

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**EFFECTO DE LOS DINUCLEÓTIDOS EN LOS MECANISMOS DE
REPARACIÓN DE DAÑOS EN LAS CÉLULAS DEL EPITELIO
CORNEAL EN CONEJO. ESTUDIO DE LAS RUTAS
INTRACELULARES IMPLICADAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Aránzazu Mediero Muñoz

Bajo la dirección del doctor:

Jesús Pintor Just

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-3360-0

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV



EFFECTO DE LOS DINUCLEÓTIDOS EN LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN DE DAÑOS EN LAS CÉLULAS DEL EPITELIO CORNEAL EN CONEJO. ESTUDIO DE LAS RUTAS INTRACELULARES IMPLICADAS.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Aránzazu Mediero Muñoz

Bajo la dirección del Doctor

Jesús Pintor Just

Madrid, 2009

Dr. JESÚS PINTOR JUST, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV DE LA FACULTAD DE
VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “ **Efecto de los dinucleótidos en los mecanismos de reparación de daños en las células del epitelio corneal en conejo. Estudio de las rutas intracelulares implicadas**”, de la que es autora la Licenciada en C.C. Biológicas Dña. Aránzazu Mediero Muñoz, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, en la E.U. de Óptica bajo la dirección del que suscribe y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

Madrid, a de de 2009.

El Director de la Tesis Doctoral,

Dr. Jesús Pintor Just

A mi tío Agus

A mi abuelo Manolo (“Piro), a mi abuela Encarna

A mi abuelo-José y a mi abuela Froi

La realización de la presente Tesis Doctoral no habría sido posible sin contar con las facilidades proporcionadas por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV.

En primer lugar quiero agradecerle al Dr. Jesús Pintor (“Suso” desde el primer momento) el haberme dado la oportunidad allá por el mes de Febrero del 2004 de entrar a trabajar en su entonces reducido grupo de investigación. Gracias por tu apoyo, por tu valiosa ayuda y siempre sabio consejo en la consecución de este trabajo. Gracias por todo lo que me has enseñado, por tu ejemplo de profesionalidad y por haber confiado en mí.

A Sunti, Teresa y Gonzalo, ese pequeño grupo, casi una familia, que me acogió desde el primer momento. Y desde entonces ¡como ha crecido! ¿verdad? Empecemos: Sunti, la primera de una larga lista de agradecimientos, gracias por tu apoyo, por tus enseñanzas, por el tiempo y el trabajo compartidos (¡que lata nos han dado los conejos a veces!), por las risas. Marta ¡que recuerdos de esas super-fiestecitas en tu casa! Espero que no pases excesivo calor por Phoenix, aunque ya se que eso es esperar demasiado. Teresa, más que técnico de laboratorio, un placer haberte conocido, siempre con la sonrisa en los labios y una palabra amable. Gonzalo, Basilio, hemos tenido muy buenas conversaciones este tiempo ¿verdad? Patri, ¿qué decirte? lo que la PIO y los conejos han unido... termina tú la frase, te concedo ese honor. Pilar, nos conocimos en el Clínico y gracias a ti llegué a la Escuela, desde entonces hemos compartido muchas cosas dentro y fuera del laboratorio ¿verdad? y estamos en el mismo punto, ¡ánimo! que ya casi lo tienes tú también. Anita, muchas gracias por tu ayuda, por todos los momentos compartidos, y espero que cuando leas este trabajo no digas “mal mal mal mal mal”. Almu, la “Doctorcita”, en primer lugar muchas gracias por tu incalculable ayuda con toda la parte de Biología Molecular, sin ti no hubiera salido adelante, y no solo por eso, gracias por estar ahí, por todos tus consejos y por nuestras largas charlas en espera de que nos dieran la hora de hacer las citologías. Conchi, María, Alba y Fer, me alegra haberos conocido, me hubiera gustado que hubiera sido por más tiempo y compartir más cosas con vosotros, pero unos vienen y otros se van. ¡Qué bien lo hemos pasado juntos! No todo ha sido trabajar, trabajar y trabajar, hemos tenido muy buenos “momentos Youtube”.

A Paqui por su constante alegría. Al resto de gente de la Escuela con los que he coincidido durante estos años.

A todos con lo que he compartido buenos y malos momentos desde que me embarqué en esto de la investigación. Desde los inicios en el Clínico (gracias a la Dra. Fernández-Durango por ello): Teresita, Arancha, Marie, Mónica, Pablo, José Ignacio, Yolanda, Maribel, Esther, Celia, Raquel, Marisa, Elenita, gracias por los instantes compartidos desde que nos conocimos, espero que los sigamos compartiendo mucho mucho tiempo. A toda la gente del quirófano del Pabellón 8 que me acogió cuando iba a recoger muestras (a mi Juli, a Amelia, y a todas las enfermeras, celadores y oftalmólogos). A la gente que conocí en New Orleans, ¡espero veros pronto! A la Dra. Haydee Bazan, por darme la oportunidad de adquirir conocimientos a su lado. A Jorgelina y Victor, ¡visualicé! y aquí está el resultado.

Y en último lugar, pero no menos importante sino todo lo contrario (deberíais estar los primeros). Muchas gracias a mi familia. A mi madre, a mi padre, a mi hermana. Gracias por aguantar mis buenos y malos momentos (de los últimos muchos al final del camino ya lo sabéis) y por apoyarme siempre desde que os dije “yo de mayor quiero trabajar en un laboratorio, quiero investigar”. Bueno, pues lo conseguí gracias a vosotros. Gracias a vuestros consejos y a vuestro cariño, he llegado a realizar lo que siempre he deseado. Gracias por entender mis explicaciones de los experimentos, de lo que hacía y dejaba de hacer y de para qué servía, y todo ello sin atisbo de aburrimiento. Mamá, Papá, gracias por ser como sois y por vuestros consejos (aunque no siempre les haga caso), gracias por acompañarme a la Escuela de madrugada cuando tenía que hacer las incubaciones e instilar a los conejines ¡qué sueño hemos pasado! Ruth, como verás he cumplido todas las normativas relativas a la experimentación (jejejejeje). Nunca os lo podré agradecer lo suficiente. Os quiero.

A toda mi familia.

Creo que no me dejo a nadie. Si es así, lo siento, ha sido sin intención.

ÍNDICE.

ABREVIATURAS.....	pag. 19
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	pag. 21
1.-INTRODUCCIÓN.....	pag. 27
1.1.- LOS NUCLEÓTIDOS Y SUS RECEPTORES.....	pag. 29
1.1.1.- Los dinucleótidos de adenina: Estructura y características.....	pag. 30
1.1.2.- Almacenamiento y liberación de plaquetas, células cromafines y terminales sinápticas.....	pag. 31
1.1.3.- Metabolismo de los dinucleótidos de adenina: Moduladores extracelulares.....	pag. 33
1.1.4.- Receptores para nucleósido, nucleótidos y dinucleótidos.....	pag. 33
1.1.4.1.- Receptores P1.....	pag. 34
1.1.4.2.- Receptores P2.....	pag. 35
1.1.4.2.1.- Receptores P2X.....	pag. 36
1.1.4.2.2.- Receptores P2Y.....	pag. 39
1.1.4.2.3.- Receptores P2X y P2Y para dinucleótidos de adenina.....	pag. 46
1.2.- LOS DINUCLEÓTIDOS EN LA FISIOLÓGIA OCULAR.....	pag.48
1.2.1.- Dinucleótidos y superficie ocular.....	pag. 48
1.2.1.1.- Presencia de diadenosina polifosfatos en la lágrima: Estados normales y patológicos.....	pag. 48
1.2.1.2.- Origen de los dinucleótidos en la lágrima humana.....	pag. 50
1.2.1.3.- Efecto en la secreción lagrimal.....	pag. 52
1.2.1.4.- Efecto en la producción de lisozima.....	pag. 53
1.2.2.- Diadenosina polifosfatos en cámara anterior y posterior.....	pag. 53
1.2.2.1.- Presencia de los diadenosina polifosfatos en el humor acuoso.....	pag 53
1.2.2.2.- Efecto de los diadenosina polifosfatos en la presión intraocular.....	pag.54
1.2.3.-Diadenosina polifosfatos en la retina.....	pag 56
1.3.- ANATOMÍA OCULAR.....	pag.57
1.3.1.- Anatomía de la cornea.....	pag. 58

1.4.- EL PROCESO DE RE-EPITELIZACIÓN CORNEAL.....	pag. 63
1.5.- RUTAS INTRACELULARES: MAPK, CITOESQUELETO Y FOSFOLIPASA C / PROTEINA QUINASA C (PLC / PKC).....	pag. 69
1.5.1.- Proteínas Quinasas Activadas por Mitógeno (MAPK).....	pag. 69
1.5.1.1.- Módulo ERK1/2.....	pag. 71
1.5.1.2.- Módulo p38.....	pag. 73
1.5.1.3.- Módulo JNK.....	pag. 74
1.5.2.- Familia Rho GTPasas.....	pag. 76
1.5.3.- Ruta Fosfolipasa C /Proteína Quinasa C.....	pag. 80
1.5.3.1.- Fosfolipasa C.....	pag. 80
1.5.3.2.- Proteína Quinasa C.....	pag. 84
2.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO.....	pag. 89
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	pag. 95
3.1.- REACTIVOS, MEDIOS Y SOLUCIONES GENERALES.....	pag. 97
3.1.1.- Reactivos.....	pag.97
3.1.2.- Medios y soluciones.....	pag.102
3.1.2.1.- Para extracción del epitelio corneal.....	pag.102
3.1.2.2.- Medios de cultivo.....	pag. 102
3.1.2.3.- Para Inmunocitoquímica.....	pag. 103
3.1.2.4.- Para ensayos de migración celular.....	pag. 104
3.1.2.5.- Para Western Blot.....	pag. 104
3.1.2.6.- Para RT-PCR.....	pag. 106
3.1.3.- Equipos e instrumentos empleados en el trabajo experimental.....	pag. 107
3.1.4.- Programas, bases de datos y herramientas informáticas empleadas en el trabajo experimental.....	pag. 108
3.2.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	pag. 109
3.3.- CULTIVO CELULAR.....	pag. 109
3.3.1.- Cultivo primario de epitelio corneal de conejo.....	pag. 109
3.3.2.- Línea establecida de conejo “SIRC”.....	pag. 110
3.4.- INMUNOCITOQUIMICA PARA CITOQUERATINA 3.....	pag. 110
3.5.- ESTUDIOS DE MIGRACIÓN CELULAR EN CULTIVO PRIMARIO...	pag. 111
3.5.1.- Ensayos de migración con dinucleósido polifosfatos y mononucleótidos a concentración fija 100 µM.....	pag. 111

3.5.2.- Ensayos de migración para la obtención de las curvas concentración- respuesta de dinucleósido polifosfatos y mononucleótidos.....	pag. 112
3.5.3.- Ensayos de migración con antagonistas P2Y.....	pag. 112
3.5.4.- Ensayos de migración con inhibidores de las rutas intracelulares: MAPK y Citoesqueleto.....	pag. 113
3.5.5. Ensayos de migración con inhibidores de las rutas intracelulares: Fosfolipasa C / Proteína Quinasa C.....	pag. 114
3.5.6.- Ensayo de migración en la línea establecida “SIRC”.....	pag. 115
3.6.- ANÁLISIS DE LOS DINUCLEÓTIDOS POR HPLC.....	pag. 116
3.6.1.- Estudio de la estabilidad de los dinucleótidos tras los ensayos de migración <i>in vitro</i>	pag. 116
3.6.2.- Estudio de la concentración de Ap ₄ A en la lágrima de conejo tras una lesión del epitelio corneal.....	pag. 117
3.7.- WESTERN BLOT PARA pERK1/2, ROCK-I, pMLC2 Y pp38.....	pag. 118
3.8.- INMUNOCITOQUÍMICA PARA pERK1/2 Y ROCK-I. ESTUDIO DE TRASLOCACIÓN AL NÚCLEO.....	pag. 121
3.9. ENSAYOS CITOESQUELETO: INMUNOFLUOPRESCENCIA PARA FIBRONECTINA / αPA Y FALOIDINA / VINCULINA.....	pag. 122
3.10.- ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO DEL RECEPTOR P2Y₂.....	pag. 123
3.10.1.- Clonaje y silenciamiento del receptor P2Y ₂	pag. 123
3.10.1.1.- Clonaje del receptor P2Y ₂	pag. 123
3.10.1.2.- Cultivo de <i>E. coli</i> , aislamiento de ADN plasmídico, electroforesis y purificación de fragmentos de ADN y digestiones y modificaciones de fragmentos de ADN.....	pag. 125
3.10.1.3.- Silenciamiento del receptor P2Y ₂	pag. 126
3.10.2.- Estudios <i>in vitro</i>	pag. 127
3.10.2.1.- Transfección del siRNA para el receptor P2Y ₂ en las células SIRC.....	pag. 127
3.10.2.1.1.- Validación del método de transfección.....	pag. 127
3.10.2.1.2.- Eficiencia de silenciamiento para el siRNA del receptor P2Y ₂	pag. 128
3.10.2.2.- Ensayo de migración en presencia de siRNA frente al receptor P2Y ₂	pag. 129

3.10.3.- Estudios <i>in vivo</i>	pag. 130
3.10.3.1.- Validación del silenciamiento del receptor P2Y ₂ <i>in vivo</i>	pag. 130
3.10.3.1.1.- RT-PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCRq).....	pag. 130
3.10.3.1.2.- Inmunohistoquímica para P2Y ₂	pag. 131
3.10.3.2.- Ensayos de migración en presencia de siRNA frente al receptor P2Y ₂	pag. 133
3.11.- EFECTO DE LOS DINUCLEÓTIDOS EN LA ETAPA DE DIVISIÓN CELULAR.....	pag. 135
3.11.1.- Estudio de la proliferación del epitelio corneal <i>in vitro</i>	pag. 135
3.11.1.1.- Efecto de Ap ₄ A en la proliferación celular.....	pag. 135
3.11.1.2.- Efecto de Ap ₃ A en la proliferación celular.....	pag. 136
3.11.1.3.- Efecto de la combinación de Ap ₄ A y Ap ₃ A en la proliferación celular.....	pag. 137
3.11.2.- Estudio de proliferación del epitelio corneal mediada por Ap ₄ A <i>in vivo</i> . RT-PCR cuantitativa para CCNE1 y CDK2.....	pag. 139
3.12.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	pag. 141
4.- RESULTADOS.....	pag.145
4.1.- INMUNOCITOQUÍMICA PARA CITOQUERATINA 3.....	pag. 147
4.2.- EFECTO DE LOS DINUCLEÓSIDOS POLIFOSTATO Y NUCLEÓTIDOS EN EL PROCESO DE RE-EPITELIZACIÓN CORNEAL.....	pag. 148
4.2.1.- Estudio de los distintos di- y mononucleótidos a concentración 100 μM.....	pag. 148
4.2.2.- Curvas concentración-respuesta para di- y mononucleótidos.....	pag. 152
4.3.- ESTUDIOS DE MIGRACIÓN CELULAR CON ANTAGONISTAS DE RECEPTORES P2.....	pag. 155
4.3.1.- Ensayos de migración con antagonistas de receptores P2 a concentración 100 μM.....	pag. 155
4.3.2.- Curvas concentración-respuesta para antagonistas P2.....	pag. 159
4.4.- ANÁLISIS DE LOS DINUCLEÓTIDOS POR HPLC.....	pag. 160
4.4.1.- Estudio de la estabilidad de los dinucleótidos tras los ensayos de migración <i>in vitro</i>	pag. 160

4.4.2.- Estudio de la concentración de Ap ₄ A en la lágrima de conejo tras una lesión del epitelio corneal.....	pag. 162
4.5.- ESTUDIOS DE MIGRACIÓN CON INHIBIDORES DE LAS RUTAS INTRACELULARES.....	pag. 164
4.5.1.- Ensayos de migración con inhibidores de la autofosforilación de TyrK y de MAPK.....	pag. 164
4.5.2.- Ensayos de migración con inhibidores de la ruta RhoA/ROCK-I.....	pag. 167
4.5.3 Ensayos de migración con inhibidores de la ruta Fosfolipasa C / Proteína Quinasa C.....	pag. 173
4.6.- ENSAYOS DE MIGRACIÓN CON LAS CELULAS “SIRC”.....	pag. 176
4.7.- ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO DEL RECEPTOR P2Y₂.....	pag. 184
4.7.1.- Clonaje del receptor P2Y ₂	pag. 184
4.7.2.- Estudios <i>in vitro</i>	pag. 185
4.7.2.1.- Transfección de las células “SIRC”.....	pag. 185
4.7.2.1.1.- Validación del método de transfección.....	pag. 185
4.7.2.1.2.- Eficiencia de silenciamiento para el siRNA del receptor P2Y ₂ . Inmunocitoquímica para P2Y ₂	pag. 187
4.7.2.1.3.- Efecto del silenciamiento del receptor P2Y ₂ en el proceso de migración celular <i>in vitro</i>	pag. 188
4.7.3.- Estudios <i>in vivo</i>	pag. 192
4.7.3.1.- Validación de la transfección <i>in vivo</i>	pag. 192
4.7.3.1.1.- Cuantificación de los niveles de ARNm para P2Y ₂ por análisis de RT-PCRq.....	pag. 192
4.7.3.1.2.- Inmunocitoquímica para el receptor P2Y ₂ en corneas intactas.....	pag. 193
4.7.3.2.- Ensayos de migración <i>in vivo</i> tras el tratamiento con siRNA para P2Y ₂	pag. 195
4.8.- ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INTRACELULARES IMPLICADOS.....	pag. 197
4.8.1.- Ensayos de Western Blot para las proteínas pERK1/2 y ROCK-I: Activación de las rutas de las MAPK y del Citoesqueleto de actina.....	pag. 197
4.8.2.- Ensayos de Western Blot para la proteína p38.....	pag. 203

4.9.- INMUNOCITOQUÍMICA PARA pERK Y ROCK. ESTUDIO DE TRASLOCACIÓN AL NÚCLEO.....	pag. 206
4.10. ENSAYOS CITOESQUELETO: FIBRONECTINA / uPA Y FALOIDINA / VINCULINA.....	pag. 211
4.11.- EFECTO DE LOS DINUCLEÓTIDOS EN LA ETAPA DE DIVISIÓN CELULAR.....	pag. 217
4.11.1.- Estudio de la proliferación del epitelio corneal <i>in vitro</i>	pag. 217
4.11.1.1.- Efecto de Ap ₄ A en la proliferación celular.....	pag. 217
4.11.1.2.- Efecto de Ap ₃ A en la proliferación celular.....	pag. 220
4.11.1.3.- Efecto de la combinación de Ap ₄ A y Ap ₃ A en la proliferación celular.....	pag. 221
4.11.2.- Estudio de proliferación del epitelio corneal mediada por Ap ₄ A y Ap ₃ A <i>in vivo</i> . RT-PCR cuantitativa para CCNE1 y CDK2.....	pag. 225
5.- DISCUSIÓN.....	pag. 231
5.1.- EFECTO DE LOS DINUCLEÓTIDOS EN EL PROCESO DE MIGRACIÓN DEL EPITELIO CORNEAL. RECEPTORES PURINÉRGICOS IMPLICADOS.....	pag. 233
5.2.- IMPLICACIÓN DE LAS RUTAS INTRACELULARES DE MAPK Y DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA ACELERACIÓN DE LA MIGRACIÓN VÍA Ap ₄ A / P2Y ₂	pag. 243
5.3.- IMPLICACIÓN DE LAS RUTAS INTRACELULARES DE MAPK EN EL RETARDO DE LA MIGRACIÓN VÍA Ap ₃ A / P2Y ₆	pag. 250
5.4.- IMPLICACIÓN DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN EL PROCESO DE MIGRACIÓN CELULAR.....	pag. 255
5.5.- ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL PROCESO DE CICATRIZACIÓN CORNEAL VÍA Ap ₄ A / P2Y ₂	pag. 257
6.- CONCLUSIONES.....	pag. 263
7.- REFERENCIAS.....	pag. 267
8.- ANEXOS.....	pag. 299

ABREVIATURAS.

Ap₃A: (P¹,P⁴-Di(adenosina-5') trifosfato.

Ap₄A: (P¹,P⁴-Di(adenosina-5') tetrafosfato.

Ap₅A: (P¹,P⁴-Di(adenosina-5') pentafosfato.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADP: Adenosina 5' - difosfato.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ATP: Adenosina 5' - trifosfato.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CCNE1: Ciclina E1.

CDK2: Quinasa Dependiente de Ciclina 2.

ADNc: ADN complementario.

DMEM: Medio Dulbecco modificado.

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión.

MAPK: Proteínas Quinasas Activadas por Mitógeno.

MEM: Medio MEM con sales de Earle's y aminoácidos no esenciales.

NaF: Fluoruro Sódico.

Na₃VO₄: Ortovanadato Sódico.

PAO: Óxido de Fenilarsina.

PBS: Tampón fosfato-salino.

PFA: Paraformaldehido.

PKC: Proteína Quinasa C.

PLC: Fosfolipasa C.

PMSF: Fenilmetilsulfonyl Fluoruro.

PPADS: Ácido 6-azofenil- 2'4' disulfónico- Piridoxalfosfato.

RB-2: Reactivo Azul 2.

RNAi: ARN de interferencia.

RPM: Revoluciones por minuto.

RT-PCRq: RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

SBF: Suero Bovino Fetal.

SDS: Dodecil Sulfato Sódico.

SIRC: Statens Seruminstitut Rabbit Cornea.

siRNA: ARN interferente de pequeño tamaño.

TBA: Tetrabutyl amonio.

TER: Tiempo Estimado de Re-epitelización.

UDP: uridina 5' - difosfato

Up₄U: (P¹,P⁴-Di(uridina-5')) tetrafosfato, INS365, Diquafosol, Prolacria™.

UTP: uridina 5' - trifosfato

VEM: Velocidad Estimada de Migración.

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

FIGURAS:

Figura 1: Estructura de una molécula de Ap₄A (P¹,P⁴-Di(adenosina-5') tetrafosfato).

Figura 2: Estructura general de un receptor de siete dominios transmembrana.

Figura 3: Esquema representativo de los receptores purinérgicos P2X y P2Y.

Figura 4: Diagrama descriptivo de la estructura de una subunidad de un receptor P2X.

Figura 5: Esquema de activación de los receptores P2X.

Figura 6: Diagrama descriptivo de la estructura de un receptor P2Y.

Figura 7: Esquema de activación de los receptores P2Y.

Figura 8: Diagrama esquematizado de un ojo humano en sección transversal.

Figura 9: Esquema organizativo de la cornea.

Figura 10: Fases de re-epitelización.

Figura 11: Cascada de señalización de las MAPK.

Figura 12: Regulación de la activación de las proteínas de la familia Rho GTPasa.

Figura 13: Estructura primaria de las proteínas Rho GTPasaS.

Figura 14: Ruta de activación de la Fosfolipasa C.

Figura 15: Modelo de actuación de los nucleótidos vía P2Y en la re-epitelización corneal.

Figura 16: Inmunocitoquímica para Citoqueratina 3 en cultivo de células de epitelio corneal de conejo

Figura 17: Ensayos de migración para Ap₄A, Ap₃A y ADP a concentración 100 μM.

Figura 18: Resumen de los efectos de VEM y de TER para todos los compuestos estudiados a concentración 100 μM.

Figura 19: Curvas concentración-respuesta para di- y mononucleótidos en el rango de migración celular.

Figura 20: Datos de VEM para los antagonistas P2 a concentración 100 μM, tanto en presencia como en ausencia de Ap₄A o Ap₃A 100 μM.

Figura 21: Curvas concentración-respuesta para los antagonistas suramina y RB-2.

Figura 22: Estabilidad de los diadenosina polifosfatos Ap₄A y Ap₃A en cultivo de células epiteliales de córnea por HPLC.

Figura 23: Concentración de Ap₄A en la lagrime de conejo tras la realización de una lesión corneal.

Figura 24: Ensayos de migración celular con inhibidores de las rutas intracelulares.

Figura 25: Ensayos de migración con inhibidores de la vía RhoA/ROCK-I.

Figura 26 : Rutas intracelulares activadas por los dinucleótidos en el proceso de migración celular.

Figura 27: Ensayos de migración con inhibidores de la vía PLC / PKC.

Figura 28: Ensayos de migración con Ap₄A y Ap₃A 100 μM en cultivo inmortalizado SIRC.

Figura 29: Efecto de los inhibidores de MAPK, citoesqueleto de actina y PLC/PKC en la migración celular en presencia de Ap₄A en células SIRC.

Figura 30 : Efecto de los inhibidores de MAPK y citoesqueleto de actina en la migración celular en presencia de Ap₃A en células SIRC.

Figura 31: Efecto de los inhibidores de MAPK, citoesqueleto de actina y PLC/PKC en la migración celular en células SIRC.

Figura 32: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de receptor P2Y₂ de conejo clonado con la secuencia del receptor P2Y₂ humano.

Figura 33: Eficiencia de transfección de las células SIRC.

Figura 34: Inmunolocalización del receptor P2Y₂ en células SIRC transfectadas con P2Y₂ siRNA.

Figura 35: Efecto del P2Y₂ siRNA #1 en la migración del epitelio corneal de conejo inducida por Ap₄A.

Figura 36: Efecto del P2Y₂ siRNA #2 en la migración del epitelio corneal de conejo inducida por Ap₄A.

Figura 37 : Cuantificación de los niveles de ARNm para P2Y₂ por análisis de RT-PCRq.

Figura 38: Inmunolocalización del receptor P2Y₂ en corneas tratadas con P2Y₂ siRNA #2.

