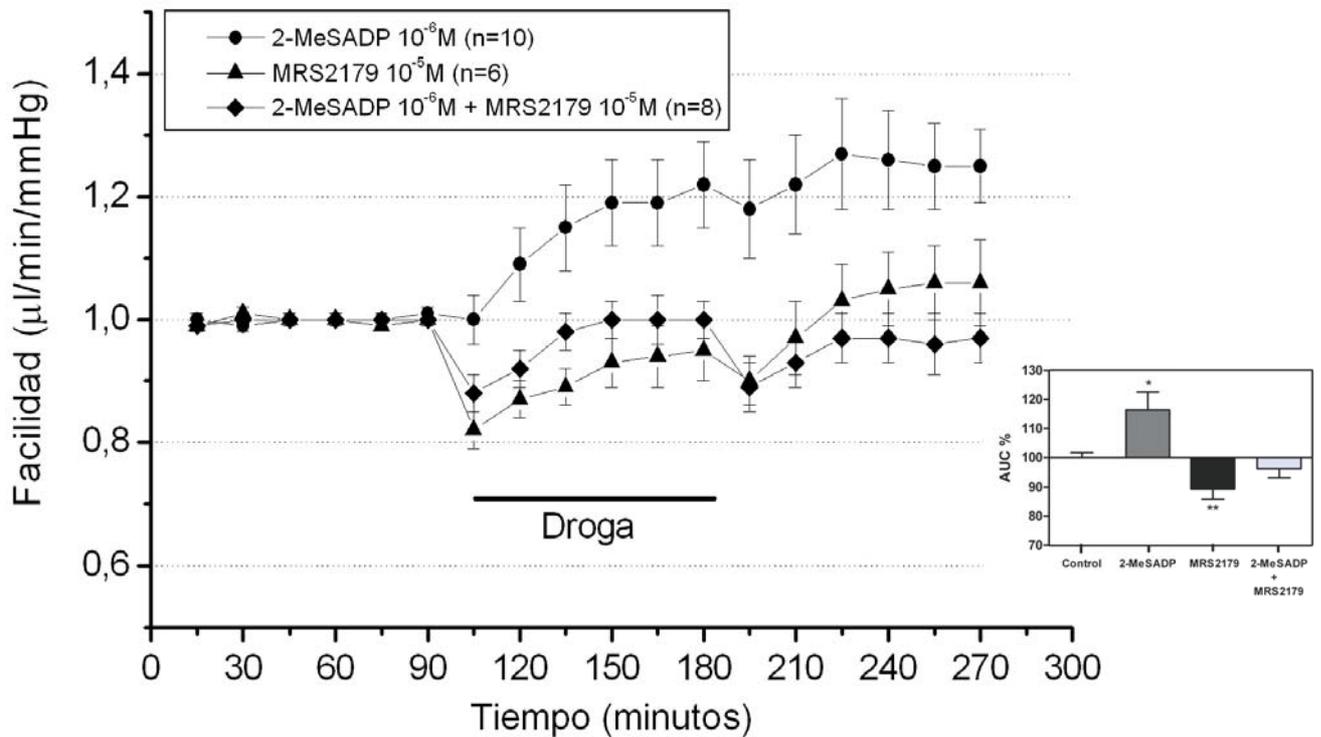


Figura 4.29. Efecto del agonista purinérgico selectivo del receptor P2Y₁, el 2-MeSADP (□) y del antagonista selectivo para el mismo receptor, el MRS2179 (▲), sobre la facilidad de evacuación. También se muestra el bloqueo de los efectos del 2-MeSADP sobre la facilidad de evacuación por parte del MRS2179 (▲). En abscisas se muestra el tiempo en minutos y en ordenadas se muestra la facilidad de evacuación en cada punto. El periodo en el cual se perfunde medio con droga se muestra en la línea horizontal. El inserto de la parte inferior derecha muestra el área bajo la curva (AUC) para cada grupo con respecto al periodo control (DMEM; 100%) y las diferencias estadísticas con respecto al control.

Tabla 4.10. Efecto de agonistas y antagonistas P2Y₁ sobre la facilidad de evacuación (C) en segmentos anteriores bovinos.