Figura 39: Efecto del silenciamiento del receptor P2Y₂ en la migración del epitelio corneal señalizada por Ap₄A.

Figura 40: Activación de pERK1/2 y de ROCK-I tras incubación con Ap₄A o Ap₃A 100 μM durante un periodo de tiempo de cuatro horas.

Figura 41: Activación de pERK1/2 y ROCK-I en presencia de Ap₄A con inhibidores.

Figura 42: Activación de pERK1/2 y ROCK-I en presencia de Ap₃A 100 μM con inhibidores.

Figura 43: Activación de pERK1/2 y ROCK-I tras tratamiento con los inhibidores en ausencia de agonistas.

Figura 44: Activación de pMLC2 en presencia de Ap₄A o Ap₃A 100 μM y en presencia o ausencia de Y27632.

Figura 45: Activación de p38 y pERK1/2 en presencia de Ap₃A e inhibidores.

Figura 46: Distribución celular de pERK1/2 y ROCK-I tras tratamientos con Ap₄A y Ap₃A en presencia y ausencia de varios inhibidores.

Figura 47: Distribución celular de pERK1/2 y ROCK-I.

Figura 48: Inmunolocalización de Fibronectina y uPA y células lesionadas.

Figura 49: Cuantificación de la señal para Fibronectina y uPA.

Figura 50: Inmunolocalización de Faloidina y Vinculina y células lesionadas.

Figura 51: Cuantificación de la señal para Faloidina y Vinculina tras lesión.

Figura 52: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con Ap₄A y diversos inhibidores a las 24 y 36 horas.

Figura 53: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con Ap₃A y diversos inhibidores a las 24 y 36 horas.

Figura 54 : Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con concentraciones crecientes de Ap₃A en presencia de Ap₄A 100 μM a las 24 y 36 horas.

Figura 55 : Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con concentraciones crecientes de Ap₄A en presencia de Ap₃A 100 μM respectivamente a las 24 y 36 horas.

Figura 56: Cuantificación por RT-PCRq de los niveles de ARNm para CCNE1 y CDK2 tras el tratamiento con siRNA para P2Y₂ en presencia de Ap₄A.

Figura 57: Cuantificación por RT-PCRq de los niveles de ARNm para CCNE1 y CDK2 tras el tratamiento con siRNA para P2Y₂ en presencia de Ap₃A.

Figura 58: Cross-talk entre las cascadas intracelulares de MAPK y RhoA / ROCK-I tras la activación de los receptores P2Y₂ vía Ap₄A.

Figura 59: Cascadas intracelulares activadas por P2Y₆ vía Ap₃A.

TABLAS:

Tabla 1: Características de los receptores P2X.

Tabla 2: Características de los receptores P2Y.

Tabla 3: Perfiles farmacológicos receptores P2X.

Tabla 4: Perfiles farmacológicos receptores P2Y.

Tabla 5: Concentración de dinucleótidos de adenina en lágrima de conejo y humana.

Tabla 6: Valores de VEM y de TER para di- y mononucleótidos en el proceso de migración celular.

Tabla 7: Valores de VEM y de TER para Ap₄A 100 μM en presencia de los antagonistas de los receptores P2 en concentración 100 μM.

Tabla 8: Valores de VEM y de TER para Ap₃A 100 μM en presencia de los antagonistas de los receptores P2 a concentración 100 μM.

Tabla 9: Valores de VEM y de TER para antagonistas de los receptores P2 a concentración 100 μM en ausencia de agonistas.

Tabla 10: Valores de VEM y de TER para los antagonistas de las rutas intracelulares en presencia de Ap₄A ambos a concentración 100 μM.

Tabla 11: Valores de VEM y TER para los antagonistas de las rutas intracelulares en presencia de Ap₃A ambos a concentración 100 μM.

Tabla 12: Valores de VEM y TER para los antagonistas de las rutas intracelulares a concentración 100 μM en ausencia de agonistas.

Tabla 13: Valores de VEM y de TER para los antagonistas de la ruta RhoA / ROCK-I en presencia de Ap₄A 100 μM.

Tabla 14: Valores de VEM y de TER para los antagonistas de la ruta RhoA/ROCK-I en presencia de Ap₃A 100 μM.

Tabla 15: Valores de VEM y de TER para los antagonistas de la ruta RhoA / ROCK-I en ausencia de agonistas.

Tabla 16: Valores de VEM y de TER para los antagonistas de la ruta PLC / PKC en presencia de Ap₄A.

Tabla 17: Valores de VEM y TER para los antagonistas de la ruta PLC / PKC en ausencia de Ap₄A.

Tabla 18: Valores de VEM y de TER para Ap₄A e inhibidores de las rutas MAPK y citoesqueleto de actina en el proceso de migración celular en células inmortales SIRC.

Tabla 19: Valores de VEM y de TER para Ap₄A e inhibidores de las ruta PLC / PKC en el proceso de migración celular en células inmortales SIRC.

Tabla 20: Valores de VEM y de TER para Ap₃A e inhibidores de las rutas MAPK y citoesqueleto de actina en el proceso de migración celular en células inmortales SIRC.

Tabla 21: Valores de VEM y de TER para los antagonistas de las rutas intracelulares en ausencia de agonistas en el proceso de migración celular en células inmortales SIRC.

Tabla 22: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con Ap₄A y diversos inhibidores a las 24 y 36 horas.

Tabla 23: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con Ap₃A y diversos inhibidores a las 24 y 36 horas.

Tabla 24: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con Ap₄A 100 μ M y concentraciones crecientes de Ap₃A. a las 24 y 36 horas de iniciados los tratamientos.

Tabla 25: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con Ap₃A 100 μ M y concentraciones crecientes de Ap₄A a las 24 y 36 horas de iniciados los tratamiento.

Tabla 26: Cuantificación del ARNm para CCNE1 Y CDK2 a las 24 y 36 horas de la lesión del epitelio corneal.

Tabla 27: Cuantificación del ARNm para CCNE1 Y CDK2 a las 24 y 36 horas de la lesión del epitelio corneal.

Introducción

1.-INTRODUCCIÓN.

1.1.- LOS NUCLEÓTIDOS Y SUS RECEPTORES.

Tanto las purinas (adenosina, ADP y ATP) como las pirimidinas (UDP y UTP) extracelulares son moléculas señalizadoras que median una gran cantidad de efectos biológicos vía receptores de superficie celular denominados Receptores Purinérgicos. Entre las acciones que catalizan estas moléculas encontramos contracción del músculo liso, neurotransmisión, secreción exocrina y endocrina, respuesta inmune, inflamación, agregación plaquetaria, dolor y modulación de la función cardiaca. El concepto de purinas como señalizadores extracelulares fue empleado por primera vez por Drury y Szent-Györgyi en 1929 cuando observaron que en un extracto de músculo cardiaco, adenosina y adenosina 5' monofosfato (AMP) causaban pronunciados efectos biológicos, como por ejemplo la dilatación arterial y la disminución de la presión arterial.

Existe relación entre la estructura de las moléculas y la acción de las mismas. La eliminación de los fosfatos de la molécula aumenta la capacidad de los compuestos de adenina de producir vasodilatación e hipotensión, y el aumento de presión arterial que produce ATP en gatos, no se ha visto con AMP ni adenosina (Gillespie, 1934). Este mismo autor, indica que la contracción del ileo y del útero en cobayas es más potente para ATP que para AMP y adenosina. Esta es por tanto la primera evidencia de las diversas acciones de la molécula de ATP, y por implicación, de la existencia de diversos receptores purinérgicos.

El estudio del papel fisiológico de las purinas y de las pirimidinas se ha podido llevar a cabo gracias al estudio de sus fuentes biológicas y de los estímulos empleados para su liberación. Las primeras investigaciones sobre los efectos de adenosina y ATP fueron llevados a cabo en diversos tejidos, pero particularmente en el corazón y en la vasculatura (Gaddum y Holtz, 1933; Emmelin y Feldberg, 1948; Folkow, 1949; Stoner y Green, 1950). Los estudios iniciales de UTP se focalizaron también en los efectos cardiovasculares (Hashimoto et al., 1964; Boyd y Forrester, 1968; Urquilla, 1978; Sakai et al., 1979). Además, estudios sobre la liberación de ATP en los nervios sensoriales de

la oreja en conejo (Holton y Holton, 1953; Holton, 1959) fueron la base para la investigación del papel de neurotransmisor de las purinas.

Otros nucleótidos descubiertos en la década de los '60 son los diadenosina polifosfatos, identificados primero como nucleótidos citosólicos y posteriormente como mensajeros extracelulares.

1.1.1.- Los dinucleótidos de adenina: Estructura y características.

Los diadenosina polifosfatos (también conocidos como α,ω -dinucleótidos de adenina, nucleótidos diadenilados, bis(5'-adenosil) polifosfatos, dinucleótidos adenilados o polifosfatos diadenilados) pertenecen a la familia de nucleótidos de adenina. Formados por dos moléculas de adenina unidas en las posiciones 5' por un número variable de fosfatos que pueden oscilar entre 2 y 7 (abreviados como Ap_nA , $n = 2-7$) (Miras-Portugal, et al., 1999). Se conoce la existencia de seis dinucleótidos de adenina, Ap_2A , Ap_3A , Ap_4A , Ap_5A , Ap_6A y Ap_7A , los cuales se han identificado y encontrado en diversos tejidos biológicos incluidas las plaquetas (Flodgaard y Klenow, 1982; Luthje y Ogilvie, 1983), el sistema nervioso central (Pintor et al., 1992a y 1992b; Zimmermann et al., 1993; Klishin et al., 1994; Pivorun y Nordone, 1996) y los gránulos cromafines de la médula adrenal (Rodríguez del Castillo et al., 1988; Castro et al., 1990; Pintor et al., 1991 y 1992c). En la Figura 1 encontramos un esquema con la estructura de una molécula de Ap_4A :

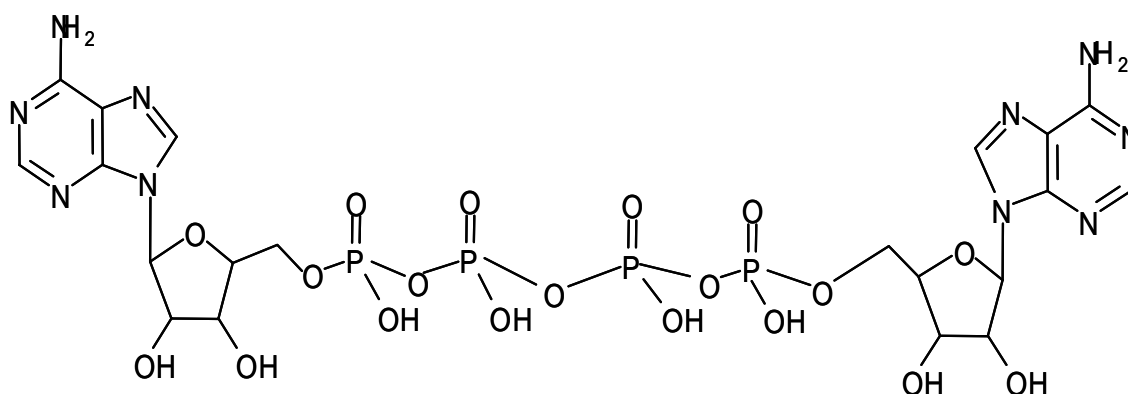


Figura 1: Estructura de una molécula de Ap_4A (P^1, P^4 -Di(adenosina-5') tetrafosfato).

La estructura de estas moléculas tiene relación con su habilidad para unirse a los diferentes receptores purinérgicos. En solución y en condiciones de pH fisiológico, los dinucleótidos de adenina adoptan una conformación plegada simétrica, inusual y con apilamiento de las bases (Mayo et al., 1990). El cambio de estructura química y el grado de apilamiento de bases depende del pH y de la longitud de la cadena de fosfatos (Mayo et al., 1990), y aunque no existe información sobre la conformación de los dinucleótidos cuando estos se unen a los purinoceptores, parece que el cambio de conformación de los dinucleótidos con el pH explica la selectividad por los receptores purinérgicos (Hoyle, 1990; Ralevic et al., 1995; Hoyle et al., 2001; Pintor et al., 2001a).

Cada uno de los fosfatos de la molécula tiene una carga negativa, lo que les permite formar complejos con cationes divalentes, lo que a su vez afecta a la unión con el receptor. Se ha visto que Mg^{2+} es capaz de formar complejos con Ap_4A (Westkaemper, 1987).

Por tanto, el pH, la longitud de la cadena de fosfatos y la unión a cationes divalentes explican porque los dinucleótidos como Ap_4A y Ap_5A no estimulan un mismo receptor de la misma manera.

1.1.2.- Almacenamiento y liberación de plaquetas, células cromafines y terminales sinápticas.

Los dinucleótidos se almacenan y liberan junto a mononucleótidos al entorno extracelular desde los gránulos densos de las plaquetas y de las células cromafines, así como de las terminales sinápticas (Rodríguez del Castillo et al., 1988; Pintor et al., 1992a, 1992c, 1993 y 1995).

El almacenamiento de Ap_3A , Ap_4A , Ap_5A y Ap_6A en altas concentraciones junto a ATP y ADP en los gránulos densos de las plaquetas es el mayor reservorio circulante de dinucleótidos de adenina del sistema vascular (Flodgaard y Klenow, 1982; Luthje y Ogilvie, 1983; Schluter et al., 1994). Tras la separación de la mezcla, la presencia de los diadenosina polifosfatos es casi indetectable en eritrocitos, leucocitos y otros componentes de la sangre. Sin embargo, la concentración de estos compuestos en

las plaquetas es de $0.42 \text{ nmoles mg}^{-1}$, en concentración 10 veces menor que los mononucleótidos de adenina (Luthje y Ogilvie, 1983).

Tanto Ap_4A como Ap_5A y Ap_6A , pero no Ap_3A , se almacenan junto a AMP, ADP, ATP y catecolaminas en los gránulos secretores densos de las células cromafines de la médula adrenal (Rodríguez del Castillo et al., 1988; Pintor et al., 1991 y 1992c). El patrón de distribución subcelular de estos dinucleótidos coincide con el de la actividad dopamina β hidroxilasa, marcador característico de las células cromafines (Rodríguez del Castillo et al., 1988). La presencia de estos dinucleótidos en la fracción citosólica es mínima, mientras que en la fracción granular la concentración de Ap_4A y Ap_5A es de $32 \text{ nmoles mg}^{-1}$ para cada uno y $49 \text{ nmoles mg}^{-1}$ para Ap_6A . La molaridad interna granular para los dinucleótidos es de aproximadamente 6 mM (Rodríguez del Castillo et al., 1988). Tras estimulación con carbacol y en presencia de Ca^{2+} extracelular, Ap_4A , Ap_5A y Ap_6A se liberan mediante exocitosis de las células cromafines junto a los mononucleótidos de adenina y las catecolaminas.

Por el contrario, en las plaquetas el ratio molar de salida de ATP frente a dinucleótidos es similar al ratio intra-granular, y representa solo el 4-5% del almacenamiento de los dinucleótidos (Pintor et al., 1992c).

Elevadas concentraciones de Ap_4A y Ap_5A se han detectado en las terminales sinápticas. Del mismo modo que ocurre en plaquetas y células cromafines, estos dinucleótidos se almacenan junto a ATP, aunque la concentración de los dinucleótidos es 22 ó 23 veces inferior a la de ATP, presentando concentraciones de 0.17 y $0.16 \text{ nmoles mg}^{-1}$ respectivamente. Estudios *in vitro*, han revelado que la liberación de los dinucleótidos de las terminales sinápticas se produce tras la despolarización de la membrana mediada por agentes como la 4-aminopiridina y la vetridina. De nuevo la salida es dependiente de Ca^{2+} (Pintor et al., 1992a).

A pesar de estos bajos porcentajes, tras la liberación localizada de los dinucleótidos, estos pueden alcanzar concentraciones fisiológicamente activas (Hohage et al., 1996; Ogilvie et al., 1996; Hollah et al., 2001; Jankowski et al., 2003; Luo et al., 2004), siendo incluso del orden de micromolar (Pintor et al., 1991).

1.1.3.- Metabolismo de los dinucleótidos de adenina: Moduladores extracelulares.

Luthje y Ogilvie describieron por primera vez en 1987 la hidrólisis asimétrica de Ap₃A y Ap₄A en AMP y ADP o ATP respectivamente, al tener actividad 5'-NPD (Nucleótido Fosfodiesterasa). En plasma, la vida media de estos dinucleótidos es similar a la del ATP, pero en sangre es mucho más larga. Esto es debido a la hidrólisis de ATP en ADP vía ecto-nucleotidasas presentes en la membrana plasmática de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas donde la actividad 5'-NPD no es perceptible. Tras la activación plaquetaria, las concentraciones extracelulares de Ap₃A y Ap₄A son del orden de 0.5 a 1 μM mientras que la concentración de ATP que se co-libera con estos dinucleótidos es de entre 20 y 40 μM. Este ATP extracelular parece ser un potente inhibidor de la hidrólisis de los dinucleótidos de adenina. De esta forma, los dinucleótidos que se liberan a la circulación, son protegidos frente a una degradación inmediata y prolongan su estabilidad relativa.

El endotelio vascular también tiene un papel fundamental en la estabilidad de Ap₃A, Ap₄A y ATP. En las células endoteliales de aorta tanto bovina como porcina se ha encontrado una rotura asimétrica de los dinucleótidos de adenina debida a la actividad 5'-NPD en la superficie de la membrana plasmática, siendo esta rotura más lenta que la debida a la actividad ecto-nucleotidasa coexistente para hidrolizar ATP. Estas marcadas diferencias en cuanto a vida media e hidrólisis de Ap₄A y de ATP explican las diferencias de concentración de ambos compuestos cuando son liberados de las plaquetas (Ogilvie et al., 1989). De este modo, los dinucleótidos pueden permanecer en la superficie de la célula endotelial durante más tiempo que los mononucleótidos.

1.1.4.- Receptores para nucleósidos, nucleótidos y dinucleótidos.

Los efectos de los dinucleótidos están mediados por receptores de membrana denominados Receptores Purinérgicos. Se dividen en dos grandes grupos: Receptores P1 o de Adenosina, y Receptores P2 o de Nucleótidos, subdivididos a su vez en dos grupos: receptores ionotrópicos P2X y receptores metabotrópicos P2Y.

1.1.4.1.- Receptores P1.

Los receptores P1 se denominan en la actualidad A, pues son receptores para el nucleósido adenosina. Son cuatro receptores: A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 . Son receptores acoplados a proteínas G, y están compuestos por siete dominios transmembrana, cada uno de ellos constituido por 21 a 28 aminoácidos formando una α -hélice, con el extremo N-terminal extracelular y el extremo C-terminal intracelular (Figura 2). Las hélices transmembrana están unidas entre sí por fragmentos hidrofóbicos de igual tamaño.

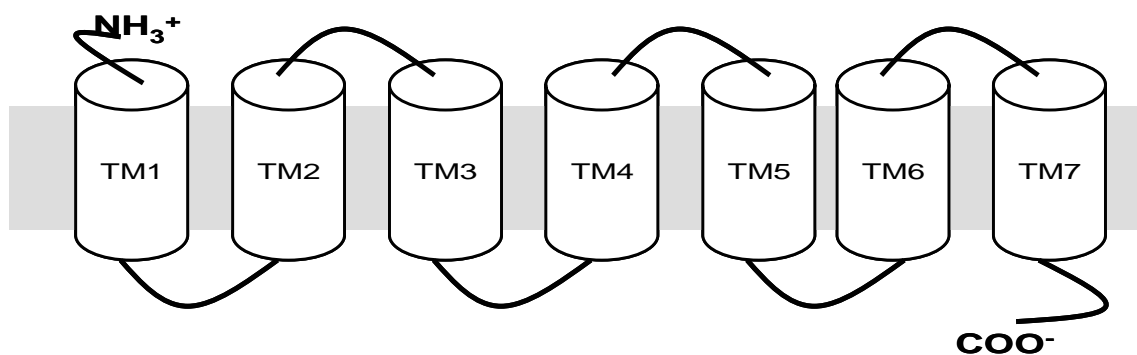


Figura 2: Estructura general de un receptor de siete dominios transmembrana.

Los receptores A_1 y A_2 fueron descritos por van Calker et al., (1979) en un estudio en el que vieron que estos receptores de adenosina inhibían vía A_1 o activaban vía A_2 la actividad adenilato ciclasa en cultivo de células cerebrales de ratón. Los receptores A_2 se subdividen a su vez en dos tipos, A_{2A} y A_{2B} , que se diferencian en la capacidad de activar la adenilato ciclasa vía sitios de unión de alta o baja afinidad (Daly et al., 1983) y en los perfiles farmacológicos. Entre estos subtipos de receptores, existe una ausencia de homología en la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, entre el receptor A_1 y A_{2B} de rata solo hay un 45 % de homología en la secuencia (Stehle et al., 1992), y el receptor A_3 humano solo comparte un 50, un 43 y un 40 % de homología con los receptores A_1 , A_{2A} y A_{2B} respectivamente (Linden, 1994).

1.1.4.2.- Receptores P2.

Son los receptores para nucleótidos y dinucleótidos. Desde las primeras subdivisiones realizadas por Burnstock en el año 1978 hasta la actualidad, se han descrito dos grandes familias de receptores para nucleótidos: los receptores ionotrópicos P2X y los receptores metabotrópicos P2Y (Figura 3) (Burnstock, 1996; Burnstock y Knight, 2004). Estos dos subtipos de receptores tienen distintos perfiles farmacológicos y distribución en los tejidos: los Receptores P2X son activados de forma más potente por análogos de ATP, α,β -metilen ATP (α,β -meATP) y β,γ -metilen ATP (β,γ -meATP), mientras que el agonista más potente para los receptores P2Y es 2-metilatio ATP (2MeSATP) según los trabajos más clásicos (Burnstock y Kennedy, 1985). En cuanto a la distribución tisular de estos receptores, se ha visto la presencia de P2X en el conducto deferente, en la vejiga urinaria, en el músculo liso vascular y, la presencia de P2Y en taenia coli de cobaya y en las células endoteliales vasculares.

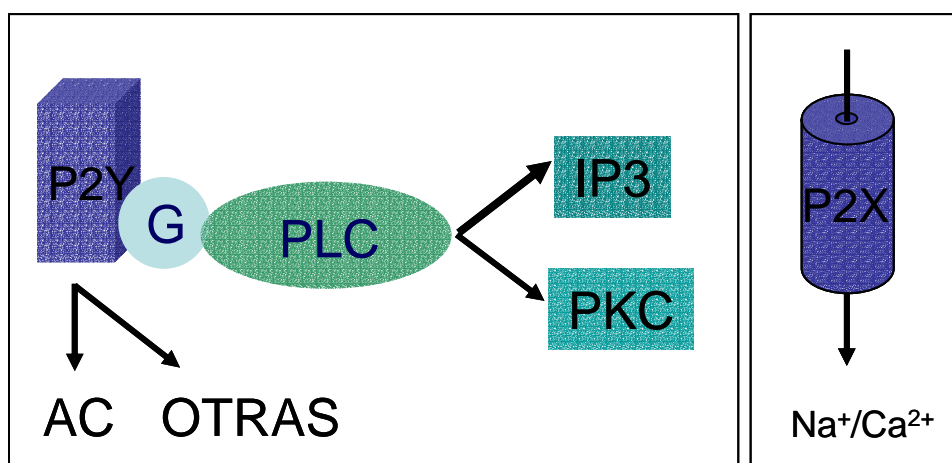


Figura 3: Esquema representativo de los receptores purinérgicos P2X y P2Y.

El clonaje de numerosas proteínas diferentes, el estudio de los segundos mensajeros y la constatación de múltiples actividades fisiológicas ponen de manifiesto la relevancia de este tipo de receptor en multitud de tejidos (Burnstock y Williams, 2000).

1.1.4.2.1.- Receptores P2X.

Los receptores purinérgicos del tipo P2X, están ampliamente distribuidos puesto que se localizan tanto en gusanos parásitos como en peces y mamíferos (Jarvis y Khakh, 2009), lo que nos indica la importancia de la señalización de ATP vía esta subclase de receptores. Son receptores ionotrópicos que actúan como canales selectivos para los iones Na^+ y Ca^{2+} (Burnstock y Kennedy, 1985; Evans, 1986; Humphrey et al., 1995; Buell et al., 1996). Estructuralmente están formados por varias subunidades caracterizadas por poseer dos dominios transmembrana y extremos C y N terminales cortos intracelulares (Silberberg et al., 2005; Roberts et al., 2006), junto a un bucle extracelular que siempre contiene 10 residuos de Cisteína (Figura 4), lo que va a generar un poro en la membrana, muy similar a los canales para Na^+ o K^+ (North, 1996):

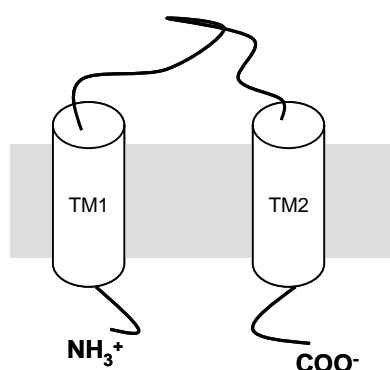


Figura 4: Diagrama descriptivo de la estructura de una subunidad de un receptor P2X.

Hasta la actualidad se han clonado 7 subunidades diferentes descritas como P2X₁ a P2X₇. Cada una de las subunidades que conforman este receptor está formada por un número de aminoácidos que oscila entre los 379 (para el receptor P2X₆) y los 595 (para el receptor P2X₇) (Jarvis y Khakh, 2009). La conformación más sencilla descrita para una subunidad de receptor P2X es la que refleja la Figura 4, es decir, dos dominios transmembrana unidos por un bucle extracelular y con dominio N- y C-terminales citosólicos. Del mismo modo, se ha definido que cada uno de los receptores P2X está constituido por 3 subunidades (Jarvis y Khakh, 2009), aunque estas subunidades pueden existir tanto en forma heteromérica como homomérica, constituyendo en última instancia una estructura cuaternaria de canal operado por ligando clásica. Se han caracterizado diferentes formas heteroméricas para los

receptores P2X₁ a P2X₆, existiendo solo la forma homomérica para el receptor P2X₇ (North y Surprenant, 2000; Khakh et al., 2001). Estos receptores están implicados en la transmisión sináptica rápida entre las neuronas o los nervios autonómicos y el músculo liso, siendo el transmisor el ATP (Benham, 1990; Edwards y Gibb, 1993).

En la Figura 5, encontramos un esquema de actuación de los diversos agonistas y antagonistas implicados en la señalización de los receptores P2X. Como observamos, los agonistas principales son ATP, MeSATP, α,β -meATP y ATP- γ -S, siendo cada uno de los subtipos P2X inhibido por antagonistas diferentes.

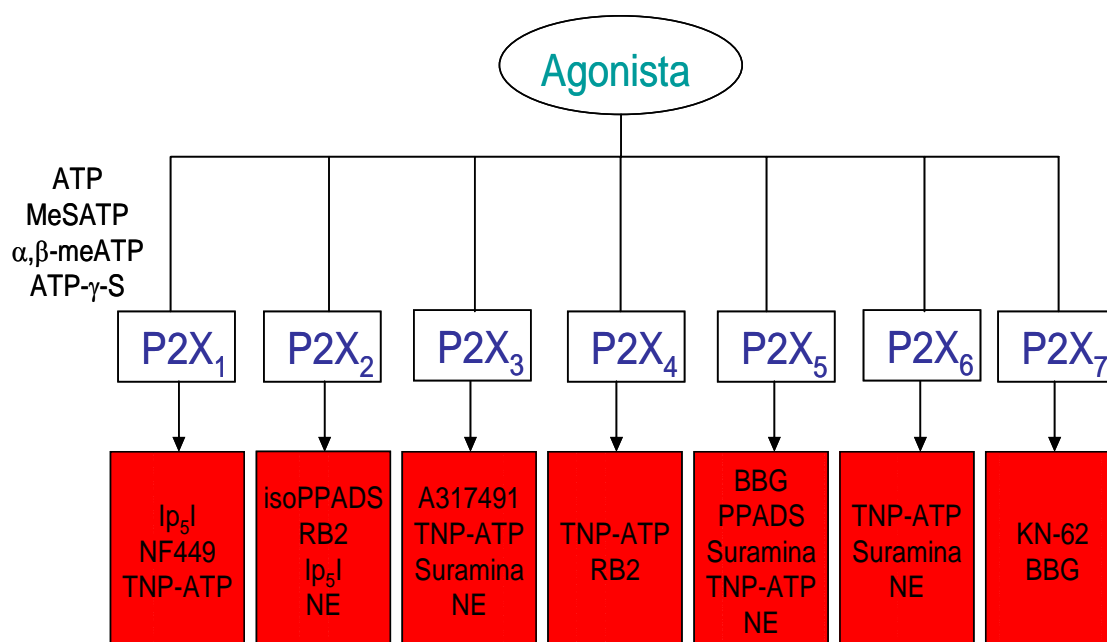


Figura 5: Esquema de activación de los receptores P2X. Varios agonistas específicos producen la activación de esta subclase de receptores, cada uno de los cuales se inhibe con antagonistas más o menos selectivos.

A continuación, la Tabla 1 refleja el orden de potencia de los agonistas y la distribución tisular de los receptores P2X:

Subtipo P2X	Especie	Distribución tisular	Agonista principal
P2X ₁	Humano Rata Ratón	Conducto deferente y vejiga urinaria, plaquetas, megacariocitos, músculo liso de pequeñas arterias y arteriolas, pulmón, bazo, ganglio trigémino, espina dorsal y cerebro.	Bz-ATP >> 2-MeSATP ≥ ATP > α,β-MeATP >> ADP
P2X ₂	Humano Rata Ratón	Cóclea de rata, glándula pituitaria, cerebelo.	2-MeSATP = ATP _γ S
P2X ₃	Humano Rata Ratón	Raíz del ganglio dorsal	Bz-ATP >> 2-MeSATP > ATP = α,β-MeATP
P2X ₄	Humano Rata Ratón	Cerebro, médula espinal, ganglio sensorial, ganglio cervical superior, pulmón, epitelio bronquial, vejiga, timo, glándula salival, testículos y conducto deferente	UDP=5Br-UDP >> UTP > 2-MeSADP Bz-ATP = ATP
P2X ₅	Humano Rata Ratón	Médula espinal cervical y neuronas del la raíz del ganglio dorsal y trigémino.	ATP ≥ 2-MeSATP > ADP
P2X ₆	Rata	Ganglio cervical superior de rata	ATP > 2-MeSATP > ADP
P2X ₇	Humano Rata Ratón	Cerebro, macrófagos,, células de origen hematopoyético, eritrocitos y fibroblastos.	Bz-ATP >> ATP

Tabla 1: Características de los receptores P2X (sacada de Boeynaems et al., 2005a).

Al menos tres moléculas de ATP son necesarias para unirse a la zona externa del receptor P2X en conformación abierta. Esto provoca cambios conformacionales en el receptor, y en ciertas ocasiones se produce un incremento de la permeabilidad para Ca²⁺ por parte de este receptor, y los subtipos P2X₂, P2X₄ y P2X₇ una vez son activados por ATP, permanecen en conformación abierta pero el cambio de conformación produce un incremento para la permeabilidad de cationes orgánicos como NMDG⁺ (N-metil-D-glucamina⁺) (Jarvis y Khakh, 2009). Esta segunda ola de activación del receptor P2X se describe como “dilatación del poro” o I₂. En otras circunstancias, tras la activación de los receptores P2X₁ y P2X₃, el cambio de conformación produce el cierre del receptor mediante un proceso denominado “desensibilización”. Ambos procesos, I₂ y la desensibilización, son específicos de cada receptor y ocurren de forma natural, aunque el mecanismo por el cual se producen son todavía desconocidos (Jarvis y Khakh, 2009).

1.1.4.2.2.- Receptores P2Y.

Los receptores purinérgicos del tipo P2Y, son de naturaleza metabotrópica, y están formados por proteínas con siete dominios transmembrana y dominios N-terminal extracelular y C-terminales intracelular (Figura 6). En la actualidad se han clonado 8 subtipos diferentes: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ (Chambers et al., 2000; Communi et al., 2001a y 2001b; Hollopeter et al., 2001; Zhang et al., 2002; Weisman et al., 2005). Se expresan en la superficie de casi todas las células, aunque los cuatro últimos están particularmente implicados en procesos como el mantenimiento del tono vascular y la agregación plaquetaria (Boeynaems 2005a y 2005b).

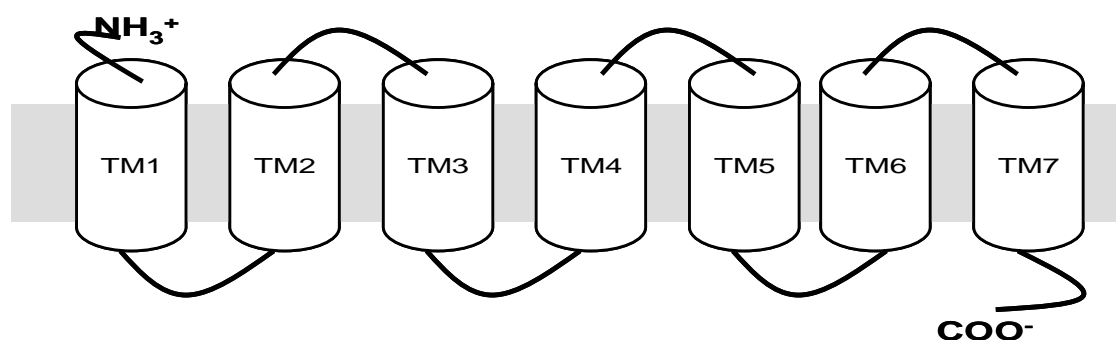


Figura 6: Diagrama descriptivo de la estructura de un receptor P2Y. Mantiene la estructura general de los receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G, donde el extremo N-terminal del receptor se encuentra en la zona extracelular, y el extremo C-terminal en el espacio citoplasmático.

Los receptores P2Y parecen haber emergido pronto en la evolución, según lo descrito por Dranoff et al., en el año 2000. Este autor identifica la señalización purinérgica como el mecanismo de señalización más antiguo. Se han encontrado receptores del tipo P2Y en varios vertebrados, incluyendo el teleosteo, el pez cartilaginoso, anfibios, reptiles, pájaros y algún mamífero que habitó la tierra hace 450 millones de años (Schulz y Schöneberg 2003). También existen evidencias experimentales de la presencia de receptores del tipo P2Y sensibles a antagonistas de receptores P2 en mitocondrias (Belous et al., 2004). Los estudios de estos receptores, indican que los más primitivos no discriminaban entre los diferentes agonistas (Dranoff et al., 2000), siendo el proceso evolutivo el que les ha ido confiriendo a cada uno de los

subtipos P2Y una mayor especificidad por los nucleótidos así como un patrón de expresión tejido-específico.

El estudio bioquímico de estos receptores P2Y indica, que en humanos, el receptor P2Y₆ está formado por 328 aminoácidos mientras que el receptor P2Y₄ tiene 377 aminoácidos en su estructura primaria. Además, se ha visto que los receptores están N-glicosilados (Erb et al., 1993, Zhong et al., 2004), siendo esta modificación esencial para la transducción de señales en el receptor P2Y₁₂, y no siéndolo para unión del ligando o la expresión en la superficie celular (Zhong et al., 2004). Todos los receptores P2Y poseen en su dominio extracelular cuatro residuos de cisteína que van a formar dos puentes disulfuro, el primero entre el dominio N-terminal y el bucle extracelular EL3, y el segundo entre los bucles extracelulares EL1 y EL2 (Hoffmann et al., 1999; Ding et al., 2003).

La secuencia de aminoácidos entre los diferentes subtipos de receptores P2Y en una misma especie no tiene un alto grado de homología. Por ejemplo, los receptores P2Y₁ y P2Y₁₂ humanos solo tienen un 18 % de homología de secuencia a pesar de la gran similitud en sus perfiles farmacológicos. Sin embargo, la homología de secuencia de un subtipo específico de receptor entre varias especies se incrementa: se ha identificado un 83 % de homología en la secuencia de aminoácidos del receptor P2Y₁₂ de humano con el de ratón (von Kügelgen y Wetter, 2000). Esta comparación de aminoácidos subdivide a los receptores P2Y en dos grupos: en el primero encontramos a los receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ y P2Y₁₁, y en el segundo grupo los restantes subtipos, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄ (Von Kügelgen, 2006):

P2Y₁.

Clonado por primera vez en cerebro de pollo embrionario (Webb et al., 1993). Este receptor media respuestas como la relajación del músculo y la salida de factores relajantes derivados del endotelio como las prostaglandinas. Este receptor también contribuye a la agregación plaquetaria inducida por ADP (Fabre et al., 1999; Leon et al., 1996 y 1999; Dorsam y Kunapuli, 2004). Se trata de un receptor selectivo para nucleótidos de adenina, y en los sistemas celulares se activa por nucleótidos de adenina

difosfato, siendo el nucleótido 2-Metiltio-ADP (2-MeSADP) diez veces más afin que ADP para este receptor P2Y₁ humano (Waldo y Harden, 2004). 2-Metiltio-ATP (2-MeSATP) y adenosina-(O-3-tiotrifosfato) (ATP γ S) también actúan como agonistas de este receptor con una potencia similar a la de ADP. Sin embargo, ATP por si mismo es un agonista parcial con una actividad intrínseca reducida cuando se compara con ADP (Waldo y Harden, 2004). Además, la potente acción de ATP observada en estudios con el receptor P2Y₁ nativo en tejido (Ralevic y Burnstock, 1998 y 2003) son debidos al ADP formado en la superficie celular tras la degradación del ATP en este por la acción del ectoenzima NTPDasa2 (Alvarado-Castillo et al., 2002 y 2005; Zimmerman, 2000). En humanos, este receptor se bloquea por suramina, PPADS, reactivo azul 2 (RB-2), NF023 y 6-(2'-cloro-azofenilpiridoxal- α 5-fosfato (MRS2210) (Guo et al., 2002). También existen antagonistas selectivos para P2Y₁ como adenosina-3'-fosfato-5'-fosfato y adenosina-3'-fosfato5'-fosfosulfato (Boyer et al., 1996). 2'-Deoxi-N⁶-metiladenosina3',5'-difosfato (MRS2179).

P2Y₂

Este receptor está ampliamente distribuido en los tejidos y se encuentra en niveles elevados en pulmón, corazón, músculo esquelético, bazo, riñón, hígado y epitelio (Lustig et al., 1993; Parr et al., 1994). Estudios en ratones deficientes en este receptor han revelado un papel fundamental de este receptor en el transporte de iones en las células epiteliales (Cressman et al., 1999; Leipziger, 2003). Nucleótidos trifosfato, incluyendo ATP, UTP, ATP γ S y uridina-(O-3-tiotrifosfato) (UTP γ S), son agonistas de este receptor. Cuando se ensayan en condiciones en las cuales no hay degradación enzimática, UDP y ADP no activan este receptor (Nicholas et al., 1996a), lo que indica que son necesarios al menos tres residuos de fosfato para activar este receptor. Además, este receptor se activa por los dinucleótidos tetrafosfato (Ap₄A y Up₄U) (Patel et al., 2001; Pendergast et al., 2001). Suramina actúa como antagonista para P2Y₂ en humanos, mientras que PPADS, MRS2179 y MRS2279 no actúan como antagonistas en este receptor. En rata, tanto PPADS como RB-2 son antagonistas aunque de forma muy débil. Recientemente se ha visto que los flavonoides bloquean el receptor nativo P2Y₂ en células NG108-15 de manera no competitiva (Kaulich et al., 2003).

P2Y₄.

Receptor de expresión más restringida puesto que se expresa solo en la placenta y en bajos niveles en pulmón y músculo liso vascular (Erlinge et al., 1998). El receptor P2Y₄ humano es muy selectivo para nucleótidos derivados de UTP (Communi et al., 1996a; Nguyen et al., 1995). En estudios en los que se aseguran las condiciones de estabilidad de los nucleótidos, tanto UTP como ATP son agonistas completos, siendo UTP cincuenta veces más potente que ATP, y con los difosfatos UDP y ADP inactivos (Nicholas et al., 1996a). Este tipo de receptor en rata y ratón, se activa tanto por UTP, ATP y otros nucleótidos trifosfato como ITP. En humanos, PPADS y RB-2 bloquean este receptor (Wildman et al., 2003), y en ratas, el bloqueo por RB-2 es completo. Lo mismo ocurre con RB-2, siendo el bloqueo máximo de P2Y₄ en ratas (Bogdanov et al., 1998; Wildman et al., 2003).

P2Y₆.

Receptor extensamente distribuido selectivo para nucleótidos difosfato siendo UDP cien veces más potente que UTP (Nicholas et al., 1996a y 1992b; Communi et al., 1996b). La mayoría de los nucleótidos de adenina son inactivos para este receptor. Se bloquea por Suramina, PPADS y RB-2 con potencia de acción decreciente en este orden.

P2Y₁₁.

Se expresa de forma elevada en inmunocitos y puede jugar un papel importante en la diferenciación de esas células (Communi et al., 1997). El receptor P2Y₁₁ humano es activado por ATP, siendo este su agonista natural. Cuando se realizan medidas de calcio intracelular, el receptor recombinante responde a la estimulación por UTP (White et al., 2003), y el análogo 2-propiltio- β,γ -diclorometilen-D-ATP (ARC67085) es también un potente agonista de este receptor. Adenosina-3'-fosfato-5'-fosfosulfato (APS) es un agonista parcial (Communi et al., 1999), y Suramina es antagonista del receptor P2Y₁₁ humano. Este subtipo de receptor responde también a RB-2 pero no a PPADS.

P2Y₁₂.

Se expresa en plaquetas y en tejido neuronal, jugando un papel esencial en la agregación plaquetaria (Dorsam y Kunapuli, 2004) y actúa como un receptor neuronal inhibitorio (Kulick y von Kügelgen, 2002). En los vasos sanguíneos humanos, la activación de este receptor contribuye a la vasoconstricción (Wihlborg et al., 2004). Se activa por derivados de ADP, y se bloquea tanto por Suramina como por RB-2, actuando también como antagonistas los nucleótidos trifosfato y el ATP (Ingall et al., 1999; Vasiljev et al., 2003 Kauffenstein et al., 2004) en el receptor humano.

P2Y₁₃.

Se expresa en células de origen hematopoyético y en tejido neural. Responde a análogos de ADP de forma similar al receptor P2Y₁₂. En algunos tipos de células, 2-MeSADP es más potente que ADP, mientras que en otros sistemas celulares son equipotentes (Marteau et al., 2003). El receptor P2Y₁₃ humano se bloquea por Suramina, RB-2 y por grandes concentraciones de PPADS (Marteau et al., 2003). Se ha visto recientemente que el derivado 2-cloro-5-nitro de PPADS también actúa como un antagonista competitivo de este subtipo de receptor P2Y en humano.

P2Y₁₄.

Receptor ampliamente distribuido siendo, en humanos, la placenta, el tejido adiposo, el estómago y el intestino, los tejidos donde se encuentra la mayor expresión de este receptor (Chambers et al., 2000). En rata, el receptor se expresa en niveles altos en células de origen hematopoyético (Charlton et al., 1997). Este receptor se activa con niveles nanomolares y micromolares bajos de UDP-glucosa, UDP-galactosa-UDP-glucurónico y UDP-N-acetilglucosamina (Chambers et al., 2000). No se conocen los antagonistas.

Los receptores P2Y se encuentran fundamentalmente, aunque no de modo exclusivo, acoplados vía proteínas Gq a la fosfolipasa C (PLC) y a la posterior generación de inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). Los receptores que han sido clonados más recientemente, P2Y₁₃ y P2Y₁₄, se encuentran acoplados negativamente a la adenilato ciclasa a través de una proteína del tipo Gi, e incluso otros sistemas de segundos mensajeros (Ralevic y Burnstock, 1998; von Kügelgen y Wetter, 2000; Chambers et al., 2000; Nicholas, 2001; Hollopeter et al., 2001).

Los receptores como P2Y₁ y P2Y₂ se acoplan, además de a las rutas anteriores, a una ruta de señalización denominada RhoA / ROCK-I. En el caso de los receptores P2Y₁, los ligandos como el 2-Me-S-ADP o el ADP, son capaces de activar una señalización intracelular a través de la regulación de proteínas quinasas como ERK1/2 (Sellers et al., 2001). La activación de estas MAP Quinasas tiene lugar tras la activación de Rho, que es una proteína perteneciente a la familia de las GTPasas, por lo que actúa como un interruptor funcional. Esta proteína estará activa tras su unión al GTP (Mackay y Hall, 1998). Rho es el factor más importante en cualquier tipo de reorganización dinámica en el que participe el citoesqueleto celular, de modo que juega un papel crítico en la migración de las células, como sucede en el caso del epitelio corneal. Cuando Rho se activa se produce la formación de los filamentos de actina y complejos de células de adhesión, lo que permite la reorganización del citoesqueleto (Nakamura et al., 2001). La activación de la cascada mediada por Rho tiene lugar por la actuación de la quinasa ROCK, que es una Ser/Thr quinasa. Esta proteína se ha localizado en el epitelio de la cornea y se piensa que juega un papel importante en la diferenciación corneal y en su mantenimiento. En el caso del receptor P2Y₂ el ATP y UTP producen un incremento de la actividad tirosina quinasa lo cual produce la fosforilación de múltiples proteínas incluida ERK2.

La siguiente figura nos resume los agonistas y antagonistas implicados en la activación de los receptores P2Y:

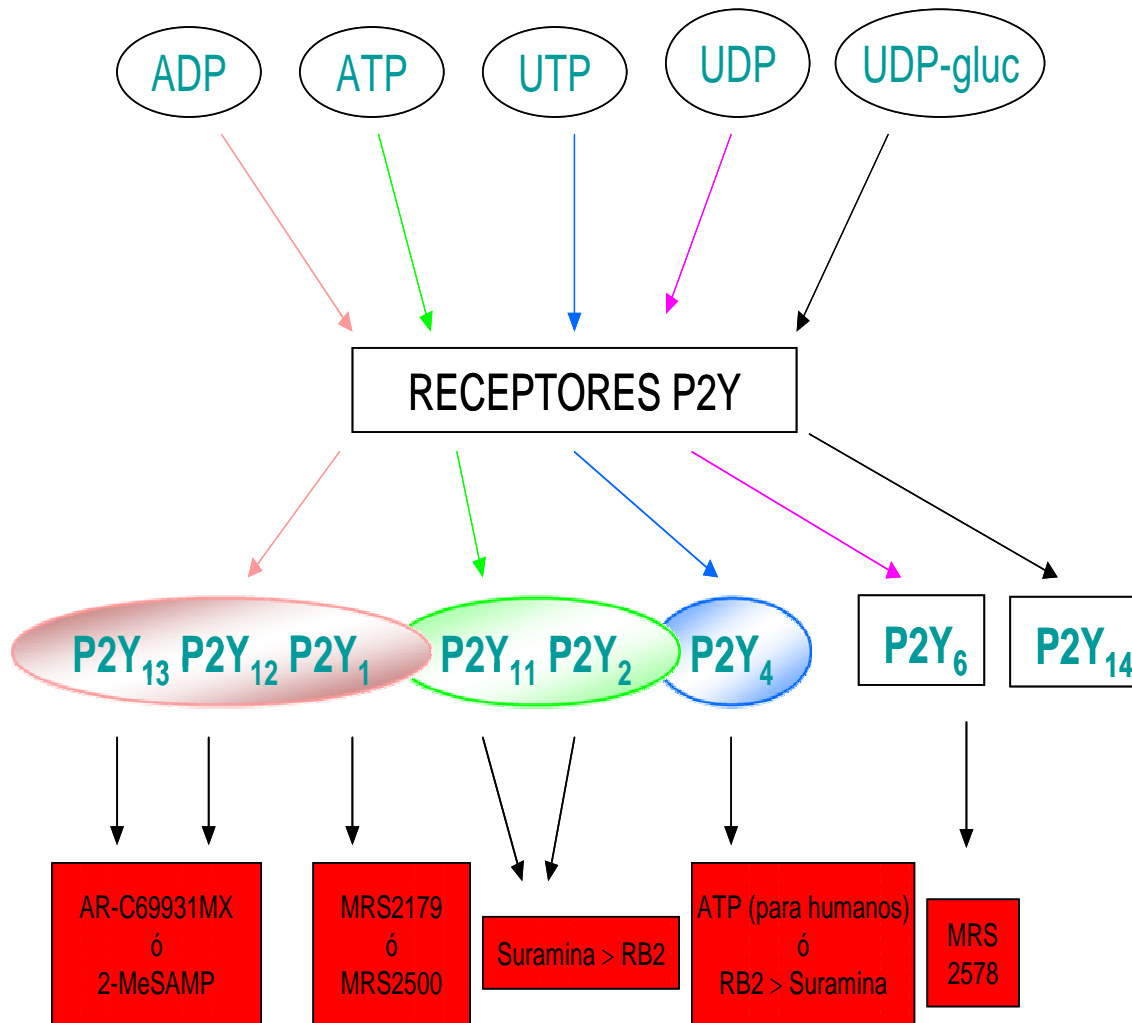


Figura 7: Esquema de activación de los receptores P2Y. Agonistas específicos producen la activación de esta subclase de receptores, cada uno de los cuales se inhibe con antagonistas más o menos selectivos

A continuación, la tabla 2 nos resumen la expresión de los distintos subtipos de receptores P2Y en los tejidos de mamífero (von Kügelgen 2006):

Subtipo P2Y	Especie	Distribución tisular	Agonista principal
P2Y ₁	Humano Bovino Rata Ratón	Ubicuo incluyendo plaquetas, corazón, músculo esquelético, tejido neuronal y tracto digestivo	(N)-mc-2-MeSADP>2-MeSADP>ADP=ADPβS>>ATP 2-MeSATP>ADP>ATP 2-MeSADP=2-MeSATP>ADP 2-MeSATP>2Cl-ATP>ATP
P2Y ₂	Humano Perro Cerdo Rata Ratón	Ubicuo incluyendo pulmón, corazón, músculo esquelético, bazo y riñón	UTP=ATP>INS37217>Ap4A>ATPγS>UTP≥ATP>ADP>2-MeSATP UTP>ITP>ATP>UDP UTP=ATP>CTP>GTP UTP=ATP>Ap4A
P2Y ₄	Humano Rata Ratón	Placenta, pulmón, músculo liso vascular, cerebro e hígado	UTP>UTPγS UTP=ATP=ITP=Ap4A UTP=ATP
P2Y ₆	Humano Rata Ratón	Ubicuo incluyendo pulmón, corazón, aorta, bazo, placenta, timo e intestino	UDP=5Br-UDP>>UTP>2-MeSADP UDP>UTP>ADP>2-MeSATP UDP>UTP>ADP>2-MeSATP
P2Y ₁₁	Humano Perro	Bazo, intestino y células del sistema inmune	ARC67085≥ATPγS=BzATP>ATP>2-MeSATP ADPβS=2-MeSADP≥2-MeSATP>ATP>
P2Y ₁₂	Humano Bovino Rata Ratón	Plaquetas y tejido neural	2-MeSADP>ADP>>(N)-mc-2-MeSADP 2-MeSADP>>ADP,ATP 2-MeSADP>ADP>ATP 2-MeSADP>ADP>ADPβS
P2Y ₁₃	Humano Rata Ratón	Bazo, leucocitos, médula ósea, hígado y cerebro	2-MeSADP≥ADP>ADPβS ADP>2-MeSADP>>ATP ADP=2-MeSADP=ADPβS>ATP
P2Y ₁₄	Humano Rata/Ratón	Placenta, tejido adiposo, intestino, cerebro y bazo	UDP-glucosa>UDP-galactosa UDP-glucosa

Tabla 2: Características de los receptores P2Y (von Kügelgen 2006).