| Droga y concentración | n | Periodo basal (C ₀) | | | Periodo de droga (C _d) | | | Periodo post droga (C _{pd}) | | | | | |
|---|----|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | | Media | | | 30 | | | 60 | | | 90 | | |
| | | Media | 30 | 60 | Media | 30 | 60 | Media | 30 | 60 | Media | 30 | 60 |
| Control | 10 | 0.72±0.005 (100%) | 0.71±0.09 (98%) | 0.74±0.09 (102%) | 0.74±0.09 (102%) | 0.74±0.08 (102%) | 0.75±0.09 (104%) | 0.75±0.09 (104%) | 0.75±0.09 (104%) | 0.75±0.09 (104%) | 0.75±0.09 (104%) | 0.75±0.09 (104%) | 0.75±0.09 (104%) |
| Ap ₄ A 10 ⁻⁶ M | 8 | 0.60±0.005 (100%) | 0.64±0.11 (106%) | 0.66±0.12 (110%) | 0.66±0.12 (110%) | 0.70±0.14 (116%) ^{\$\$} | 0.75±0.15 (125%) ^{\$\$\$ *} | 0.75±0.15 (125%) ^{\$\$\$ *} | 0.75±0.15 (125%) ^{\$\$\$ *} | 0.75±0.15 (125%) ^{\$\$\$ *} | 0.75±0.15 (125%) ^{\$\$\$ *} | 0.75±0.15 (125%) ^{\$\$\$ *} | 0.75±0.15 (125%) ^{\$\$\$ *} |
| 2MeSADP 10 ⁻⁶ M | 10 | 0.90±0.002 (100%) | 0.97±0.09 (107%) | 1.06±0.09 (117%) ^{\$\$\$} | 1.06±0.09 (117%) ^{\$\$\$} | 1.08±0.09 (120%) ^{\$\$\$ *} | 1.10±0.09 (122%) ^{\$\$\$ *} | 1.10±0.09 (122%) ^{\$\$\$ *} | 1.10±0.09 (122%) ^{\$\$\$ *} | 1.10±0.09 (122%) ^{\$\$\$ *} | 1.10±0.09 (122%) ^{\$\$\$ *} | 1.10±0.09 (122%) ^{\$\$\$ *} | 1.10±0.09 (122%) ^{\$\$\$ *} |
| MRS2179 10 ⁻⁵ M | 6 | 0.89±0.003 (100%) | 0.77±0.14 (86%) ^{\$} | 0.82±0.14 (92%) | 0.82±0.14 (92%) | 0.84±0.15 (94%) | 0.94±0.16 (105%) | 0.94±0.16 (105%) | 0.94±0.16 (105%) | 0.94±0.16 (105%) | 0.94±0.16 (105%) | 0.94±0.16 (105%) | 0.94±0.16 (105%) |
| 2MeSADP ^(*) + MRS2179 ^(*) | 8 | 0.88±0.002 (100%) | 0.80±0.14 (90%) ^{\$} | 0.86±0.14 (97%) | 0.86±0.14 (97%) | 0.86±0.14 (97%) [*] | 0.83±0.13 (94%) ^{**} | 0.83±0.13 (94%) ^{**} | 0.83±0.13 (94%) ^{**} | 0.83±0.13 (94%) ^{**} | 0.83±0.13 (94%) ^{**} | 0.83±0.13 (94%) ^{**} | 0.83±0.13 (94%) ^{**} |
| Ap ₄ A ^(*) + MRS2179 ^(*) | 8 | 0.82±0.003 (100%) | 0.85±0.10 (103%) | 0.88±0.10 (107%) | 0.88±0.10 (107%) | 0.91±0.11 (111%) ^{\$} | 0.94±0.11 (114%) ^{\$} | 0.94±0.11 (114%) ^{\$} | 0.94±0.11 (114%) ^{\$} | 0.94±0.11 (114%) ^{\$} | 0.94±0.11 (114%) ^{\$} | 0.94±0.11 (114%) ^{\$} | 0.94±0.11 (114%) ^{\$} |

C₀ = facilidad de evacuación basal; C_d = facilidad de evacuación en presencia de droga; C_{pd} = facilidad de evacuación en el periodo postdroga. Los datos se muestran como media±SD; n = número de segmentos anteriores profundos; (*) La concentración de estas drogas es la misma que la utilizada en los experimentos con el compuesto únicamente. El promedio de la relación C_d/C₀ o C_{pd}/C₀ se muestra entre paréntesis. Las comparaciones entre C₀ y C cada 15 minutos de experimento para todos los grupos se realizó mediante el análisis de la varianza (One-Way ANOVA) con la corrección del test de Bonferroni donde (^{\$}) p<0.05, (^{\$\$}) p<0.01 y (^{\$\$\$}) p<0.001. Las comparaciones entre las relaciones C_d/C₀ y C_{pd}/C₀ en los grupos tratados vs. los mismos parámetros (C_d/C₀ y C_{pd}/C₀) para el grupo control (DMEM) se realizaron mediante el análisis de la varianza con la corrección de Bonferroni. Para los grupos 2MeSADP + MRS2179 y Ap₄A + MRS2179 las comparaciones entre las relaciones C_d/C₀ y C_{pd}/C₀ se realizaron vs. el grupo 2MeSADP y Ap₄A respectivamente. La significación en todos los casos se estableció en: (*) p<0.05 y (**) p<0.01.