1.1.4.2.3.- Receptores P2X y P2Y para dinucleótidos de adenina.

Los diadenosina polifosfatos pueden ejercer sus acciones activando tanto receptores P2X como receptores P2Y, y en algún caso pueden activar otros tipos de receptores, aunque estos últimos aún no se han clonado. La selectividad de los receptores depende de la longitud de la cadena de fosfatos que une las dos moléculas de adenosina. Se ha visto, que los dinucleósidos tetrafosfato tienen actividades y especificaciones similares a los análogos nucleósidos trifosfato (Shaver et al., 2005): ATP y UTP son sustratos naturales del receptor P2Y₂, y los dinucleósidos tetrafosfato constituidos por las bases uridina y adenina son altamente selectivos como agonistas de

este mismo receptor. Lo mismo se manifiesta para los dinucleósido trifosfato y sus análogos los nucleótidos difosfato (Shaver et al., 2005): ADP es un potente agonista del receptor P2Y₁ humano y los dinucleósido trifosfato de adenosina son altamente selectivos para este receptor, mientras que UDP es un potente agonista para el receptor P2Y₆ al igual que los dinucleósido trifosfato que contienen uridina.

Para los receptores P2X, todos los dinucleótidos poseen selectividades diferentes por las formas homoméricas de los receptores. Por ejemplo, Ap₄A es bastante selectivo para los receptores P2X₂, P2X₄ y la forma P2X_{2/4} (Pintor et al., 1996; Wildman et al., 1999). Para los receptores P2Y, solo los subtipos P2Y₁ y P2Y₂ son sensibles a los diadenosina polifosfatos, siendo el resto de subtipos ligeramente sensibles, lo que requiere de su activación previa (Lazarowski et al., 1995; Communi et al., 1996a; Patel et al., 2001; Pintor et al., 2002b).

En las tablas 3 y 4 encontramos un resumen de los perfiles farmacológicos para los diadenosina polifosfatos en los receptores ionotrópicos P2X y metabotrópicos P2Y. Los números entre paréntesis representan el valor pD₂, excepto en el caso del receptor P2Y₁₃ que corresponde al valor pA₂.

P2X	POTENCIA DE ACCIÓN
P2X ₁	Ap ₆ A (6.14) > Ap ₅ A (6.04) > Ap ₄ A (5.39) > Ap ₃ A (4.00)
P2X ₂	Ap ₄ A (4.82)
P2X ₃	Ap ₃ A (6.30) > Ap ₄ A (6.09) > Ap ₅ A (5.88) > Ap ₆ A (5.79)
P2X _{2/3}	Ap ₄ A
P2X ₄	Ap ₆ A (6.00) > Ap ₄ A
P2X ₅	Ap ₄ A (6.60) > Ap ₅ A (6.16) > Ap ₆ A (5.31) > Ap ₃ A (5.26)
P2X ₆	Ap ₄ A (6.20)
P2X _{4/6}	Ninguno
P2X ₇	Todos pero a concentración mayor de 1 mM

Tabla 3: Perfiles farmacológicos receptores P2X (Guzman-Aranguez et al., 2007).

P2Y	POTENCIA DE ACCIÓN
P2Y ₁	Ap ₃ A (8.05) > Ap ₄ A (6.77) > Ap ₅ A (5.77) = Ap ₆ A (5.75) >> Ap ₂ A (5.24)
P2Y ₂	Ap ₄ A (7.03) > Ap ₅ A (5.57) > Ap ₆ A (5.28) > Ap ₃ A (4.70)
P2Y ₄	Ninguno
P2Y ₆	Ap ₅ A > Ap ₃ A (a concentraciones superiores 1 mM)
P2Y ₁₁	Ninguno
P2Y ₁₃	Ap ₄ A pero actúa como antagonista (6.66)

Tabla 4: Perfiles farmacológicos receptores P2Y (Guzman-Aranguez et al., 2007).

1.2.- LOS DINUCLEOTIDOS EN LA FISILOGIA OCULAR.

La relevancia fisiológica de los nucleótidos y dinucleótidos y de sus receptores en las estructuras oculares, solamente se ha tratado en profundidad desde hace unos pocos años (Pintor et al., 2000). Así, existen un número limitado de estructuras oculares en las que se ha podido discernir el papel fisiológico y bioquímico que tienen los nucleótidos y dinucleótidos. Los efectos de éstas sustancias se han observado en procesos tan cruciales para la fisiología del ojo como la presión intraocular (PIO).

1.2.1.- Dinucleótidos y superficie ocular.

1.2.1.1.- Presencia de diadenosina polifosfatos en la lágrima: Estados normales y patológicos.

La película lagrimal protege al ojo frente a agentes externos y nutre a la superficie ocular de nutrientes, oxígeno y otros factores importantes para el correcto funcionamiento de esta parte del ojo. De todos los componentes de la lágrima, los nucleótidos son de interés desde que se ha descrito la presencia de receptores apropiados en las células corneales y conjuntivales (Kulkarni et al., 2003; Leipziger et al., 2003; Murakami et al., 2003).

Mediante cromatografía líquida de alta presión, se ha detectado la presencia de dinucleótidos (tanto Ap₄A como Ap₅A) en la lágrima tanto de conejos como humana, estando estos, comparativamente hablando, en concentraciones mayores en la lágrima

de conejo que en la humana (Pintor et al., 2002a y 2002b). La concentración de ambos está en el orden de micromolar, pero difiere entre ellos en la manera que se muestra en la siguiente tabla:

Dinucleótido	Humano (nM)	Conejo normal (μ M)	Conejo denervado (μ M)
Ap ₃ A	2.0 \pm 2.2		
Ap ₄ A	108.8 \pm 18.3	2.92 \pm 0.28	2.85 \pm 0.41
Ap ₅ A	37.0 \pm 6.2	0.58 \pm 0.11	0.66 \pm 0.20

Tabla 5: Concentración de dinucleótidos de adenina en lágrima de conejo y humana (Guzman-Aranguez et al., 2007).

Uno de los efectos más relevante hallados en este modelo animal es la capacidad de estas sustancias de incrementar la tasa de secreción lagrimal en valores que oscilan entre 120 y 160 % (Pintor et al., 2002a). Sin embargo, la variación en los niveles de estos dos dinucleótidos nos lleva a la controversia, ya que ambos se almacenan juntos y en la misma concentración en las vesículas sinápticas y en los gránulos (Pintor et al., 1991 y 1992c; Zimmermann et al., 1993). Dado su origen común, la existencia de cinco veces más Ap₄A que Ap₅A parece extraña. Una explicación puede venir dada por la presencia de ectonucleotidasas que degraden Ap₅A de manera más eficaz que Ap₄A, pero aunque estas hidrolasas han sido descritas, su actividad no explica la diferencia de concentración en la lágrima (Aguilar et al., 2001; Mediero et al., 2006). Por tanto, es posible que los dinucleótidos sean directamente liberados por las células epiteliales de la superficie ocular como veremos más adelante.

En contraste con los dinucleótidos encontrados en la lágrima de conejo, observamos que en la lágrima humana también encontramos Ap₃A a concentraciones muy bajas. De nuevo, el dinucleótido más abundante es Ap₄A, cuya concentración es tres veces mayor que la de Ap₅A y cincuenta veces superior a la de Ap₃A.

Un aspecto interesante descubierto hace poco tiempo, es que la concentración de los diadenosina polifosfatos varía en patologías tipo ojo seco (Peral et al., 2006). En estos, los niveles de Ap₄A son mayores que en ojos sanos, estando la selección de los individuos basada en el test de McMonnies, y dividiendo a la población en estudio en

controles, pacientes sintomáticos con secreción lagrimal normal y pacientes sintomáticos con baja secreción lagrimal (McMonnies et al., 1998). De los dos dinucleótidos estudiados, se ha visto que Ap₅A no varía en ninguno de los estados patológicos, siendo por tanto el más indicativo de patología el dinucleótido Ap₄A. Así, se ha empleado Ap₄A como marcador comparativo de severidad en ojo seco (Peral et al., 2006), observando como los individuos con ojo seco sintomáticos con y sin signos (volumen de secreción lagrimal normal o disminuido) tiene una concentración de Ap₄A en la lágrima significativamente superior a la que encontramos en la lágrima de individuos sanos (Peral et al., 2006). Estas diferencias en concentración de Ap₄A en los estados patológicos sugieren que este dinucleótido puede ser empleado como marcador diagnóstico para ojo seco. En la actualidad, el diagnóstico objetivo de esta patología viene definido por la mediada de osmolaridad de la lágrima. La detección de los niveles de Ap₄A puede ser la base de un test complementario al de osmolaridad que ayude tanto a oftalmólogos como a optometristas para conseguir un mejor diagnóstico de esta patología, puesto que existe una perfecta correlación entre síntomas y signos de ojo seco y los niveles de este compuesto (Peral et al., 2006).

1.2.1.2.- Origen de los dinucleótidos en la lágrima humana.

Es bastante razonable pensar que los diadenosina polifosfatos son liberados desde las terminales nerviosas que inervan la superficie ocular puesto que este comportamiento se ha observado en el sistema nervioso central (Pintor et al., 1992a y 199; Belmonte et al., 2004), pero experimentos llevados a cabo en conejos denervados mediante inyección retrobulbar de etanol, han demostrado que las concentraciones de dinucleótidos en la lágrima son similares a los de animales sanos (ver tabla 5). Esto sugiere que los diadenosina polifosfatos son liberados por otro mecanismo distinto a la salida del nervio dependiente de Ca²⁺ (Peral et al., 2006).

En humanos, el LASIK (“laser-assisted insitu keratomilrusis”) es una de las técnicas más utilizadas para la corrección de las ametropías esféricas con láser, en la cual se corta la cornea y parte del plexo nervioso que inerva la misma. Si los dinucleótidos se liberaran de las terminales nerviosas, individuos tratados con LASIK deberían tener cambios en la concentración de dinucleótidos en la lágrima. Sin embargo,

un estudio con doce pacientes de LASIK ha revelado que no hay cambios significativos en la concentración de Ap₄A, lo que sugiere que los dinucleótidos presente en la lágrima no provienen de las terminales nerviosas de la superficie ocular, sino que tiene otra fuente (Guzmán-Aranguez et al., 2007).

Los nucleótidos pueden liberarse al medio extracelular por rotura celular, el transportador ATP-binding cassette o el regulador de la conductancia transmembranosa de fibrosis cística (CFTR), así como liberación exocitótica neural (Mitchell et al., 1998; Pintor et al., 1992a; Ballerini et al., 2002; Eldred et al., 2003; Naumann et al., 2005; Pearson et al., 2005; Reigada y Mitchell, 2005; Zhao et al., 2005; Gomes et al., 2006; MacDonald et al., 2006; Stumpf et al., 2006). De momento no se conoce cuál de estos mecanismos es el que libera los dinucleótidos a la lágrima, pero experimentos recientes han demostrado que la estimulación mecánica puede ser un detonante (Peral et al., 2006). Esta estimulación mecánica se ha observado tanto en tejidos oculares como no oculares (Guyot y Hanrahan, 2002; Srinivas et al., 2002), siendo en todos los modelos la salida de nucleótidos como un proceso normal producido en condiciones fisiológicas.

Mientras que la salida por exocitosis de los dinucleótidos desde las terminales nerviosas presentes en la superficie ocular puede no ser raro, la salida mecánica es probable que ocurra de forma independiente ya que la aplicación de estímulos moderados o severos en corneas de individuos sanos no modifica la concentración de dinucleótidos en la lágrima (Peral et al., 2006). Sin embargo, cuando se anestesia a los individuos, la concentración de diadenosina polifosfatos aumenta debido a la caída en la producción de lágrima. Se puede concluir que la liberación de dinucleótidos de la superficie ocular es una respuesta a la estimulación mecánica y aumenta con la frecuencia de parpadeo o con la presencia de un cuerpo extraño en el ojo. Por tanto, los dinucleótidos, y especialmente Ap₄A, podrían ser importantes como reparadores corneales.

1.2.1.3.- Efecto en la secreción lagrimal.

La presencia de diadenosina polifosfatos en lágrima tanto en animales como en humanos sugiere que pueden modificar la fisiología de la superficie ocular. Como ya hemos mencionado, en conejos de la raza Nueva Zelanda, la aplicación tópica de dinucleótidos produce un aumento en el volumen lagrimal, que es dependiente de la longitud de la cadena de fosfatos que une las dos moléculas de adenosina (Pintor et al., 2002b). Tanto Ap₂A como Ap₃A producen menos secreción lagrimal, mientras que Ap₄A, Ap₅A y Ap₆A son más efectivos, siendo el más activo de todos Ap₄A, ya que incrementa la producción de lágrima en un 60 % sobre los valores normales de lágrima y Ap₅A y Ap₆A los incrementan solo un 20 %. Sin embargo, todavía no está muy claro si el incremento de la secreción lagrimal se produce por la inducción de la producción lagrimal en la glándula lagrimal o en otras estructuras secretoras (Cowlen et al., 2003). Lo que si está claro es que el efecto de estos dinucleótidos viene mediado por el receptor P2Y₂ (Lazarowski et al., 1995, Nicholas et al., 1996a).

Además, cuando aplicamos tópicamente de forma conjunta Ap₄A y Melatonina, se produce un incremento aun mayor en la secreción lagrimal, efecto que es revertido con el pre-tratamiento tópico de Luzindol, un antagonista del receptor de melatonina, lo que implicaría la relación entre el receptor P2Y₂ y el receptor MT de melatonina (Hoyle et al., 2006).

Por todo eso, es bastante razonable el pensar que estos dinucleótidos pueden emplearse en el tratamiento del ojo seco. El desarrollo farmacológico de análogos de Ap₄A, como el diuridina tetrafosfato, Up₄U, (también llamado INS365 o Diquafosol[®] de Inspire Pharmaceuticals), y más recientemente el Prolacria[®], están emergiendo como una terapia muy prometedora para el ojo seco (Yerxa et al., 1999 y 2001).

1.2.1.4.- Efecto en la producción de lisozima.

Como ya hemos mencionado, la superficie ocular está expuesta a daños producidos por cuerpos extraños, a invasión de microorganismos, etc (Saxena et al., 2003). Lactoferrina y Lisozima son dos proteínas con acción protectora encontradas en la lágrima (Leitch y Willcox, 1998, 1999a y 1999b; Paulsen et al., 2001; Stoeckelhuber et al., 2004) y la concentración de la última es independiente de la secreción lagrimal (Fullard y Zinder, 1990; Sack et al., 2000).

Se ha encontrado que en conejos de la raza Nueva Zelanda la aplicación tópica de algún nucleótido modifica la secreción de lisozima a la lágrima. La instilación de Ap₄A (en dosis de 100 μM), UTP y dinucleótido Up₄U incrementan los niveles de lisozima aproximadamente en un 140 % sobre los valores control. La instilación de una única dosis de los dinucleótidos mantienen los niveles de lisozima elevados por un periodo de 4 horas, lo que indica el potencial papel de estos dinucleótidos como tratamiento para infecciones (Peral et al., 2008).

1.2.2.- Diadenosina polifosfatos en cámara anterior y posterior.

1.2.2.1.- Presencia de los diadenosina polifosfatos en el humor acuoso.

El humor acuoso es el fluido que provee de nutrientes a las estructuras avasculares del ojo, principalmente a la cornea y al cristalino. Además, su secreción mantiene la presión intraocular (PIO).

De todos los componentes diferentes del humor acuoso, los nucleótidos y dinucleótidos son unas importantes moléculas señalizadoras cuya presencia en el humor acuoso fue identificada por Mitchell et al., en 1998 como provenientes de los procesos ciliares. Ni el mecanismo de liberación ni el control del mismo son bien conocidos, pero el estudio de la liberación de nucleótidos desde el epitelio pigmentado y no pigmentado de los procesos ciliares si que se ha estudiado. Además, se ha identificado un gran número de receptores P2 en las estructuras bañadas por el humor acuoso, lo que sugiere que tanto los nucleótidos como los nucleósidos pueden estar involucrados en

importantes funciones fisiológicas (Redzic et al., 1998; Farahbakhsh y Cilluffo, 2002; Pintor et al., 2003, 2004b y 2005).

Por cromatografía líquida de alta presión, se han encontrado en humor acuoso tanto Ap₄A como Ap₅A, en niveles de 0.34 y 0,08 μM respectivamente (Pintor et al., 2003), lo que sugiere la presencia de receptores purinérgicos y de efectos fisiológicos (Pintor et al., 2004c).

1.2.2.2.- Efecto de los diadenosina polifosfatos en la presión intraocular.

Uno de los aspectos más interesantes relacionados con los nucleótidos es su papel como reguladores de la presión intraocular (PIO). Nucleósidos como Adenosina y alguno de sus análogos fueron los primeros con los que se testó la capacidad de modulación de la PIO (Crosson y Gray, 1996 y 1997; Crosson, 2001). En estos estudios quedó claramente confirmado que adenosina podía tanto aumentar como disminuir la PIO dependiendo del receptor que estimulase. Además, mononucleótidos como el ATP y análogos como el β,γ-metilenATP también son capaces de modificar la PIO reduciéndola de modo significativo (Pintor y Peral, 2001). El ATP está presente como constituyente del humor acuoso y puede participar en el control de la PIO cuando es liberado de los procesos ciliares (Mitchell et al., 2001).

La presencia de receptores para nucleótidos en los lugares de secreción (procesos ciliares) y drenaje (malla trabecular) del humor acuoso sugieren que tanto los mononucleótidos como los dinucleótidos pueden modular ambos procesos y de esta manera modificar la PIO (Chen y Sears, 1997; Farahbakhsh y Cilluffo, 2002; Pintor et al., 2004c; Crosson et al., 2004; Soto et al., 2005).

Cuando se aplica de forma tópica dinucleótidos en la cornea de conejos de la raza Nueva Zelanda, se producen los cambios esperados en la PIO: Ap₂A, Ap₃A y Ap₅A aumentan de forma significativa la PIO de manera concentración-dependiente, mientras que Ap₄A ejerce la acción contraria, es decir, es hipotensivo, reduciendo de nuevo la PIO de forma concentración-dependiente (Pintor et al., 2003). Todas estas acciones parecen estar mediadas parcialmente por un receptor purinérgico del tipo P2X ya que

β,γ -metilenATP inhibe completamente el efecto hipotensivo de Ap_4A (Pintor y Peral, 2001) y es antagonizado tanto por Suramina como por PPADS (Pintor et al., 2003). Sin embargo, se ha podido ver que el Ap_4A es capaz de estimular receptores $P2Y_1$ en células trabeculares (Soto et al., 2005).

La localización anatómica de los receptores $P2X$ implicados (principalmente $P2X_2$) en la reducción de la PIO vía Ap_4A , parece situarlos en las terminales nerviosas que inervan y controlan los procesos ciliares, porque la denervación mediante inyección retrobulbar con metanol, abole el efecto hipotensivo tanto de Ap_4A como de β,γ -metilenATP (Pintor et al., 2003 y 2005; Pintor y Peral, 2001). Un estudio detallado de $P2X_2$ en los terminales nerviosos han localizado estos en los terminales nerviosos parasimpáticos, ya que el uso de anti-colinérgicos bloquean la acción hipotensora de los mono- y dinucleótidos (Pintor y Peral, 2001; Pintor et al., 2005; Peral et al., 2009). Es bastante probable que Ap_4A active los receptores $P2X_2$ presentes en las terminales colinérgicas que inervan tanto los procesos ciliares como el músculo ciliar para facilitar la salida de Acetilcolina, lo que produce la contracción del músculo tirando del spuela escleral y abriendo el ángulo iridocorneal, lo que disminuye la resistencia hidrodinámica a la salida del flujo (Pintor et al., 2005).

Además de localizar el efecto de los diadenosina polifosfatos en las terminales nerviosas, se ha demostrado el efecto en la malla trabecular (tejido de evacuación del humor acuoso), lo que es consistente con la presencia de receptores $P2Y$ en las estructuras oculares (Crosson et al., 2004; Soto et al., 2005). Estudios de perfusión en segmento anterior del ojo han demostrado que la respuesta es vía activación de un receptor $P2Y_1$ (Soto et al., 2005).

Por último, el cristalino está bañado por el humor acuoso, y por tanto su epitelio responde a los cambios en la concentración de dinucleótidos de este fluido. Los receptores implicados son $P2Y_1$ y $P2Y_2$ como se ha demostrado por hibridación *in situ* y RT-PCR (Merriman-Smith et al., 1998; Collison y Duncan, 2001; Cowlen et al., 2003). Si consideramos que Ap_4A es el dinucleótido más representativo del humor acuoso y que este es capaz de unirse a ambos subtipos de receptores, el efecto que se produce en las fibras corticales del cristalino son cambios en el Ca^{2+} intracelular, lo que podría

modular la actividad de diversos canales de K^+ (Rhodes et al., 2003) que determinarían el potencial de membrana del cristalino, y canales de Cl^- (Valverde et al., 1992) lo que contribuiría a la regulación del volumen del cristalino.

1.2.3.-Diadenosina polifosfatos en la retina.

La presencia y actividad de los dinucleótidos en la retina son de momento especulativas. Al ser la retina neural parte del Sistema Nervioso Central, podríamos esperar encontrar dinucleótidos co-almacenados junto a otras monoaminas o acetilcolina en las células amacrinas de la retina (como ocurre en otros modelos) (Pintor et al., 1992a y 1992b). Se han identificado diversos receptores del tipo P2X (Brandle et al., 1998a y 1998b; Wheeler-Schilling et al., 2001) y P2Y (Sugioka et al., 1996; Cowlen et al., 2003; Fries et al., 2004a y 2004b) en la retina neural. Sin embargo, de momento no existen evidencias que reporten un papel específico para los dinucleótidos en la retina neural, y aunque se ha demostrado la liberación de dinucleótidos desde las células del epitelio pigmentado de la retina, no hay evidencia de la presencia natural de dinucleótidos extracelulares (Mitchell, 2001; Pearson et al., 2005; Reigada y Mitchell, 2005).

A pesar de la poca información en relación a la presencia de los dinucleótidos en la retina, se ha podido comprobar la eficacia de los dinucleótidos en procesos patológicos tales como el desprendimiento de retina. El epitelio pigmentado de la retina (EPR) presenta receptores purinérgicos del tipo P2Y₂ (Peterson et al., 1997). Su papel es el mantenimiento de la composición y volumen adecuado del espacio subretinal. Como consecuencia de su activación es posible medir un incremento en el transporte del ion Cl^- en las membranas basolaterales de las células del EPR (Ryan et al., 1999). Los estudios pre-clínicos realizados con el dinucleótido 2' deoxicitidina tetrafosfo uridina, dCp₄U (INS37217), muestran un fuerte aumento de la reabsorción de fluido en un modelo de desprendimiento de retina (Maminishikis et al., 2002).

1.3.- ANATOMÍA OCULAR.

Aunque existen diferencias entre individuos, el ojo humano es una esfera de aproximadamente 2.5 cm de diámetro con un volumen de 6.5 ml. Puede separarse en dos esferas: una más pequeña en la parte anterior constituida por la Cornea (ocupa una superficie de 1/6 de la circunferencia del globo y con un radio aproximado de 7.8 mm), y una esfera larga formada por la Esclera, que ocupa los 5/6 restantes de la circunferencia del globo y tiene un radio de unos 11.5 mm. Estas dos esferas se unen entre sí por una región llamada Limbo o unión corneo-escleral. En promedio, la longitud axial del globo ocular es de 24 mm, el diámetro de 23 mm y la longitud horizontal de 23.5 mm (Forrester et al., 2002).

El ojo, es el órgano altamente especializado en la fotorrecepción, proceso mediante el cual la energía lumínica ambiental produce cambios en las células nerviosas especializadas de la retina, los conos y los bastones. Estos cambios resultan en la generación de potenciales nerviosos de acción que son transmitidos por el nervio óptico al cerebro, donde se procesará la información para generar la imagen visible.

Todas las estructuras del ojo son secundarias de este proceso fisiológico básico, aunque estas son fundamentales para enfocar y transmitir la luz a la retina.

El conjunto de estructuras oculares puede dividirse en tres capas o túnicas: 1) la capa fibrosa corneoescleral; 2) la capa uveal formada por la coroides, el cuerpo ciliar y el iris; y 3) la capa neural constituida por la retina. Estas capas envuelven a las lentes (cristalino) y a los medios transparentes que bañan el ojo, el humor acuoso en la cámara anterior y el humor vítreo en la cámara posterior (Figura 8). En conjunto, la cornea y la esclera constituyen una dura capa fibrosa que protege y envuelve a los demás tejidos oculares, y supone un apoyo estructural importante para los contenidos intraoculares y para el anclaje de los músculos extraoculares (Forrester et al., 2002).

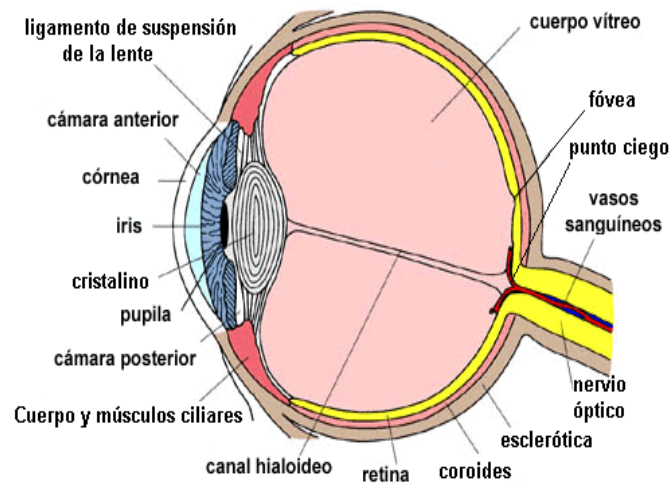


Figura 8: Diagrama esquematizado de un ojo humano en sección transversal. Revela los componentes mayoritarios que conforman las tres capas del ojo: la capa corneoescleral en marrón, en naranja encontramos la capa uvea, y por último en amarillo localizamos la capa neural.

1.3.1.- Anatomía de la cornea.

La cornea es el tejido más especializado de la superficie corporal. Consiste en una estructura hemisférica transparente, avascular y rígida que permite, junto con la curvatura de su superficie, mantener la refracción puesto que su función principal es la de actuar como una membrana protectora y refrigerante por la que penetran los rayos de luz hacia la retina. También es la porción anatómica del cuerpo que posee más terminaciones nerviosas sensoriales.

Posee propiedades ópticas de refracción significativas que pueden variar un poco con la edad. Podemos considerarla como el primero de los lentes que conforman el sistema óptico de nuestros ojos, representando cerca de $\frac{2}{3}$ de la capacidad de enfoque del ojo. Es convexa-cóncava con aproximadamente 48 dioptrías en la cara anterior y 4 ó 5 dioptrías en la posterior, lo que hace que la cornea, tenga una potencia de aproximadamente 44 dioptrías. Debido a esta condición de primer lente, la cornea tiene una gran importancia en nuestra visión, y una falta de transparencia o una deformidad en nuestra cornea provocará una mala imagen en la retina.

La transparencia de la cornea es la propiedad más importante y es debida a la regularidad y “alineamiento” del epitelio, a su avascularidad y a la disposición regular

de los componentes celulares y extracelulares del estroma que a su vez depende del estado de hidratación, metabolismo y nutrición de los elementos estromales.

El grosor medio de la cornea en los individuos adultos oscila entre 11 y 12 mm, y el espesor es variable según la persona y la raza, y suele oscilar entre las 500 y 600 micras, siendo más gruesa en la periferia que en la zona central. El diámetro vertical (10.6 mm) es menor que el horizontal (11.7 mm), pero vista por detrás la circunferencia es circular. Se nutre de la lágrima y del humor acuoso. Como acabamos de mencionar, el radio central de la cornea es de 7.8 mm, con la periferia corneal menos marcada. Además, el espesor corneal en la periferia es mayor al central (0.67 mm frente a los 0.52 mm centrales).

Aunque existen diferencias entre la estructura corneal entre los animales y el hombre, de modo general la cornea está organizada en 5 capas fundamentales (Figura 9): desde la superficie al interior del ojo, estas capas son: 1) epitelio, 2) membrana de Bowman, 3) estroma, 4) membrana de Descemet y 5) endotelio. De estas cinco capas el origen embriológico del epitelio es el ectodermo, mientras que la cresta neural es de donde derivan tanto los queratocitos como las células endoteliales y las células nerviosas (Bard y Hay, 1975; Hayashi et al., 1986; Bard et al., 1988).

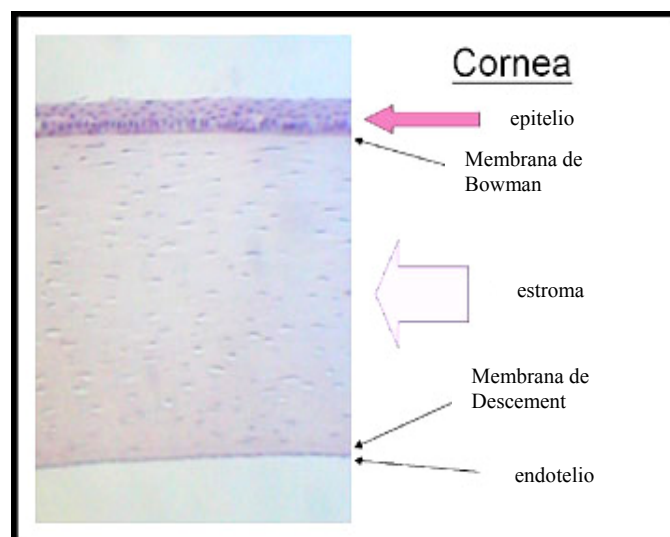


Figura 9: Esquema organizativo de la cornea en el cual podemos apreciar las cinco capas que componen este tejido ocular.

Si comparamos la estructura corneal de un ojo humano, con la estructura de una cornea de conejo, podemos observar: 1) el espesor corneal medio en conejos es de 370 micras, siendo la cornea por tanto bastante más delgada que la humana, 2) la cornea abarca el 25 % del área superficial del ojo en comparación con el 7 % en humanos y 3) la membrana de Bowman está ausente en la cornea de conejo.

1) Epitelio:

Es la capa más externa y que constituye una barrera de entrada para los microorganismos en el ojo. Es un epitelio estratificado escamoso no queratinizado y está formado por 5 ó 6 capas de células bien estructuradas, con un grosor de unos 50 a 60 μm , que se dividen en la capa basal de células, las capas de células intermedias y la capa de células superficiales. Las células de la capa basal descansan sobre una débil lámina basal, y las células adyacentes están unidas entre sí por numerosos desmosomas y están unidas a la lámina basal subyacente por hemidesmosomas y filamentos de anclaje. La superficie anterior del epitelio corneal está caracterizado por la presencia de microvilli cuya cubierta de glicocalix interacciona con la película lagrimal pre-corneal y ayuda a estabilizarla. Por la zona inferior, se une a la Membrana de Bowman vía un complejo de fibras de anclaje constituidas por Colágeno tipo VI y VII, que interaccionan con la lámina densa y las fibras de colágeno de la Membrana de Bowman.

La renovación de las células del epitelio se produce mediante la actividad mitótica de las células de la capa basal, y el reemplazo celular se realiza de manera superficial y centrípeta. El epitelio corneal responde de manera rápida para reparar las interrupciones en la integridad epitelial mediante movimientos ameboides y división celular de las células que se encuentran en el margen de la zona dañada. La zona central del epitelio corneal carece tanto de melanocitos como de células inmunocompetentes, incluyendo las células de Langerhans (células dendríticas relacionadas con el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II)).

2) Membrana de Bowman.

Es una capa transparente acelular modificada del estroma de un grosor comprendido entre los 8 y los 12 μm . Consiste en un fino alineamiento de fibras de colágeno tipos I, III, V y VI con un grosor de 20 a 30 nm de diámetro. La superficie anterior está bien definida y está separada del epitelio por una fina lámina basal, mientras que el límite posterior se fusiona con el estroma. Por último, esta capa termina de forma abrupta en el Limbo.

3) Estroma.

Es la capa que ocupa el 90% del grosor de la cornea. Está compuesto por unas 200 a 250 laminillas entrecruzadas de tejido conectivo denso de gran regularidad orientadas de forma paralela a la superficie corneal y que se continúan con la esclera a nivel del limbo. Entre las laminillas se encuentran fibroblastos modificados llamados Queratocitos. Estas células son de forma estrellada y poseen un citoplasma con extensiones que contienen pocos orgánulos y un núcleo celular aplanado y paralelo a la superficie corneal. Estos queratocitos están conectados con las células vecinas mediante gap junctions y siguen un patrón de sacacorchos (Muller et al., 1995). Las fibras de colágeno más abundantes son las de tipo I, encontrando también fibras de colágeno de tipo III, V y VI. La transparencia de la cornea se debe al espaciamiento regular de estas fibras de colágeno (distancia interfibrilar), el cual a su vez está regulado por glucosaminoglicanos (Keratán sulfato y Dermatán sulfato son los predominantes en la cornea humana) y proteoglicanos formando puentes entre las fibrillas de colágeno.

Esta capa corneal no contiene vasos sanguíneos ni linfáticos, pero sí fibras nerviosas sensoriales que provienen del epitelio corneal.

4) Membrana de Descemet.

Se trata de una capa fina y homogénea que se localiza entre el estroma posterior y el endotelio, tiene un marcaje de Schiff positivo y se continúa en la zona periférica con la zona cortical de la Malla Trabecular. Tiene un grosor de 8 a 12 μm y representa el basamento modificado del endotelio. Se divide en dos partes: el tercio anterior que es bandeado y los dos tercios posteriores que son homogéneos o no bandeados. Rica en

glicoproteínas de membrana basal, laminina y colágeno tipo IV. La región anterior contiene Colágeno tipo VIII. Los colágenos V y VI mantienen la adherencia entre esta capa y el estroma adyacente.

5) Endotelio.

Está formado por una única capa de células escamosas de estructura uniforme, y se localiza en la superficie posterior de la cornea sobre la membrana de Descemet. Tiene un papel fundamental en hidratación corneal y por tanto en la transparencia de la misma. El endotelio corneal descansa en la Membrana de Descemet y sus células constituyen un mosaico en conformación poligonal o hexagonal visible *in vivo* mediante el empleo del microscopio especular. Las células endoteliales poseen gran cantidad de mitocondrias, indicativo del papel crucial en el transporte de fluidos. En una cornea normal, estas células tienen una tasa de regeneración muy baja, y la pérdida celular se reemplaza mediante el esparcimiento de las células adyacentes. En el nacimiento, tenemos entre 3000 y 4000 células / mm², número que desciende a las 2500 células / mm² en la edad adulta y a las 2000 células / mm² en la vejez (Waring et al., 1982). Como consecuencia, con la edad, el denso mosaico hexagonal regular que observamos en una cornea joven, se va a transformar en un mosaico menos denso con un menor número de células y más heterogéneamente distribuidas.

Una lesión en el endotelio corneal y una densidad celular menor a 800 células / mm² produce de forma rápida edema e hinchazón en el estroma, lo que resulta en una pérdida de la transparencia corneal.

Por último, la película lagrimal se puede considerar una parte más de la cornea, porque en un ojo normal y sano siempre hay una capa de lágrima cubriendo, lubricando y protegiendo el epitelio.

1.4.- EL PROCESO DE RE-EPITELIZACIÓN CORNEAL.

El epitelio es la parte de la cornea más superficial y está en continua renovación, estimándose una regeneración completa cada 7 a 10 días. Las células nuevas derivan de la actividad mitótica de las células basales limbales, las cuales reemplazan a las células preexistentes de forma superficial y centripeta mediante movimientos ameboides.

Al ser la capa más externa, el epitelio es el más expuesto a las agresiones. Estas agresiones pueden tener su origen en diversos factores como la entrada de un cuerpo extraño, algún proceso traumático o un porte inadecuado de las lentes de contacto. También, y de modo más reciente, el auge en las operaciones de cirugía refractiva hace que el epitelio (y otras regiones corneales) se vean alteradas y por consiguiente requieran de una reparación tras el daño producido.

La transparenta corneal y la refracción óptica dependen de la capacidad de las células epiteliales para renovarse. Esta renovación del epitelio corneal se mantiene gracias a la proliferación y a la diferenciación de las células madre residentes en el limbo.

Sea cual sea el tipo de daño que causa la lesión epitelial, el proceso de re-epitelización corneal (cicatrización) es un proceso continuo dividido en tres pasos fundamentales: 1) la fase de latencia; 2) fase de migración; y 3) fase de división celular (Steele, 1999) (Figura 10).

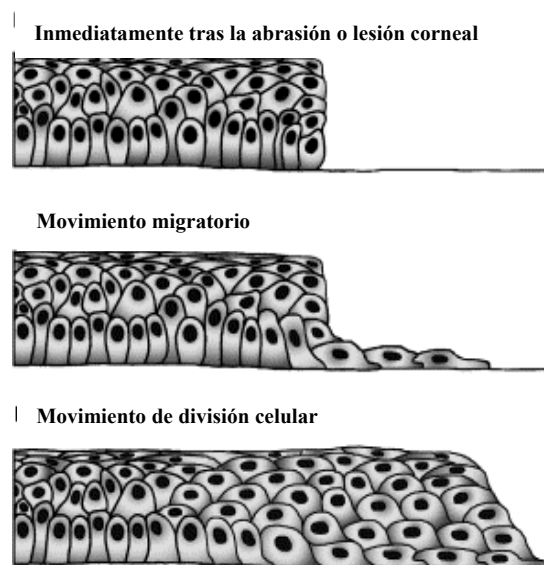


Figura 10: Fases de re-epitelización corneal (Suzuki et al., 2003). El panel superior refleja la primera etapa del proceso (fase de latencia), la imagen central representa la fase de migración, y por último, la imagen inferior representa la última etapa del proceso (fase de división celular).

1) La fase de latencia.

Es el primer paso, que ocurre entre las 4 y 6 horas posteriores a la lesión. En esta fase, se produce una reorganización de la célula y la síntesis de proteínas que van a actuar en la siguiente fase del ciclo, como son las proteínas de citoesqueleto (actina, vinculina, talina, etc) (Zeiske et al., 1986) y las glicoproteínas de superficie celular (Panjwani et al., 1990). Lo significativo de esta primera etapa del proceso, es que los leucocitos polimorfonucleares provenientes de la película lagrimal se encargan de eliminar las células necróticas, motivo por el cual se produce un aumento significativo del área de la lesión. Estos polimorfonucleares desaparecen cuando una monocapa de células epiteliales cubre el área lesionada. Al mismo tiempo, las células epiteliales del borde de la lesión pierden sus microvilli además de los anclajes (hemidesmosomas) entre ellas. En la etapa final de esta fase de latencia, las células comienzan a sufrir transformaciones con la emisión de prolongaciones como filopodios y lamelipodios (Haik y Zimny, 1977), echo que marca el principio de la siguiente fase del proceso.

2) La fase de migración.

Se caracteriza por el desplazamiento de las células que se encuentran en el margen de la lesión antes de que se produzca la mitosis. Esta fase se lleva a cabo en un tiempo que oscila entre las 24 y 36 horas posteriores a la lesión. Este es un proceso que depende de la activación de los filamentos de actina y donde también intervienen proteínas tales como fodrina, vinculina y la ankirina (Kurpakus et al., 1999; Kang et al., 1999). El aumento en la síntesis de estas y otras proteínas requiere energía que proviene del metabolismo de glucógeno. Son estos filamentos de actina los que confieren a las células el soporte de citoesqueleto necesario en esta fase, y se localizan en los bordes de la célula migrante formando filopodios y lamelipodios.

La migración de las células epiteliales para cubrir la zona lesionada, es un proceso cíclico, en el que la producción de filopodios y lamelipodios va seguido de un anclaje temporal a la lámina basal, para que así los mecanismos de contractilidad permitan a la célula desplazarse hacia delante, romper los anclajes temporales y repetir de nuevo el proceso. En esta etapa se sintetizan en la superficie de la zona lesionada proteínas de matriz extracelular (fibronectina, fibrina / fibrinógeno, laminina y tenascina), siendo la fibronectina probablemente la más relevante. Su función es la de crear un basamento transitorio en el cual se anclan las células epiteliales que están migrando en el proceso cíclico que acabamos de describir de anclaje - movimiento (Gundorova et al., 1994). Esta fibronectina aparece en la zona de la lesión transcurrida una hora aproximadamente de la misma, y se ha visto que estimula a las células epiteliales en la producción del activador de plasminógeno, el cual convierte el plasminógeno a plasmina, lo que conlleva a la rotura de las adhesiones célula – célula y célula – matriz extracelular. De esta manera, los filopodios y lamelipodios se unen y liberan el basamento permitiendo que el ciclo se repita de modo constante. Una vez que la migración celular ha permitido cubrir por completo la zona afectada, la fibronectina desaparece y ello permite el establecimiento de anclajes firmes a la membrana de Bowman, mediante la creación de nuevos hemidesmosomas y filamentos de anclaje compuestos principalmente por colágeno tipo VII (Wilson et al., 1999). Hasta este momento los anclajes han sido relativamente débiles, permitiendo al nuevo epitelio en formación “despegarse” fácilmente (si las uniones entre células fueran muy fuertes,

estas no serían capaces de migrar para cubrir la zona lesionada). En este “despegue” de la matriz extracelular sintetizada actúan enzimas proteolíticas como el activador de plasminógeno tipo urokinasa (u-PA). Estudios inmunocitoquímicos para localizar la expresión de u-PA en células en migración, reflejan la presencia de este en células en el margen de la lesión, siendo la actividad de esta proteína mayor en cultivos celulares lesionados que en no lesionados (Suzuki et al., 2003).

Hay varios estudios (Steele, 1999) que indican que la migración celular se produce de forma centrípeta desde el limbo hacia el centro de la cornea. En el caso de abrasiones centrales de gran tamaño, el movimiento centrípeto de células puede ocurrir desde diversos puntos del limbo corneal. Estudios en animales reflejan que la velocidad de migración varía con la especie animal.

3) La fase de división celular.

Es la última fase del proceso. Puede llevar hasta varios meses, ya que la proliferación de las células epiteliales dura hasta que el grosor del epitelio normal se ha recuperado. Las células principales en esta etapa son las células epiteliales basales. El proceso que se produce es la activación de las células del limbo corneal denominadas *pluripotentes* o *stem cells*. ¿Por qué sabemos que provienen del limbo? Se ha visto que lesiones cercanas al limbo re-epitelizan antes que lesiones centrales. Las células pluripotentes limbales se dividen rápidamente produciendo una célula denominada *células de amplificación transitorias* (TACs), refiriéndonos de esta manera a células basales, que a su vez se dividen para producir otras células más diferenciadas denominadas *células post mitóticas* (PMCs). Estas últimas, a su vez se dividen para producir las *células diferenciadas terminales* (TDCs), que junto con las anteriores, van a formar las capas suprabasales de células del epitelio corneal. Estas células se dividirán hasta regenerar por completo el espesor epitelial normal (aproximadamente de 5 capas de células) y éstas producirán hemidesmosomas entre ellas.

La cantidad de proliferación celular depende de la demanda. En condiciones normales, no todas las TACs son capaces de dividir, pero cuando existe una lesión, la regeneración del epitelio puede seguir tres estrategias para expandir su población: 1)

reclutar un mayor número de células pluripotentes que se dividan con un ciclo más rápido de división; 2) estimular a las TACs de la periferia de la cornea para que maduren y ejerzan todo su potencial replicativo; y 3) aumentar la eficiencia de replicación de las TSCs reduciendo el ciclo en tiempo. Las tres estrategias juntas resultan en la producción de un mayor número de células terminales post-mitóticas diferenciadas (Lehrer et al., 1998).

Un importante requisito para la correcta regeneración del epitelio es la adhesión fuerte al estroma subyacente. En estudios en modelos de conejo, se ha visto que las estructuras de adhesión entre el epitelio y el estroma subyacente se reestablecen de forma completa transcurridas de seis a ocho semanas de producida la lesión.

El reestablecimiento de las adhesiones entre células epiteliales es un proceso complejo y prolongado en el tiempo, alcanzando incluso una duración de meses, siendo posible que alguna de las uniones no se lleve a cabo y quede una alteración corneal estructural permanente. El proceso de re-epitelización corneal tras una lesión, no finaliza hasta que todas las uniones en hemidesmosoma entre el epitelio y el estroma subyacente están regeneradas.

Los factores que afectan a la adhesión de las células epiteliales y por tanto a la completa recuperación de un epitelio normal tras una lesión en el mismo son: 1) el tiempo que estemos en contacto con el agente causante de la lesión; 2) la profundidad de la misma; 3) condiciones oculares previas (como por ejemplo distrofias en membranas basales) y 4) la edad del individuo que sufre la lesión.

El proceso de re-epitelización ocurre de manera natural, en parte por la existencia de una serie de moléculas que pueden disparar la secuencia de procesos que se ha descrito con anterioridad. Estudios en células epiteliales tanto humanas como de conejo (Wilson et al., 1992, Offord et al., 1999), han demostrado la presencia de los siguientes factores de crecimiento y citoquinas: EGF (Factor de Crecimiento Epitelial), bFGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico), TGF- α , - β 1 y - β 2 (Factor de Crecimiento Transformante), IL-1 α , IL-1 β (Interleucina) y TNF- α (Factor de Necrosis

Tumoral) entre otros. Estos factores de crecimiento y estas citoquinas provienen tanto del flujo sanguíneo de los vasos del limbo como de la película lagrimal que recubre la superficie corneal (que la baña constantemente) como del humor acuoso. (Zieske et al., 2000; Imanishi et al., 2000).

Otros agentes a tener en cuenta en este proceso son las Metaloproteinasas (MMPs) (Wong et al., 2002), una familia de enzimas proteolíticos que degradan la matriz extracelular y la membrana basal. Se piensa que las MMPs tiene un papel de “vigilancia” en una cornea normal, catalizando la degradación de aquellas moléculas de colágeno que ocasionalmente se dañan. MMPs están en concentraciones muy bajas en tejidos normales y no se expresan de forma constitutiva, estando esta de forma muy regulada para evitar una destrucción excesiva e incontrolada del tejido. Se esta investigando el papel de estas MMPs en las enfermedades oculares (Wong et al., 2003). Se ha visto que la expresión de estas está activada tras procesos inflamatorio y de remodelamiento en respuesta a citoquinas, hormonas, factores de crecimiento y oncogenes. MMPs-1 y MMPs-8 se activan tras “keratolisis ulcerativa”, y la secreción lagrimal de MMPs-8 está significativamente aumentada in pacientes tratados con PRK (cirugía fotorrefractiva para tratamiento de miopía y astigmatismo) (Holopainen et al., 2003), lo que sugiere un papel importante de MMPs-8 junto a MT-1-MMPs (metaloproteinasa de membrana tipo 1) en la cascada de re-epitelización corneal tras lesión. Además, también se han descrito el aumento de otros tipos de MMPs en sujetos con otros tipos de lesiones corneales (Maguen et al., 2002).

Además, se considera que otra de las fuentes de secreción más importantes de estos factores re-epitelizantes son las terminales nerviosas que inervan la cornea, ya que los nervios sensoriales que la inervan tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la misma. Así, se ha podido demostrar que la estimulación crónica del sistema nervioso simpático es capaz de acelerar la velocidad de re-epitelización corneal (Perez et al., 1987). Del mismo modo, los péptidos liberados de las terminales nociceptivas presentes en la cornea, tales como la sustancia P y el CGRP (calcitonin-gene related peptide), son igualmente capaces de acelerar la re-epitelización (Gallar et al., 1990). Una pérdida parcial o completa de los nervios sensoriales corneales conlleva desórdenes en el epitelio corneal tales como la erosión y defectos epiteliales

persistentes. Si estos defectos epiteliales persisten en el tiempo, las funciones biológicas de las células epiteliales pueden verse alteradas y producirse úlceras corneales.

1.5.- RUTAS INTRACELULARES: MAPK, CITOESQUELETO Y FOSFOLIPASA C / PROTEINA QUINASA C (PLC / PKC).

Varias rutas de transducción de señales intracelulares se han visto implicadas en la migración del epitelio corneal. Tales rutas son: 1) la ruta de las MAPK; 2) la familia de GTPasas Rho y 3) la vía intracelular Fosfolipasa C / Proteína Quinasa C (PLC / PKC).

1.5.1.- Proteínas Quinasas Activadas por Mitógeno (MAPK).

Las células reconocen y responden a estímulos externos mediante programas intracelulares específicos como la cascada de activación de las Proteínas Quinasas Activadas por Mitógeno (MAPK).

Todas las células eucariotas poseen múltiples rutas MAPK que de forma coordinada regulan un amplio espectro de actividades celulares como por ejemplo la expresión génica, la mitosis, el metabolismo de motilidad, la supervivencia y la apoptosis, y la diferenciación. En mamíferos, se han caracterizado cinco grupos de MAPK: 1) Quinasas reguladas por señal extracelular (ERKs) 1 y 2 (ERK1/2); 2) c-Jun quinasas amino-terminal 1, 2 y 3 (JNKs); 3) p38 isoformas α , β , γ y δ ; 4) ERKs 3 y 4 y 5) ERK 5 (Chen et al., 2001; Kyriakis y Avruch, 2001). De momento, los grupos de MAPK más exhaustivamente estudiados en vertebrados son ERK1/2, c-Jun y p38.

Las MAPK se estimulan por una gran variedad de estímulos, pero podemos resumir que las ERK1/2 se estimulan preferentemente por factores de crecimiento y esteroides de forbol, mientras que JNK y p38 responden a estímulos de estrés que van desde el shock osmótico a la estimulación por citoquinas (Pearson et al, 2001).

Aunque cada familia de las MAPK tiene características únicas, comparten una serie de cualidades (Figura 11). Cada familia está compuesta por una serie de tres

quinasas conservadas en la evolución que actúan de forma secuencial: de abajo a arriba encontramos una MAPK, una MAPK quinasa (MAPKK) y una MAPKK quinasa (MAPKKK).

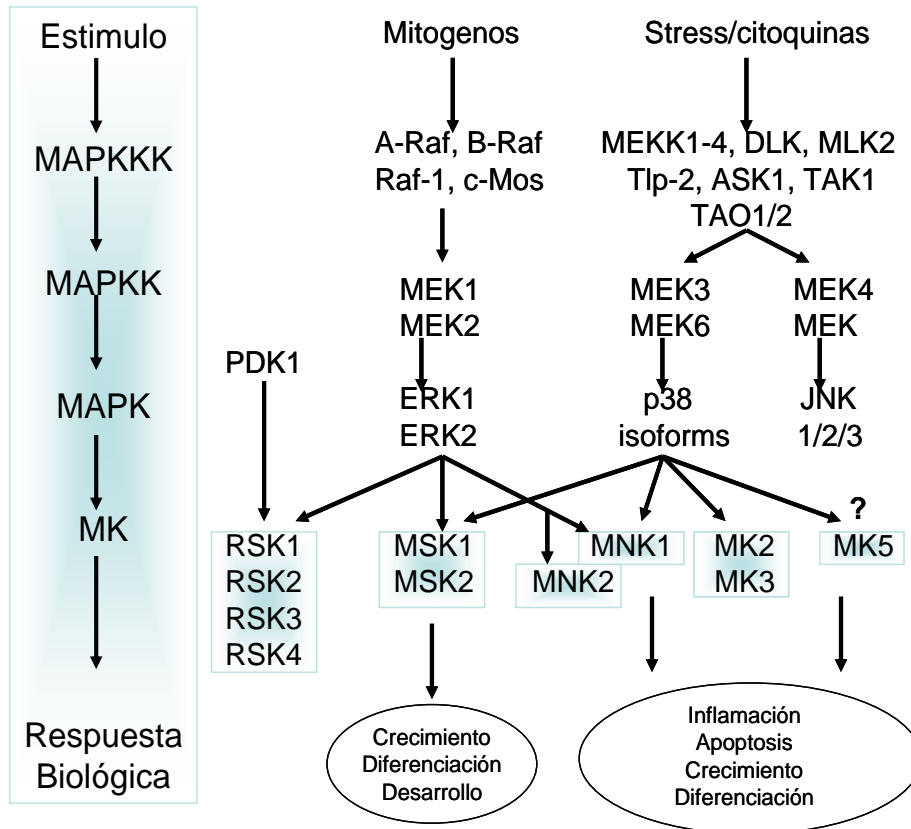


Figura 11: Cascada de señalización de las MAPK (Roux et al., 2004). El estímulo externo activa la cascada secuencial de MAPKKK, MAPKK, MAPK y MK antes de producir la respuesta fisiológica.

Las MAPKKKs son unas serin/treonin quinasas activadas frecuentemente por fosforilación o como resultado de la interacción con proteínas pequeñas de unión a GTP de la familia Ras/Rho en respuesta a estímulos extracelulares. Estas MAPKKKs fosforilan y activan a las MAPKKs que en último término activan las MAPKs a través de una fosforilación dual en residuos de Treonina y Tirosina localizados en el bucle de activación del subdominio quinasa VIII. Una vez activadas, las MAPKs fosforilan sustratos diana en Serina o Treonina que van seguidos de Prolina incluyendo Fosfolipasas, factores de transcripción y proteínas de citoesqueleto. Las MAPKs también catalizan la fosforilación y activación de proteínas quinasas denominadas MKs (proteínas quinasas activadas por MAPK) que representan un paso enzimático y de

amplificación en la cascada catalítica de las MAPKs. Estas MKs son quinasas que median un amplio rango de funciones biológicas en respuesta a mitógenos y a estímulos de estrés. Además, la especificidad de la cascada de las MAPK está mediada por la interacción con proteínas de andamiaje.

1.5.1.1.- Módulo ERK1/2.

El módulo de las ERK1/2 se conoce como la cascada clásica de las quinasas activadas por mitógeno, y está constituida por las MAPKKKs A-Raf, B-Raf y Raf-1, las MAPKKs MEK1 y MEK2 y las MAPKs ERK1 y ERK2. Tanto ERK1 como ERK2 (43 y 41 KDa respectivamente) comparte un 83 % de aminoácidos y se expresan en todos los tejidos (Chen et al., 2001) en un rango estimado de concentración de 100 a 500 nM. Se activan por factores de crecimiento, suero, esteroides de forbol, ligandos de los receptores acoplados a proteínas G, citoquinas, estrés osmótico y desorganización de los microtúbulos (Lewis et al., 1998).

Se conoce la estructura tridimensional tanto de la forma fosforilada como de la forma no fosforilada de ERK2. Como otras proteínas quinasas, ERK2 está constituida por dos dominios. El dominio N-terminal está formado por láminas β unidas por dos α -hélices, α hélice C y la α hélice L16 que participa con una extensión C-terminal hacia el centro catalítico. El dominio C-terminal consiste en una serie de α -hélices con cuatro láminas β que contienen residuos implicados en la catálisis. Ambos dominios son capaces de rotar tanto de forma separada para permitir la liberación de los sustratos, como conjuntamente para cerrar el sitio activo, y todo esto es posible gracias a la existencia de un conector flexible que une ambos dominios. El sitio activo se localiza en la zona entre los dominios (Zhang et al., 1994; Canagarajah et al., 1997). Un bucle de superficie, L12, en el exterior del centro activo controla los cambios de conformación de la proteína quinasa. Los dos sitios fosfoaceptores Y185 y T183 de ERK2, se localizan en este bucle L12 y deben estar ambos fosforilados para activar la quinasa (Robbins et al., 1993). Esta fosforilación incrementa sustancialmente la actividad de ERK2, produciéndose la misma en residuos de Tirosina seguidos de Treonina. Una vez que ERK2 se fosforila en el residuo de Tirosina, se produce la fosforilación en el residuo de Treonina y se activa la quinasa.

El mecanismo de actuación de esta ruta es el siguiente: Los receptores de la superficie celular tipo Tirosin quinasa (RTK) y los receptores acoplados a proteínas G transmiten la señal de activación a la cascada Raf / MEK / ERK a través de diferentes isoformas de las proteínas de unión a GTP de la familia Ras. La activación de Ras se logra por el reclutamiento de SOS. Estas moléculas SOS estimulan en Ras el intercambio de GDP por GTP con la consecuente activación e interacción de un amplio rango de efectores incluyendo isoformas de la serin/treonin quinasa Raf. El mecanismo exacto de activación de Raf es todavía poco conocido, pero requiere la unión de Ras así como múltiples eventos de fosforilación en membrana (Chong et al., 2003). Ras activada se une y fosforila a la quinasa dual MEK1/2 que en turnos fosforilan a Erk1/2 en motivos conservados de Thr-Glu-Tyr (TEY). La activación de únicamente el 5 % de las moléculas de Ras es suficiente para inducir una activación completa de ERK1/2 (Hallberg et al., 1994).

ERK1/2 se distribuyen por todas las células quiescentes, pero tras la estimulación, se produce una acumulación de ERK1/2 en el núcleo. La retención en el núcleo, la dimerización, la fosforilación y la liberación de los anclajes citoplasmáticos parece que juegan un papel muy importante en la acumulación de las ERK1/2 en el núcleo (Pouyssegur et al., 2002). La señalización de las ERK1/2 es un regulador clave de la proliferación celular. Los sustratos que fosforila la activación de ERK1 y ERK2 incluyen proteínas de membrana (CD120a, Syk y calnexina), sustratos nucleares (SRC-1, Pax6, NF-AT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc y STAT3), proteínas de citoesqueleto (neurofilamentos y paxilina) y varias MKs (Chen et al., 2001).

Una de las proteínas más importantes que determinan la localización de ERK1/2 es MEK1 (Rubinfeld et al., 1999). MEK1 es tan abundante como ERK2 y se encuentra frecuentemente en el citoplasma debido a secuencias NES (secuencias para transporte activo al núcleo). Cuando se suprimen estas NES se produce la acumulación de MEK1 en el núcleo. La co-expresión de MEK1 produce la exclusión del núcleo de ERK2 mientras las células están en quiescencia, lo que indica que MEK1 es suficiente para mantener la localización de ERK2, aunque esto no prueba que sea MEK1 el único responsable de la exportación de ERK2 (Rubinfeld et al 1999).

Encontramos dos compuestos estructuralmente relacionados y que son inhibidores no competitivos específicos de la ruta de las ERK en células en cultivo: U0126 y P98059.

5.1.2.- Módulo p38.

p38 es el segundo componente de la familia MAPK en las células de mamífero. Esta ruta consiste en una serie de MAPKKKs que incluyen MEKKs 1 a 4, MLK 2 y -3, DLK, ASK1, Tpl2 y Tak1, seguido de las MAPKKs MEK3 y MEK6 (también denominadas MKK3 y MKK6), que llevan a la activación de las cuatro isoformas de p38 (α , β , γ y δ) (Kyriakis et al., 2001). MEK3 y MEK6 son selectivas de p38 y no activan ni a ERK1/2 ni a JNK. Sin embargo, MEK4 tiene afinidad tanto por p38 como por JNK, lo que nos indica que es un punto de integración entre ambas rutas (Brancho et al., 2003).

La isoforma α de la quinasa p38 comparte un 50 % de homología en la secuencia de aminoácidos con ERK2. En las células de mamífero, las isoformas de p38 están fuertemente activadas por estrés ambiental y citoquinas de inflamación pero no se activan de forma apreciable por mitógeno. La mayoría de los estímulos que activan la ruta de p38 también activan la ruta JNK, aunque solo p38 se inhibe con la droga anti-inflamatoria SB203580. Las diferencias de expresión, activación y especificidad de sustratos de las diferentes isoformas de p38 resultan en la divergencia de funciones biológicas en los diferentes contextos celulares.

p38 está constituida por poco más a parte del dominio catalítico. Las extensiones cortas N- y C-terminales tienen poca homología con otras proteínas a excepción de las quinasas de la familia JNK. La topografía de p38 es similar a la de ERK2 aunque existen grandes diferencias en el bucle de activación (Zhang et al., 1994).

El mecanismo de activación de esta ruta es el siguiente: MEK3 y MEK6 se activan por la batería de MAPKKKs mencionadas anteriormente que se activan en respuesta a estrés tanto físico como mecánico, como es el caso del estrés oxidativo, la radiación UV, la hipoxia, la isquemia y varias citoquinas (entre las que encontramos a

IL-1 y a TNF α) (Chen et al., 2001). Mientras que MEK6 activa todas las isoformas de p38, MEK3 es selectivo de las isoformas α y β . Esta especificidad en la activación de p38 es el resultado de la formación de complejos funcionales entre MEK3/6, las distintas isoformas de p38 y el bucle de activación de las isoformas de p38 por MEK3/6 (Enslin et al 2000).

Se ha localizado la presencia de p38 tanto en el núcleo como en el citoplasma de células quiescentes, pero tras la estimulación, la localización celular de p38 no está bien definida. Algunas evidencias sugieren que tras la activación se produce una traslocación de p38 del citoplasma al núcleo (Raingeaud et al., 1995) pero otros autores indican que la activación de p38 también se localiza en el citoplasma de las células estimuladas (Ben-Levy et al., 1995).

Existen una gran cantidad de evidencias que indican que la actividad de p38 es crítica para unas respuestas inflamatorias e inmunes normales. p38 se activa en macrófagos, neutrófilos y linfocitos T gracias a la actuación de mediadores extracelulares de inflamación que incluyen quimioatrayentes, citoquinas, quimioquinas y lipopolisacáridos bacterianos (Ono et al., 2000). En macrófagos y neutrófilos, p38 participa en la respuesta funcional que incluye quimiotaxis, exocitosis granular, adherencia y apoptosis, y en los linfocitos T, p38 media también la diferenciación y la apoptosis mediante la regulación de la producción del interferón gamma (Ono et al., 2000).

1.5.1.3.- Módulo JNK.

El primer miembro de la familia JNK se aisló del hígado de rata inyectado con cicloheximida (Kyriakis et al., 2001). De los miembros de esta familia (JNK1, JNK2 y JNK3) existen 10 o más isoformas y se expresan de forma ubicua, aunque JNK3 se expresa primariamente en cerebro. Se han identificado como proteínas quinasas activadas por estrés, y su actividad incrementa en respuesta a citoquinas, radiación UV, privación de factores de crecimiento, agentes que dañan el ADN y, en menor grado, algunos receptores acoplados a proteínas G, suero y factores de crecimiento (Kyriakis et al., 2001). Están involucradas en la producción de citoquinas y otras moléculas de

respuesta inflamatoria que realizan su función principalmente en el sistema inmune, en la apoptosis inducida por estrés, la reorganización del citoesqueleto y la transformación celular (Otto et al., 2000).

Como ERK1/2 y p38, la activación de JNK requiere la fosforilación dual en Tirosina y Treonina en motivos conservados de Thr-Pro-Tyr (TPY). Estas quinasas contienen la misma estructura de núcleo ya descrita para ERK2, pero con importantes modificaciones en la conformación del bucle de activación que reflejan las diferencias en el mecanismo de regulación (Xie et al., 1998).

El mecanismo para la activación de JNK viene definido por la activación de receptores acoplados a proteínas G. Aunque Gi es un elemento frecuente en la activación de JNK, los mecanismos efectores unidos a JNK, particularmente sobre el calcio, pueden ser dependientes de ligando o de tipo celular.

Las quinasas JNK se traslocan desde el citoplasma al núcleo tras la estimulación (Mizukami et al., 1997). Un sustrato conocido de JNK es c-Jun, siendo también los siguientes factores de transcripción también sustrato de las quinasas JNKs: ATF-2, NF-ATC1, HSF-1 y STAT3 (Chen et al., 2001). Mientras que algunas dianas citoplasmáticas de JNK son conocidas, el hecho de que la estimulación de JNK no exhiba una exclusiva localización nuclear, sugiere que hay muchos sustratos citoplasmáticos todavía desconocidos.

Como ERK2, la actividad de las quinasas JNK está influenciada por las hormonas nucleares. Swantek et al., en el año 1997 demostraron que la activación de JNK en macrófagos se inhibe por glucocorticoides de una manera que depende de la presencia de receptores nucleares, y Gonzalez et al., en el año 2000 observaron como la dexametasona inhibía la formación de TNF α inducida por la fosforilación de JNK en células HeLa.

Los inhibidores farmacológicos de JNK no están todavía disponibles, pero Maroney et al., en 1998, y Saporito et al., en 1999, realizando una separación de moléculas, identificaron una molécula que promovía la supervivencia celular: CEP-

1347. Este compuesto previene la muerte de las neuronas que han sido deprivadas de factores de crecimiento e inhibe la activación de JNK1. Este inhibidor también inhibe la activación de JNK1 por radiación ultravioleta, shock osmótico e inhibidores de glicosilación en fibroblastos. No se ha visto inhibición de ERK2 ni de p38 con este inhibidor, lo que indica que tanto ERK2 como p38 no se ven afectados por CEP-1347.

1.5.2.- Familia Rho GTPasas.

Los miembros de la familia Rho GTPasas se encuentran en todos los organismos eucariotas y regulan la motilidad y la polaridad celular mediante efectos en el citoesqueleto, en el tráfico de membranas y en la adhesión celular (Jaffe y Hall, 2005; Jiang y Ramachandran, 2006). La mayoría de las Rho GTPasas actúan en las membranas y afectan a los movimientos de las mismas mediante cambios en el citoesqueleto de actina asociado a estas.

En mamíferos, encontramos que esta familia está constituida por 22 miembros, muchos de los cuales afectan a la morfología celular (Jaffe y Hall, 2005). Los miembros mejor estudiados de esta familia de GTPasas son RhoA, Rac1 y Cdc42. Al mismo tiempo que RhoA, se caracterizaron RhoB y RhoC, pero estos no han recibido tanta atención como el primero debido a la extensa homología entre los tres y porque estudios de sobre-expresión indican que al igual que RhoA, inducen la formación de fibras de estrés en las células (Ridley, 2001). Rac1 y Cdc42 son los encargados de inducir las profusiones de membrana conocidas como lamelipodios y filopodios mediante la estimulación de la polimerización de actina. Otros miembros de la familia, incluyendo a RhoG, RhoD, TC10 y Rif (también denominado RhoF), también inducen las profusiones de membrana basadas en la actina (Murphy 1999; Ellis y Mellor 2000; Aspenström et al., 2004). Por otro lado, otros miembros de la familia, que incluyen RhoA, RhoB, RhoD y Cdc42, modifican pasos específicos del tráfico de vesículas entre diversos compartimentos intracelulares, como por ejemplo exocitosis o el transporte Golgi-Retículo Endoplasmático, para lo cual es fundamental la capacidad de estas GTPasas para inducir la polimerización de actina (Egea et al., 2006).

La mayoría de las proteínas de esta familia pueden unir GTP y GDP y tienen actividad GTPasa intrínseca. En la conformación que une GTP, estas proteínas se unen y activan proteínas diana. La actividad se regula mediante GEFs (factores de intercambio de nucleótidos de guanina) que estimulan la salida de GDP y la unión de GTP, y también se regula mediante GAPs (proteínas que activan la GTPasa) que catalizan la hidrólisis de GTP convirtiendo la proteína en la conformación inactiva que une GDP (Figura 12).

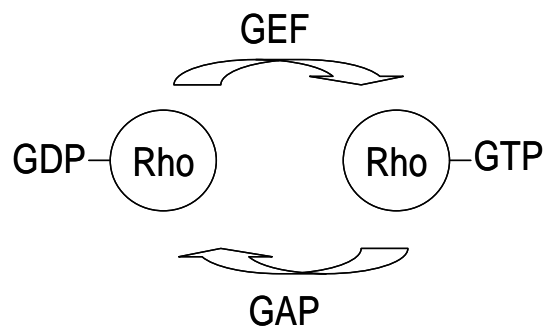


Figura 12: Regulación de la activación de las proteínas de la familia Rho GTPasa.

La estructura núcleo de las proteínas Rho GTPasas se puede ver en la Figura 13. Algunos de los miembros de la familia poseen una extensión N-terminal, la región hipervariable C-terminal es más o menos larga, e incluso pueden contener dominios adicionales. El dominio efector que se encarga del intercambio de GTP por GDP es el que se requiere para activar los segundos mensajeros. La región hipervariable es muy diferente entre los tres isoformas de Rho o Rac y puede incluir regiones polifásicas o zonas de palmitoilación. La caja CAAX contiene residuos de Cisteína que son prenilados (con un grupo farnesilo o geranylgeranilo) y que subsecuentemente transforman los tres aminoácidos finales (dos aminoácidos alifáticos y un aminoácido C-terminal variable) por un grupo metilo.

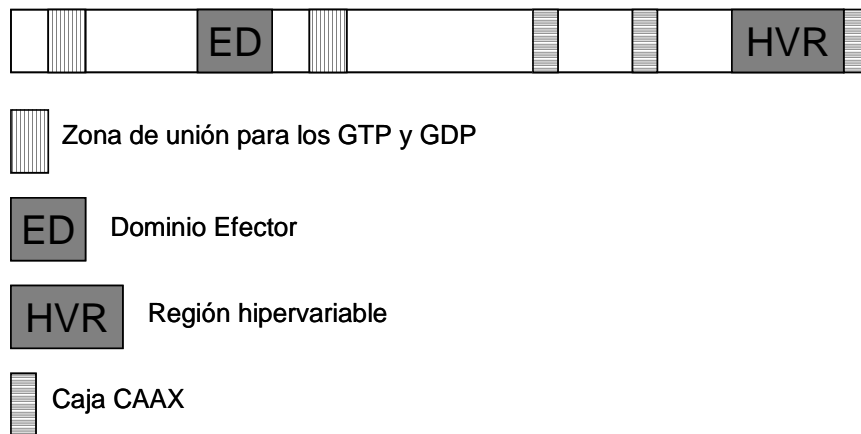


Figura 13: Estructura primaria de las proteínas Rho GTPasas (Ridley, 2006).

La actividad y localización de algunas de las proteínas de la familia Rho se regulan por fosforilación, y para modificar la dinámica de membranas, las proteínas Rho GTPasas deben actuar sobre la membrana, activándose en la misma mediante los GEFs (Rossman et al., 2005). Las modificaciones post-traslacionales son críticas para la unión a las membranas, siendo frecuentemente estas modificaciones la prenilación (con un grupo farnesilo o geranylgeranilo) o la palmitoilación en el extremo C-terminal, lo que facilita la unión a las membranas e incluso la localización específica en membranas de compartimentos subcelulares.

Los inhibidores de Rho (RhoGDIs) se unen a la mayoría de las proteínas Rho, pero no a todas, y previenen la interacción con las membranas mediante el enmascaramiento del grupo prenilo e inhibiendo la unión con las dianas efectoras (DerMardirossian y Bokoch, 2005). En mamíferos encontramos tres tipos de RhoGDIs: RhoGDIs α , RhoGDIs β y RhoGDIs γ (Dovas y Couchman, 2005). Las proteínas RhoGDIs son fosforiladas por múltiples quinasas lo que hace que faciliten o inhiban la interacción con las proteínas Rho GTPasas dependiendo del sitio de fosforilación (Dovas y Couchman, 2005).

Las proteínas Rho juegan un papel central en la regulación de la forma celular, la polaridad y el movimiento mediante sus efectos en la polimerización de la actina, en la contractilidad de la actomiosina, en la adhesión celular y en la dinámica de los microtúbulos (Ridley et al., 2003). Se cree que Rho actúa en el polo posterior de la

célula migrante para promover el movimiento, mientras que Rac actúa en el frente para estimular las profusiones de membrana mediadas por actina, aunque no está completamente claro el que las células migrantes se dividan en zona Rac y zona Rho.

Las proteínas Rho GTPasas activan dos tipos de moléculas que facilitan de forma directa la polimerización de actina: las proteínas WASP/WAVE (Proteína del síndrome Wiskott-Aldrich) y las DRFs (Diaphanous-related formins). Las proteínas WASP/WAVE inducen la polimerización de actina vía el complejo Arp2/3 lo que estimula la formación de filamentos de actina nuevos separados del filamento existente (Millard et al., 2004). La capacidad de las proteínas WASP para estimular la polimerización de la actina está regulada tanto por fosforilación como por interacciones proteína – proteína (Stradal y Scita, 2006). Las DRFs Dia1, Dia2 y Dia3 estimulan la nucleación y la extensión de filamentos de actina pre-existentes. Se unen como dímeros a los extremos del filamento de actina y previenen la unión de proteínas tapón que son las que terminan la polimerización del filamento de actina (Kovar, 2006). Cada una de estas proteínas se activa por diversos miembros de la familia de proteínas Rho (Higgs, 2005). Las DRFs actúan junto con ROCK (proteína diana de Rho) para mediar la formación de las fibras de estrés (Ridley et al., 2003).

Las proteínas Rho también pueden afectar a la polimerización de la actina mediante la regulación de Cofilina, un factor que despolimeriza la actina. Las quinasas LIM (LIMKs) fosforilan de forma directa esta Cofilina y la inactivan lo que conlleva un aumento en la polimerización de la actina (Huang et al., 2006). Tanto las proteínas ROCK como las proteínas PAKs (activadas por Rac / Cdc42) fosforilan y activan las LIMKs.

Los microtúbulos son también esenciales tanto para determinar la polaridad de las células como para el transporte vesicular y el transporte intracelular. La acción concertada de ROCK con las DRFs es esencial para la regulación de la polaridad celular y la reorganización de los microtúbulos. ROCK fosforila a las proteínas TAU y MAP2 que son las que regulan la estabilidad de los microtúbulos (Riento, 2003).

Para que las células se puedan mover deben alternar entre adhesiones célula – célula y adhesiones célula - matriz extracelular. Las proteínas Rho juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de estas adhesiones (Burrige y Wennerberg, 2004). La pérdida o el debilitamiento de las uniones célula – célula es esencial para la migración de las células epiteliales y debe regularse de forma recíproca tanto por ROCK como por DRFs. En las células en migración se ha visto que RhoA tiene un papel clave en el recambio de las adhesiones célula – matriz extracelular en el polo posterior de la célula. Rho induce un aumento tanto en el número como en el tamaño de las adhesiones focales basadas en integrinas en gran parte de las células adherentes y se requiere para la formación de podosomas tanto en células dendríticas como endoteliales (Ridley, 2000; Linder y Aepelecker, 2003).

Por último, se conoce por un lado que el Ácido Lisofosfatídico es un activador de Rho, y estimula la migración en bloques de cornea de conejo *in vitro*, y por otro, la Exoenzima C3 actúa como inhibidor de Rho, inhibe la migración epitelial.

1.5.3.- Ruta Fosfolipasa C /Proteína Quinasa C.

1.5.3.1.- Fosfolipasa C.

Las Fosfolipasas (PL) son enzimas que convierten los fosfolípidos en ácidos grasos y otras sustancias lipofílicas. Existen cuatro clases de Fosfolipasas, denominadas PLA (subdividida en A1 y A2), PLB, PLC y PLD.

El enzima Fosfoinosítido Fosfolipasa C (PLC) es una familia de enzimas intracelulares eucariotas con un papel fundamental en la transducción de señales (Meldrum et al., 1991). En general este enzima se denomina como Fosfolipasa C, aunque otras tres familias de Fosfolipasas C se han identificado en bacterias y en Tripanosomas (Carrington et al., 1998; Griffith y Ryan, 1999). Este enzima pertenece a la familia de las hidrolasas, y más concretamente a aquellas enzimas con actividad sobre los enlaces fosfodiéster. Participa en el metabolismo del Fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) y en las rutas de señalización lipídicas de manera Calcio dependiente.

La función catalítica del enzima PLC se lleva a cabo en la membrana plasmática donde el sustrato (PIP_2) está presente. La unión del enzima a la membrana está mediada en su mayoría por dominios de unión a lípidos (como por ejemplo el dominio PD o el dominio C2) que tienen distinta afinidad por los diferentes fosfolípidos que componen la membrana plasmática. Es importante tener en cuenta, que la PLC no solo está presente en la membrana plasmática, sino que diversas investigaciones han descubierto la localización de PLC en otras regiones subcelulares como son el citoplasma y el núcleo (D'Santos et al., 1998; Cocco et al., 2001; Irvine, 2003). Parece claro que el metabolismo nuclear de los fosfoinosítidos es independiente del de la membrana plasmática (Manzoli et al., 1999 y 2004). Cambios específicos en el metabolismo nuclear de los Fosfoinosítidos se han implicado en el crecimiento celular, la diferenciación y la progresión de tumores (Divecha et al., 2000; Tamiya-Koizumi, 2002).

Todos los miembros de la familia PLC son capaces de hidrolizar el PIP_2 en dos moléculas importantes por su actuación como segundos mensajeros: Diacilglicerol (DAG) e Inositol trifosfato (IP_3) (Figura 14) (Szumilo y Rahden-Staron, 2008).

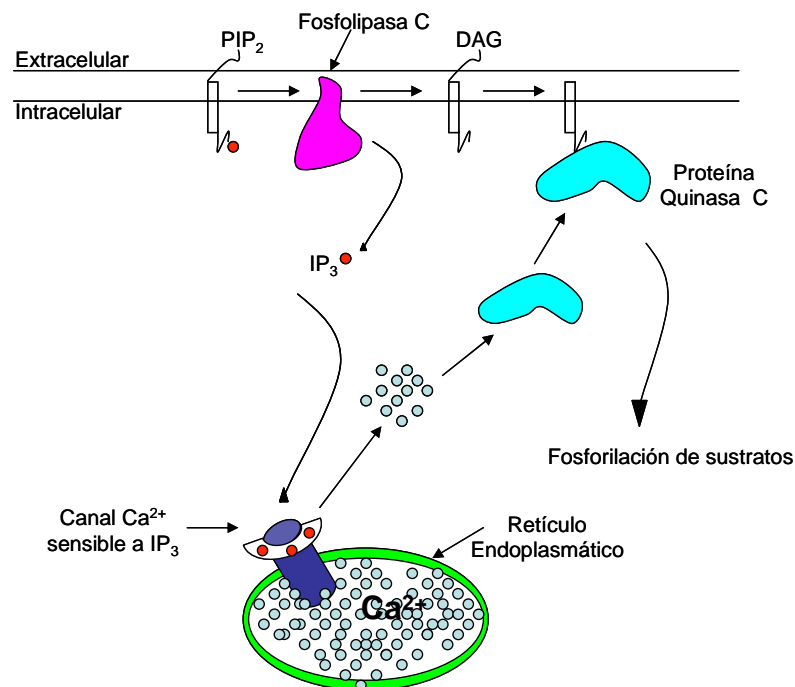


Figura 14: Ruta de activación de la Fosfolipasa C.

Los productos generados tras la hidrólisis del PIP₂ modulan la actividad de proteínas efectoras que desencadenan respuestas de proliferación, diferenciación, apoptosis, remodelamiento del citoesqueleto, tráfico de vesículas, conductancia de canales de iones, función neuroendocrina y neurotransmisión (Szumilo y Rahden-Staron, 2008). IP₃ es soluble y difunde hacia el citoplasma donde interacciona con receptores para IP₃ en el Retículo Endoplasmático, produciendo la salida de Calcio del mismo y aumentando por tanto los niveles intracelulares para este catión. Mientras tanto, DAG permanece unido a la cara interna de la membrana plasmática donde va a reclutar al enzima Proteína Quinasa C (PKC) que se va a activar con la unión de iones de Calcio. Todo esto resulta en respuestas celulares realizadas por la estimulación de proteínas sensibles a Calcio como por ejemplo la Calmodulina (Zheng et al., 2008).

La familia PLC está compuesta por seis subfamilias que comprenden un total de 13 isoformas: PLC- δ (1, 3 y 4), - β (1-4), - γ (1, 2), - ϵ , - ζ , y la más reciente - η (1, 2). Según la subfamilia, la activación es variable, siendo esta debida a la activación de las subunidades G _{α q} o G _{$\beta\gamma$} de proteínas G o mediante activación de receptores de membrana con actividad Tirosin Quinasa intrínseca o asociada (Sternweis y Smrcka, 1992). Además, miembros de esta familia de PLC están implicados en la activación la superfamilia de GTPasas de Ras (subfamilias de Ras y Rho). Es importante mencionar que todas las isoformas de PLC requieren Calcio para su activación, y por tanto, muchas de estas isoformas poseen múltiples sitios de unión a Calcio en el dominio catalítico.

PLC- δ .

Subfamilia formada por tres miembros: δ 1 (85 KDa), δ 2 y δ 3. Se activa por altos niveles de Calcio generados por otros miembros de la familia PLC, y funcionan como amplificadores de Calcio en la célula. La unión de PIP₂ al N-terminal del dominio PH es muy específico y produce la activación del núcleo catalítico, lo que ayuda además a la unión específica del enzima a la membrana plasmática. Para acceder más fácilmente al sustrato se producen interacciones iónicas entre los grupos fosfato de PIP₂ y residuos cargados del dominio PH del enzima. La isoforma PLC- δ 1 posee un dominio rico en leucinas con función de señalizador nuclear (NES), lo que hace que esta isoforma sea traslocada dentro y fuera del núcleo. Esta isoforma PLC- δ 1 es el miembro de la familia

PLC mejor caracterizado y del que primero se obtuvo la difracción por rayos X. Además, como es la única isoforma que se expresa en organismos eucariotas inferiores, se la considera el prototipo de PLC (Singer et al., 1997).

PLC-β.

Las isoformas PLC-β (1-4) (120-155 KDa) se activan por la subunidad $G_{\alpha q}$ a través de su dominio C2 y la extensión C-terminal. La subunidad $G_{\beta\gamma}$ solo activa las isoformas $\beta 2$ y $\beta 3$ mediante el dominio PH. Este dominio juega un papel dual, uniendo por un lado el enzima a la membrana y por otro creando un sitio de interacción para el activador catalítico. Miembros de la familia de GTPasa Rho (por ejemplo Rac1, Rac2, Rac3 y Cdc42) están implicados en la activación de estas isoenzimas mediante la unión a un sitio alternativo en la zona N-terminal del dominio PH seguido del reclutamiento a la membrana plasmática. También se ha visto que la isoforma PLC-β1 reside en el núcleo celular (Cocco et al., 2001). Una región de aminoácidos básicos localizada en la cola C-terminal funciona como señal localizadora nuclear para importar PLC-β1 al núcleo. PLC-β1 parece que juega papeles algo inespecíficos en diferenciación y proliferación celulares.

PLC-γ.

Con un peso molecular de 120 a 155 KDa se activa por receptores Tirosin Quinasa debido a la presencia de dos dominios SH2 y de un dominio SH3 situado en medio del dominio PH. Aunque no contienen regiones de señalización nuclear, se ha visto la presencia de esta isoforma en diversas líneas celulares.

PLC-ε.

Con pesos moleculares de 230 a 260 KDa se activan mediante GTPasas de la familia de Ras y Rho.

PLC- ζ .

El mecanismo de activación es desconocido. Parece implicado en la fertilización de los vertebrados mediante la producción de importantes oscilaciones en los niveles de Calcio intracelular en el inicio del desarrollo embrionario. Esta isoforma también posee secuencias de localización nuclear.

PLC- η .

Implicada en función neuronal.

1.5.3.2.- Proteína Quinasa C.

Las Proteínas Quinasas dependientes de Fosfolípidos y Calcio (PKC) representan a una familia de proteínas que juega un papel crucial mediando las respuestas celulares a los estímulos extracelulares involucrados en proliferación, diferenciación, apoptosis y exocitosis en diversos sistemas como son los islotes, las células cromafines y el paramecio (Nishizuka, 1995). Esta familia de proteínas también está implicada en la fosforilación de varias proteínas neuronales encargadas de la regulación de la liberación de los neurotransmisores y en el establecimiento del potencial de acción a largo tiempo en la formación de la memoria (Amadio et al., 2006). Además, las PKC regulan de forma positiva o negativa las transiciones del ciclo celular, incluyendo la entrada y salida del mismo y los puntos de control de G₁ y G₂.

Esta familia de proteínas quinasas está formada por 10 isoenzimas (Mellor y Parker, 1998) divididas en tres subfamilias en base a los segundos mensajeros que activan: PKC clásica o convencional (cPKC) (isoformas α , β_I , β_{II} , y γ .), novel (nPKC) (isoformas δ , ϵ , η , y θ) y atípica (aPKC) (isoformas $M\zeta$ y ι/λ) (Nishizuka, 1995). Las cPKC requieren para su activación Calcio, DAG y fosfolípidos como la fosfatidilcolina, las nPKC requieren solo DAG y las aPKC requieren solo Calcio. Las isoformas cPKC y nPKC se activan por la misma ruta intracelular y de transducción de señales que activan la PLC. Existe un 70 % de homología de secuencia entre las diferentes isoenzimas PKC

y esta homología es mayor cuando comparamos entre clases, por ejemplo las isoformas ζ and ι/λ , tienen un 84 % de homología (Selbie et al., 1993).

Todas las isoformas son monoméricas y se sintetizan como un polipéptido con la región N-terminal como dominio regulador (20 – 40 KDa) y una zona C-terminal con el dominio catalítico (aproximadamente 45 KDa) (Corbalán-García et al., 2006).

Generalmente las isoformas de PKC tienen cuatro regiones conservadas denominadas C1 a C4 que contienen motivos ricos en Cisteína y forman el sitio de unión a DAG. El dominio catalítico está muy conservado entre las diferentes isoformas y también con otras Serin / Treonin quinasas. La diferente activación de segundos mensajeros en cada una de las isoformas es debida a las diferencias en el dominio regulador. El dominio regulador y la zona N-terminal de las PKC contienen subregiones compartidas.

El dominio C1, presente en todas las isoformas de PKC, contiene sitios de unión para DAG y para los análogos no fisiológicos denominados esteres de forbol. Este dominio es funcional y capaz de unir DAG tanto en las formas cPKC y nPKC, siendo incapaz de esta unión en las formas aPKC.

El dominio C2 actúa como un sensor de Calcio y está presente tanto en las formas cPKC como nPKC, pero funciona solo como sensor de Calcio en las formas cPKC. La región pseudosustrato, presente en las tres clases de PKC, es una pequeña secuencia de aminoácidos situada por encima del motivo rico en Cisteínas y que mimetiza al sustrato, se une a la zona de unión a sustrato en la región catalítica y mantiene al enzima inactivo. Cuando Calcio y DAG están presentes en la célula a concentración adecuada, se unen a los dominios C1 y C2 respectivamente, reclutan a PKC a la membrana, se produce la salida del pseudosustrato de la región catalítica y se produce la activación del enzima.

Los dominios C3 y C4 forman las regiones de unión a ATP y al sustrato respectivamente.

La forma inactiva de PKC no se distribuye de forma libre por el citoplasma celular sino que se localiza en zonas concretas. Esta localización está facilitada por la asociación de PKC con proteínas de andamiaje como son AKAP79 (Proteína Quinasa de Anclaje A 79) y Gravin (Gelman, 2002; Higashida et al., 2005). AKAP79 se une a varias isoformas de PKC incluyendo α , β_{II} , δ , ϵ y ζ . En el caso de β_{II} , la asociación puede romperse por Calcio / Calmodulina, liberando a β_{II} para que trasloque a la membrana plasmática. Las secuencias consenso de PKC son similares a las de la Proteína Quinasa A (PKA) ya que ambos enzimas contienen aminoácidos básicos cercanos a los residuos de Serina / Treonina que van a ser fosforilados.

Para que esta secuencia de activación pueda llevarse a cabo, el enzima debe estar adecuadamente plegado y en la conformación permisiva para la acción catalítica, lo que se consigue mediante la fosforilación de la misma. cPKC y nPKC tienen tres sitios de fosforilación denominados bucle de activación, motivo de giro y motivo hidrofóbico, mientras que las aPKC se fosforilan solo en el bucle de activación y en el motivo de giro, ya que la fosforilación en el motivo hidrofóbico es innecesaria debido a la presencia de un residuo de Ácido Glutámico, en el lugar donde debería haber una Serina, que al tener carga negativa, actúa de forma similar a un residuo fosforilado. Estos eventos de fosforilación son esenciales para la actividad del enzima, y la Proteína Quinasa dependiente de Fosfoinosítidos-1 (PKD1) es la quinasa responsable del inicio de los procesos de transfosforilación del bucle de activación (Balendran et al., 2000).

Cuando se produce la unión de una hormona o una molécula efectora a su receptor de membrana, se produce la activación de la Fosfolipasa C o la Fosfolipasa A₂ (PLA₂) vía la activación de proteínas G. La activación de PLC produce la hidrólisis del PIP₂ para producir DAG e IP₃. IP₃ produce la salida del Calcio endógeno que se va a unir a PKC. Esta unión de Calcio produce la traslocación de PKC a la membrana donde interacciona con DAG y se transforma en el enzima completamente activo (Shemarova, 2007).

La traslocación de PKC a la membrana se produce mediante proteínas RACK (receptor unido a membrana para proteínas PKC activadas) (Schechtman y Mochly-Rosen, 2001). Las PKC tienen una activación prolongada y se mantienen activadas

cuando la activación original o la ola de Calcio inicial han finalizado. Esto es presumiblemente debido a la producción de DAG a partir de la Fosfatidilcolina mediante una Fosfolipasa o bien mediante el papel que juegan los ácidos grasos.

Una vez activada la PKC, esta fosforila a otras proteínas alterando la función de estas. Sin embargo, las proteínas que van a ser fosforiladas por PKC dependen del tipo de célula en la cual se activa la PKC. Por esto, los efectos de PKC son célula específicos.

Hipótesis y Objetivos

2.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS DE TRABAJO.

El estudio de los efectos bioquímicos y fisiológicos de los nucleótidos y dinucleótidos en las diferentes estructuras oculares, sugiere la posible importancia de estas moléculas en la re-epitelización corneal (cicatrización). En estudios realizados en nuestro laboratorio durante los años 2001 a 2004 se comprobó que la instilación de mono y dinucleótidos en lesiones corneales superficiales realizadas en conejos aceleraban la velocidad de re-epitelización (Pintor et al., 2004a). Este hecho hace que sea de gran interés conocer los mecanismos farmacológicos, moleculares (segundos mensajeros) y citológicos (citoesqueleto) que subyacen bajo dicha acción, ya que se podría pensar en emplear estos compuestos para el tratamiento de erosiones superficiales y como tratamiento complementario tras las operaciones de cirugía refractiva. Para ello debemos deponer el modelo del conejo entero para trabajar en un modelo de cultivo de epitelio corneal que permita realizar estudios a nivel molecular.

Nuestra **hipótesis** (Figura 15) es que la activación de los receptores de tipo P2Y presentes en las células del epitelio corneal inician una secuencia de acontecimientos intracelulares en los que interviene la cascada de las MAP quinasas y presumiblemente la proteína Rho, que a su vez desencadena finalmente la activación del citoesqueleto para que este permita a las células producir filopodios y lamelipodios, y por consiguiente la migración celular, paso fundamental en el proceso de cicatrización.

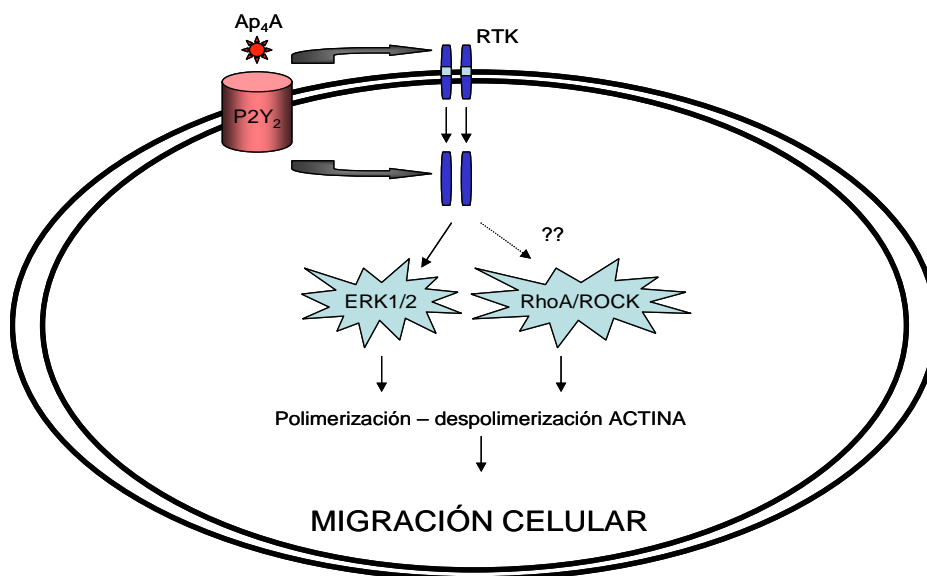


Figura 15: Modelo de actuación de los nucleótidos vía P2Y en la re-epitelización corneal.

Los objetivos propuestos en este trabajo son los siguientes:

1.- Estudio de la implicación de los dinucleótidos de adenina en la fase de migración celular del proceso de re-epitelización corneal.

1.1.- Extracción y cultivo de las células del epitelio del corneal.

Puesta a punto del protocolo de cultivo primario de células de epitelio corneal de conejo para la realización de los ensayos farmacológicos.

1.2.- Estudio de la migración celular como consecuencia de la aplicación de dinucleótidos y nucleótidos.

Comprobar si la aplicación de los dinucleótidos y nucleótidos activan la maquinaria celular que permite el desplazamiento de las células de un modo más eficaz que en ausencia de los agonistas. Es decir, comprobar si el efecto observado *in vivo* se reproduce *in vitro* con las mismas características.

1.3- Estudio farmacológico de los receptores purinérgicos P2Y presentes en células del epitelio corneal en cultivo.

El estudio farmacológico para conocer los receptores P2Y implicados en la migración celular se realizará con los antagonistas descritos para P2Y junto a los agonistas efectivos.

1.4- Estudio de los segundos mensajeros acoplados a los receptores P2Y. Posible participación de la proteína Rho y la cascada de las MAPK.

Conocer las rutas intracelulares implicadas en el proceso de migración celular mediante:

1) estudios de migración celular y,

2) estudios de activación de ERK1/2 y ROCK-I en cultivo celular inm ortal de epitelio corneal realizados por West ern Blot, todos ellos em pleando los inhibidores específicos.

1.5- Confirmación de la activación del receptor P2Y₂ *in vivo* e *in vitro*.

Estudios de m igración celular, inm unocitoquímica y RT-PCR e mpleando la tecnología del siRNA.

2.- Estudio de la implicación en la etapa de proliferación celular.

Ensayo de proliferación celular *in vitro* en células tratadas con Ap₄A y Ap₃A en presencia de antagonistas de las rutas intracelulares im plicadas, así com o el estudio *in vivo* por RT-PCRq tras la activación con Ap₄A y Ap₃A en presencia o ausencia del siRNA para el recepto r P2Y₂ de la activación de la ciclina CCNE1 y la quinasa CDK2, un sistema implicado en el paso de fase G₁ a fase S del ciclo celular, y por tanto esencial en el proceso de división celular.

Material y Métodos

3.- MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1.- REACTIVOS, MEDIOS Y SOLUCIONES GENERALES.

Para la realización de los trabajos que dan origen a esta tesis doctoral, se han utilizado los reactivos, medios y soluciones que se exponen a continuación.

3.1.1.- Reactivos.

AGONISTAS, ANTAGONISTAS E INHIBIDORES	CASA COMERCIAL
ADP (Adenosina-5'-difosfato)	Sigma-Aldrich
AG1478 (Tirfostina o N-(3-Clorofenil)-6,7-dimetoxi-4-quinazolina)	Calbiochem
Ap ₃ A (P ¹ ,P ³ -Di(adenosina-5') trifosfato)	Sigma-Aldrich
Ap ₄ A (P ¹ ,P ⁴ -Di(adenosina-5') tetrafosfato)	Sigma-Aldrich
Ap ₅ A (P ¹ ,P ⁵ -Di(adenosina-5') pentafofosfato)	Sigma-Aldrich
ATP (Adenosina-5'-trifosfato)	Sigma-Aldrich
Bisindolilmaleimida I (Bis I o GF109203X)	Sigma-Aldrich
(-)-Blebbistatina	Sigma-Aldrich
Estaurosporina	Sigma-Aldrich
ML-7 (1-(5-Iodonaftalen-1-sulfonyl)homopiperazina)	Calbiochem
PAO (Óxido de Fenilarsina)	Sigma-Aldrich
PDBU (Ester de forbol-12-13 dibutirato)	Calbiochem
PPADS (Ácido 6-azofenil-2'4' disulfónico-Piridoxalfosfato)	Tocris
PTD4-PfnI	Cedido por Dr. Miguel Morales, UAB
RB-2 (Reactivo Azul 2)	Sigma-Aldrich.
SB203580 (4-(4'-fluorofenil)-2-(4'-metilsulfonilfenil)-5-(4'-piridil)imidazol)	Calbiochem
Suramina	Tocris
UDP (Uridina-5'-difosfato)	Sigma-Aldrich
Up4U (Diuridina terafosfato)	INSPIRE Pharmaceuticals.
UTP (Uridina-5'-trifosfato)	Sigma-Aldrich
U0126 (1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis[2-aminofeniltio]butadieno)	Sigma-Aldrich

AGONISTAS, ANTAGONISTAS E INHIBIDORES	CASA COMERCIAL
U73122 (1-[6-(((17β)-3-Metoxiestra-1,3,5[10]-trien-17-amino]hexil)-1H-pirrol-2,5-diona)	Calbiochem
U73343 (1-[6-(((17β)-3-Metoxiestra-1,3,5[10]-trien-17-amino]hexil)-2,5-pirrolidinediona)	Calbiochem
Y27632 (4-(1-Aminoetil)-N-(4-Piridil)ciclohexanocarboxamida)	Sigma-Aldrich

REACTIVOS PARA CULTIVO CELULAR	CASA COMERCIAL
Bicarbonato sódico	Sigma-Aldrich
Dispasa II	Boehringer Mannheim Corporation
DMEM (Dulbecco's modified medium)	Invitrogen
Gentamicina	Invitrogen
MEM con sales de Earle's y aminoácidos no esenciales	Invitrogen
Penicilina-Estreptomina	Invitrogen
Piruvato sódico	Sigma-Aldrich
SIRC (Statens Seruminstitut Rabbit Cornea (CCL-60))	ATCC, LCG Promochem
Suero Bovino Fetal (SBF) inactivado y activado	Invitrogen
Tripsina 0.5 M EDTA	Invitrogen

ANTICUERPOS	CASA COMERCIAL
Goat polyclonal anti-P2Y ₂	Sta. Cruz Biotechnology
Mouse monoclonal anti-Citoqueratina 3	Biogenesis
Mouse monoclonal anti-ERK2	Sta. Cruz Biotechnology
Mouse monoclonal anti-Fibronectina	Sta. Cruz Biotechnology
Mouse monoclonal anti-MLC2	Sta. Cruz Biotechnology
Mouse monoclonal anti-pERK	Sta. Cruz Biotechnology
Mouse monoclonal anti-pMLC2	Cell Signalling
Mouse monoclonal anti-p38	Sta. Cruz Biotechnology
Mouse monoclonal anti-pp38	Sta. Cruz Biotechnology
Mouse monoclonal-anti ROCK-I	Sta. Cruz Biotechnology

ANTICUERPOS	CASA COMERCIAL
Mouse monoclonal anti-uPA	Sta. Cruz Biotechnology
Mouse monoclonal anti Vinculina	Chemicon
Oregon Green	Molecular Probes, Invitrogen
Donkey anti goat IgG-FITC	Sta. Cruz Biotechnology
Goat anti mouse IgG-FITC	Sigma-Aldrich
Goat anti mouse IgG-HRP	Sta. Cruz Biotechnology
Goat anti mouse IgG-TRICT	Sigma-Aldrich

REACTIVOS GENERALES	CASA COMERCIAL	REACTIVOS GENERALES	CASA COMERCIAL
Acetonitrilo	Scharlau	Acrilamida-Bisacrilamida	Bio-Rad
Albúmina de suero bovino (BSA)	Sigma-Aldrich	Alumbre de Cromo	Sigma-Aldrich
Aprotinina	Sigma-Aldrich	Azul de Bromofenol	Sigma-Aldrich
CaCl ₂	Panreac	CyQUANT [®] NF Cell Proliferation Assay	Invitrogen
ECL sistema de detección (ECL western blotting detection reagents)	Amersham Biosciences, GE Healthcare	EDTA	Sigma-Aldrich
EGTA	Sigma-Aldrich	Gelatina	Sigma-Aldrich
Glicerol	Sigma-Aldrich	Glicina	Sigma-Aldrich
Glucosa	Panreac	HCl	Panreac
HEPES	Sigma-Aldrich	Jung Tissue (medio de criomontaje)	Leica
KCl	Panreac	KH ₂ PO ₄	MERK
Leupeptina	Sigma-Aldrich	Membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL nitrocellulose membrane)	Amersham Biosciences, GE Healthcare
Metanol	MERK	2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
MgCl ₂	Panreac	MgSO ₄	Panreac
Millipore HAWP304F0 (para Citología de Impresión)	Millipore	NaCl	Panreac
NaF (Fluoruro Sódico)	Sigma-Aldrich	Na ₂ HPO ₄	Panreac
n-heptanol	Sigma-Aldrich	NP-40	Sigma-Aldrich

REACTIVOS GENERALES	CASA COMERCIAL	REACTIVOS GENERALES	CASA COMERCIAL
Na ₃ VO ₄ (Ortovanadato Sódico)	Sigma-Aldrich	Papel Whatman nº1	Whatman
Paraformaldehido (PFA)	Sigma-Aldrich	Pentobarbital Sódico	Braun
Pepstatin A	Sigma-Aldrich	Persulfato amónico	Sigma-Aldrich
PicoGreen staining (Quant-it dsDNA BR Reagent, Quant-iT dsDNA Brand Range Assay Kit)	Invitrogen	PMSF (Fenilmetilsulfonil Fluoruro)	Sigma-Aldrich
Pipes	Sigma-Aldrich	Reactivo Bradford	Bio-Rad
SDS (Dodecil sulfato Sódico)	Sigma-Aldrich	TBA (Tetrabutil amonio)	Sigma-Aldrich
TEMED	Sigma-Aldrich	Tiras de Schirmer	Gouche Pharma
Tris-base	Sigma-Aldrich	Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween-20	Calbiochem	Vectashield medio de montaje	Vector Lab Inc

REACTIVOS BIOLOGÍA MOLECULAR	CASA COMERCIAL	USO
Agar	Applichem	Cultivos de <i>E. coli</i>
Agarosa	Biotools	Electroforesis de ADN
Agarosa de bajo punto de fusión	Ecogen	Electroforesis de ADN
Agua libre de RNasas	Applichem	Varios usos
Ampicilina	Sigma	Cultivos de <i>E. coli</i>
AmpliTaq Gold [®] DNA polymerase	Applied Biosystems	Reacciones de PCR
Azul Tripán	Sigma-Aldrich	Contaje de viabilidad celular
Bactotripton	Cultimed	Cultivos de <i>E. coli</i>
Bromuro de etidio	Applichem	Electroforesis de ADN
dNTPs	Biotools	Reacciones de PCR y RT-PCR
25X dNTP mixture(High-Capacity cDNA Archive Kit)	Applied Biosystems	Reacciones de RT
Enzimas de restricción: EcoRI (E)	Promega	Construcción de vectores, análisis de clones de <i>E. coli</i> , etc
Extracto de levadura	Cultimed	Cultivos de <i>E. coli</i>
FirstChoice RLM-RACE Kit	Applied Biosystems	Clonaje Receptor P2Y ₂
Glicerol	Panreac	Cultivos de <i>E. coli</i>

REACTIVOS BIOLOGÍA MOLECULAR	CASA COMERCIAL	USO
λ /HindI	Mo Bi Tek	Marcador de peso molecular para geles de ADN
Kit TOPO TA cloning kit (Estirpe DH5 α de <i>E. coli</i>)	Invitrogen	Clonaje del receptor P2Y ₂
100pb ladder	Biotools	Marcador de peso molecular para geles de ADN
Ligasa (T4 DNA ligasa)	Promega	Ligaciones vector-inserto
Medio sin suero OPTI-MEM I	Invitrogen	Transfección del siRNA
MgCl ₂	Biotools / Applied Biosystems	Reacciones de PCR y RT-PCR
Oligonucleótidos	Sigma-Genosys	Reacciones de PCR, RT, RT-PCR, RT-PCRQ y PRCQ
PicoGreen [®] dsDNA Quantification Kit	Invitrogen	Determinación cuantitativa de ADN
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa
Qiagen RNA RNeasy Mini	Qiagen	Extracción de ARN
Quicklyse Miniprep kit	Qiagen	Aislamiento de ADN plasmídico (miniprep)
Quanytech SYBRGreen PCR Kit	Qiagen	RT-PCRq
Reactivo de transfección siPORT NeoFX	Ambion	Transfección de siRNA
RiboGreen [®] RNA Quantitation Reagent	Molecular Probes	Determinación cuantitativa de ARN
siRNA	Applied Biosystems	Tecnología de RNAi
SuperScript III Reverse Transcriptase y oligo(dT) ₂₀ Kit	Invitrogen	Reacciones de RT.
Transcriptasa reversa Multiscribe (High-Capacity cDNA Archive Kit)	Applied Biosystems	Reacciones de RT

3.1.2.- Medios y soluciones.

3.1.2.1.- Para extracción del epitelio corneal.

HBSS: Hank's Balance Salt Solution pH 7.4. Cálculos para 1 litro:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
KCl	5.4 mM	0.40 g
Na ₂ HPO ₄	0.3 mM	0.042 g
KH ₂ PO ₄	0.4 mM	0.05 g
NaCl	137 mM	8 g
Glucosa	5.6 mM	1 g
Gentamicina	500 µg/ml	1 ml

3.1.2.2.- Medios de cultivo.

DULBECCO'S MODIFIED MEDIUM (DMEM): Cálculos para 500 ml:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
DMEM		5 g
Bicarbonato sódico	3.7 g/l	1.85 g
Glucosa	2.4 g/l	1.2 g
SBF inactivado	10 %	50 ml
Penicilina - Estreptomina	1 %	5 ml

MEM CON SALES DE EARLE'S Y AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
MEM		4.805 g
Piruvato sódico	1 mM	0.055 g
Bicarbonato sódico	2.2 g/l	1.1 g
SBF activado	10 %	50 ml

3.1.2.3.- Para Inmunocitoquímica.

TAMPÓN FOSFATO SALINO (PBS) 10X pH 7.3: Cálculos para 1 litro:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
NaCl	1.37 mM	80 g
KCl	26.8 mM	2 g
Na ₂ HPO ₄	81 mM	11.5 g

PARAFORMALDEHIDO (PFA) AL 4% EN PBS 0.15M: Cálculos para 100 ml:

Disolver 4 g de PFA en 30 ml de agua destilada añadiendo unas gotas de NaOH. Añadir 10ml de PBS 10X y 60ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.4 y enrasar.

PBS 1x BSA3%: Cálculos para 100 ml:

Disolver 3 g de BSA en 50 ml de agua y añadir 10 ml de PBS 10X. Ajustar el pH a 7.4 y enrasar.

SOLUCIÓN DE BLOQUEO: Cálculos para 10 ml:

COMPUESTO	CANTIDAD
PBS 1X BSA 3%	9.4 ml
Triton X-100 1%	100 µl
Suero 5%	500 µl

3.1.2.4.- Para ensayos de migración celular.

MEDIO LOCKE pH 7.4: Cálculos para 1 litro:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
NaCl	140 mM	8.2 g
KCl	4.7 mM	0.35 g
CaCl ₂	2.5 mM	0.28 g
MgSO ₄	1.2 mM	0.29 g
KH ₂ PO ₄	1.2 mM	0.16 g
Glucosa	5.5 mM	0.99 g
HEPES	10 mM	2.38 g

3.1.2.5.- Para Western Blot.

TAMPÓN DE LISIS: Cálculos para 200 ml:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
Tris	20 mM pH = 7.5	0.48456 g
NaCL	150 mM	1.75326 g
Triton X100	1%	2 ml

LBx3: Cálculos para 10 ml:

LBx3	CONCENTRACIÓN	STOCK	CANTIDAD
Tris pH = 6.8	0.125 mM	1 M	1.25 ml
SDS	4%	10%	4ml
Glicerol	29%	99%	2 ml
2-mercaptoetanol	10%	100%	1 ml
EDTA	15mM	0.5%	300 µl
Azul de bromofenol	-----	-----	Una pizca
Agua	-----	-----	1.16 ml

PARA LOS GELES DE ACRILAMIDA:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
Tris pH = 8.8	1M	12.1 g en 100ml de agua
Tris pH = 6.8	1M	12.1 g en 100ml de agua
SDS pH = 7.2	10%	10g en 100 ml de agua
Persulfato amónico (APS):	15 mg/ml	150 mg en 10 ml agua
TEMED	50 µl/ml	500 µl en 10 ml de agua

TAMPÓN DE ELECTROFORESIS 5X: Cálculos para 500 ml:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
Tris	0.125 M	7.56 g
Glicina	0.96 M	36 g
SDS	0.5%	2.5 g

TAMPÓN DE TRANSFERENCIA SEMI-DRY 5X: Cálculos para 1 litro:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
Tris	48mM	5.81 g
Gly	39 mM	2.93 g
SDS	0.0375%	0.375 g
MetOH	20%	200 ml

SOLUCIÓN DE BLOQUEO: PBS 1X y Leche al 5%:

Disolver 5g de leche en 100 ml de PBS 1X.

SOLUCIÓN PARA LAVADOS: PBS 1X Tween-20 al 0.05%:

Disolver 50 µl de Tween-20 para 100 ml de PBS 1X.

PARA ANTICUERPO PRIMARIO: PBS 1X Tween-20 al 0.05% y leche al 2%:

Disolver 50 µl de Tween-20 y 2 g de leche para 100 ml de PBS 1X.

PARA ANTICUERPO SECUNDARIO: PBS 1X Tween-20 al 0.05%:

Disolver 50 µl de Tween-20 para 100 ml de PBS 1X.

SOLUCIÓN DE REPROBING: Cálculos para 10 ml:

COMPUESTO	CANTIDAD
β-Mercaptoetanol	69.47 µl
SDS 10%	2 ml
Tris pH = 6.8	625 µl
H ₂ O destilada	Hasta 10 ml

3.1.2.6.- Para RT-PCR.

MEDIOS Y SOLUCIONES	COMPOSICIÓN
Medio LB (Luria-Bertani)	Bactotripton 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l
Medio LB sólido	Medio LB, Agar 15 g/l
Medio LB-Glicerol	Medio LB (70 %), Glicerol (30 %)
Tampón TAE	Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH = 8.0
Tampón PCR Tth (10X)	Tris-HCl 750mM (ph = 9), KCl 500 mM (Ph = 9 a 25 °C), (NH ₄) ₂ So ₄ 200 mM
Tampón RT (10X)	High-Capacity vDNA Archive Kit

3.1.3.- Equipos e instrumentos empleados en el trabajo experimental.

EQUIPOS E INSTRUMENTOS	FABRICANTE	USO
ABI Prism 7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems	RT-PCRq y PCRq
Agitador de balanceo Sky Line	Biogen	Varios
Agitador orbital Bunsen	Nessler	Varios
Baño termostatzado	Labnet Internacional, Inc.	Western Blot
Botellas de cultivo de 75 cm ²	Cultek	Cultivos
Camara de Neubauer	BRAND GMBH	Contaje de células
Campana de flujo laminal	Heraeus	Varios
Centrifuga de sobremesa Picofuge.	Heraeus	Varios
Centrifuga refrigerada Kubota 6500	Kubota	Varios
Columnas Novapack C18 y Sunfire C18 5 µm	Waters	HPLC
Criostato Leica CM1850	Leica	Cortes histológicos
Espectrofotómetro U-2001	Hitachi	Varios
Estufa	Memmert, Grupo Taper	Cultivos de <i>E. Coli</i>
Estufa de cultivos Heracell	Heraeus	Cultivos
Fluoroscán ASCENT FL	Thermo Labsystems	Proliferación celular
HPLC	Waters	HPLC
KODAK Gel Logic 2000	KODAK, Grupo Taper	Densitometrado de bandas en Western Blot
Lab-Tek chamber slides	Nunc	Inmunocitoquímica
Lámpara de Hendidura Topcon SL-8Z	Topcon	Estudio progresión lesiones corneales
Microscopio Zeiss Axiovert 200M	Zeiss	Microscopía de contraste de fases y de fluorescencia
MINI PROTEAN [®] 3 CELL	Bio-Rad	Electroforesis de proteínas
Orbital Innova 40	New Brunswick Scientific, Grupo Taper	Cultivos de <i>E. coli</i>
Pipetas	Eppendorf	Varios
Placas 6, 24 y 96 pocillos	Cultek	Cultivos
Placas Petri	Cultek	Cultivos
Portas y Cubreobjetos	Thermo Scientific Menzel-Gläser	Inmunocitoquímica

EQUIPOS E INSTRUMENTOS	FABRICANTE	USO
Sep-Pak Waters Accell Plus QMA Cartridges	Waters	Separación de nucleótidos para HPLC
Termociclador Mastercycler gradient	Eppendorf	Termociclador (PCR)
Trans-Blot® SD Semy-Dry transfer cell	Bio-Rad	Transferencia en Western BLOT

3.1.4.- Programas, bases de datos y herramientas informáticas empleadas en el trabajo experimental.

HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	USO
Ascent software v 2.6	Proliferación
BLAST	Permite la búsqueda de secuencias, en las bases de datos existentes, que presentan coincidencias de longitud con una secuencia problema
ClustaX v.1.8	Programa que permite el alineamiento de múltiples secuencias
GenBank EMBL	Bases de datos para ácidos nucleicos
Imaginet 2000Topcon	Estudio progresión lesiones corneales in vivo
Instat	Estadística
OriginPro vs.7.0; 7.5 y 8.0	Análisis de datos
Primer Express v2.0 (Applied Biosystems)	Diseño de oligonucleótidos (PCR, RT-PCR, RT-PCRq)
Software ABI Prism 7300	Rt-PCR a tiempo real
Software Breeze de Waters	Cuantificación nucleotidos por HPLC
Software KODAK Molecular Imaging Software (KODAK)	Densitometrado de bandas en Western Blot y análisis de geles de agarosa
Software LSM 5 Pascal (Microscopio Zeiss Axiovert 200M)	Varios

3.2.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Hemos empleado conejos albinos machos adultos de la raza Nueva Zelanda con un peso comprendido entre los 2 y los 2.5 Kg. Todos los animales han sido tratados siguiendo el “ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research”, y también en concordancia con la directiva (89/609/CEE) del Consejo de la Unión Europea, y han estado estabulados en jaulas individuales con libre acceso a la comida y a la bebida y controlados con ciclos de 12 horas de luz – 12 horas de oscuridad.

3.3.- CULTIVO CELULAR.

3.3.1.- Cultivo primario de epitelio córneoal de conejo.

Las células de epitelio corneal de conejo se han obtenido de ejemplares macho adultos sanos que fueron sacrificados con Pentobarbital Sódico (tiopental sódico D.C.I. 1 g). Una vez enucleados los ojos, realizamos el resto del proceso en campana de flujo laminar.

La cornea se disecciona en HBSS (Hank's Balance Salt Solution) pH 7.4, con la ayuda de una lupa de disección. Se separa la córnea del limbo esclerocorneal y se corta en secciones. A continuación se incuban estas secciones en 1.0 U Dispasa II durante 1 hora a 37 °C en la estufa de cultivos; una vez pasado este tiempo de incubación, el epitelio se separa del estroma subyacente y se incuba en 0.05 % Tripsina 0.5M EDTA durante 20 minutos a 37 °C, para disgregar el tejido. La mezcla de Tripsina-EDTA y células epiteliales se traspara a un tubo falcon que contiene 8 ml de Dulbecco's modified medium (DMEM) suplementado con 10 % SBF y 1 % penicilina-estreptomicina (DMEM completo), se resuspende bien y se centrifuga dos veces a 1100 rpm durante 6 minutos a 4 °C. Finalmente, las células se resuspenden en DMEM completo, y se siembra en placas multipocillo de seis pocillos. Se mantiene en la estufa de cultivos a 37 °C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad hasta confluencia.

3.3.2.- Línea establecida de conejo “SIRC”.

Para poder continuar y realizar los ensayos de Western Blot y Biología Molecular, hemos tenido que utilizar una línea establecida de epitelio corneal ya que necesitábamos un volumen de células que con el cultivo primario no podíamos obtener. Para seguir estudiando el mismo modelo animal de investigación, nos decantamos por la línea inmortal de epitelio corneal de conejo SIRC. Esta línea celular se mantiene en cultivo en medio MEM con sales de Earle's y aminoácidos no esenciales, piruvato sódico, bicarbonato sódico y 10 % de SBF pH 7.3. Se cambia el medio cada dos días y se hace un pase cada siete días.

3.4.- INMUNOCITOQUÍMICA PARA CITOQUERATINA 3.

Para demostrar que las células aisladas, mediante el protocolo realizado para obtención del cultivo primario, son células epiteliales de córnea, estas células se siembran a un 80 % de confluencia en cubreobjetos. Tras tres lavados con Tampón Fosfato Salino (PBS) 10X, se procede a fijar las células con Paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS 0.15M durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, volvemos a lavar las células con PBS 10X, esta vez en agitación y repitiendo dos lavados de 5 minutos cada uno. Se incuban las células con la solución de bloqueo (PBS 1X BSA 3 %, Triton X-100 1 %, SBF 5 %) para evitar las uniones inespecíficas, durante 1 hora a 37 °C. Pasado este tiempo de incubación, se realizan dos lavados con PBS 1x BSA 3 % de 5 minutos cada uno en agitación, seguido de la incubación con el anticuerpo primario (mouse monoclonal anti-Citoqueratina 3) en dilución 1:100 o PBS 1x BSA 3 % en el caso de los controles negativos. Este anticuerpo se incuba toda la noche a 4 °C en atmósfera húmeda y oscuridad. Finalizada la incubación, lavamos las células con PBS 1x BSA 3 % durante 10 minutos, en agitación y repitiéndolo tres veces, realizando posteriormente la incubación con el anticuerpo secundario (goat anti Ig-G mouse FITC) en dilución 1:200, el cual se incubará durante 1 hora a 37 °C en estufa húmeda y cerrado para evitar el apagamiento. Finalmente, los cubreobjetos se montan sobre los portas con el medio de montaje. La observación de los resultados se realiza mediante microscopía confocal empleando el microscopio Zeiss Axiovert 200M,

equipado con el módulo confocal LSM 5 Pascal, y tomando las imágenes con el software LSM 5 Pascal.

3.5.- ESTUDIOS DE MIGRACIÓN CELULAR EN CULTIVO PRIMARIO.

Para estudiar el efecto que los dinucleósido polifosfatos y los mononucleótidos tienen en la migración del epitelio corneal, realizamos una serie de experimentos de migración celular en monocapas celulares confluentes en placas multipocillo de 24 pocillos.

Las monocapas confluentes se lesionan levantando la monocapa celular empleando una punta de pipeta de 10 μ l. Tanto el tamaño como el área iniciales de las diferentes lesiones realizadas son similares en todos los casos (60000-80000 μ m²), lo que minimiza la variación en el mecanismo de la lesión, por lo que la migración es equivalente en todos los casos y comparte las mismas características como ya describió Crosson en 1986. Las mediciones de área lesionada, en cada caso, se realizan en ocho pocillos diferentes y la medida se describe como media \pm S.E.M (error estándar de la media). Estas ocho lesiones de cada experimento se han realizado en cuatro cultivos independientes.

Las incubaciones con los reactivos pertinentes se realizan en medio Locke, para evitar interferencias debidos al medio de cultivo, como describieron Valster et al., en 2005.

A continuación se enumeran los experimentos de migración celular realizados.

3.5.1.- Ensayos de migración con dinucleosido polifosfatos y mononucleótidos a concentración fija 100 μ M.

Los dinucleósido polifosfatos (Ap₃A, Ap₄A, Ap₅A y Up₄U) y los mononucleótidos (ATP, UTP, ADP y UDP) se ensayan en primer lugar a concentración fija de 100 μ M. En cada ensayo, vamos a tener lesiones control y lesiones tratadas con los diversos dinucleósido polifosfatos o mononucleótidos (n = 8 en cada caso).

Tras la realización de las lesiones en la monocapa celular, se retira el medio de cultivo y se somete a las células a una incubación de 2 minutos con una solución de di- o mononucleótido a concentración 100 μM , en medio Locke (pH = 7.4) o, para las lesiones control, simplemente se incuba con el medio Locke. Pasado el tiempo de incubación, se lavan las células y se añade medio DMEM completo fresco. La monocapa lesionada se incuba con esta dosis en tiempos 0 y 6 horas tras la realización de la lesión, siguiendo el mismo protocolo de aplicación descrito anteriormente en conejos (Pintor et al., 2004a). Se toman imágenes cada dos horas durante el periodo de tiempo de 10 horas tras la realización de la lesión, y posteriormente a las 24 horas. El área de las lesiones se determina con el software LSM 5 Pascal (microscopio Zeiss Axiovert 200M). En el tiempo que hay entre medida y medida del área, las células se mantienen en la estufa de cultivos a 37 °C, 5 % CO_2 y 95 % de humedad.

3.5.2.- Ensayos de migración para la obtención de las curvas concentración-respuesta de dinucleósido polifosfatos y mononucleótidos.

Una vez conocida la acción de los diversos compuestos a una concentración fija de 100 μM , los dinucleótidos Ap_3A , Ap_4A y Ap_5A , junto con los mononucleótidos ATP, UTP y UDP, se ensayan en un rango de concentraciones que va desde 0.01 μM a 1 mM, con el objetivo de obtener las correspondientes curvas concentración-respuesta.

El protocolo de ensayo es el mismo que el descrito para la dosis fija de 100 μM , con un $n = 8$ para cada caso control o dosis de di- y mononucleótido.

3.5.3.- Ensayos de migración con antagonistas P2Y.

Primeramente, los antagonistas de los receptores P2, tales como Ácido 6-azofenil-2'4'disulfónico-piridoxalfosfato (PPADS), suramina y el reactivo azul 2 (RB-2), se ensayan a concentración fija de 100 μM , en presencia de los agonistas (Ap_3A o Ap_4A , 100 μM cada uno) ($n = 8$). El ensayo se realiza de la siguiente manera: las monocapas celulares lesionadas son pre-tratadas con una concentración 100 μM del antagonista en medio Locke, 30 minutos antes de la aplicación de una concentración

100 μM de Ap_3A o Ap_4A (junto con el antagonista) de nuevo en medio Locke. Estos agonistas se incuban 2 minutos y se sigue el procedimiento de ensayo descrito anteriormente. En el caso de las lesiones control, la incubación de 30 minutos se realiza solo con medio Locke.

A continuación, se han realizado ensayos de concentración-respuesta para los antagonistas efectivos: suramina y RB-2, ensayando concentraciones en el rango de 0.1 μM a 1 mM. Los ensayos se realizaron en presencia de Ap_4A 100 μM (en el caso de suramina) o Ap_3A 100 μM (para RB-2) ($n = 8$ en cada caso). Como en el caso de los ensayos realizados a concentración fija del antagonista en presencia de los agonistas, se pre-tratan las células con las diversas concentraciones de los antagonistas durante 30 minutos, y posteriormente se incuban 2 minutos con los agonistas. El resto del ensayo es igual al descrito. Como siempre, los controles se incuban solo con medio Locke.

Por último, en los ensayos en los que se testan los antagonistas a concentración 100 μM solos, lo que se hace es incubar la monocapa lesionada durante 30 minutos con la solución del antagonista en medio Locke, o con medio Locke solo en el caso de las lesiones tomadas como control ($n = 8$ en cada caso). Posteriormente se retira la solución, se lavan las células y se añade medio DMEM completo fresco. El resto del procedimiento es igual al descrito para los agonistas.

3.5.4.- Ensayos de migración con inhibidores de las rutas intracelulares: MAPK y Citoesqueleto.

Como la hipótesis que barajamos es que la activación de los receptores P2Y activan las rutas intracelulares de las MAPK y el citoesqueleto de actina vía RhoA / ROCK-I, hemos realizado varios ensayos de migración celular en los que testamos el efecto que varios inhibidores de estas vías, tienen sobre la modificación de la velocidad de re-epitelización de Ap_4A o Ap_3A 100 μM .

Se comenzó estudiando el efecto de U0126 (inhibidor de ERK1/2 a nivel de MEK1/2), AG1478 (inhibidor de TyrK) ambos a concentración 100 μM e Y27632 (inhibidor de ROCK-I) a concentración de 100 nM, todos en presencia o en ausencia de

Ap₄A o Ap₃A 100 μM (n = 8 cada uno). Como en el caso de los ensayos con los antagonistas de los receptores P2, pre-incubamos las células con una solución 100 μM o 100 nM de los inhibidores en medio Locke durante 30 minutos, y pasado ese tiempo, incubamos 2 minutos con los agonistas a concentración 100 μM también en medio Locke (en presencia de los antagonistas). En el caso de los controles, incubamos solo con medio Locke. De nuevo, el resto del protocolo es el descrito para los ensayos previos.

Posteriormente, se pasó a inhibir diferentes puntos de la vía RhoA / ROCK-I del citoesqueleto de actina. Para ello, pre-tratamos las células con varios inhibidores tanto en presencia como en ausencia de Ap₄A o Ap₃A 100 μM (n = 4 cada uno). Los inhibidores testados fueron: (-)-Blebbistatina 10 μM (inhibidor selectivo de miosina II no muscular), Óxido de Fenilarsina (PAO) 5 μM (inhibe a nivel de RhoA y la internalización de los receptores de membrana) y ML7 (hidroclorido) 25 μM (inhibe la quinasa de cadena ligera de miosina). Además, también probamos un activador de la ruta: PTD4-PfnI, una profilina con la capacidad de unir monómeros de actina y facilitar la polimerización de la misma. Con los tres primeros compuestos (los inhibidores de la ruta), pre-tratamos las células durante un periodo de tiempo de 30 minutos, mientras que con PTD4-PfnI lo hacemos 1 hora, antes de incubar con Ap₄A o Ap₃A 100 μM durante 2 minutos (en presencia de los compuestos anteriores). En este caso todos los compuestos están resuspendidos en DMEM completo. En el caso de las lesiones control, estas se incuban con DMEM completo fresco. Por lo demás, seguimos el mismo procedimiento de siempre.

3.5.5. Ensayos de migración con inhibidores de las rutas intracelulares: Fosfolipasa C / Proteína Quinasa C.

Para estudiar el posible efecto de la ruta Fosfolipasa C / Proteína Quinasa C (PLC/PKC) en la migración celular, se han realizado varios ensayos de migración celular en los que se ha testado el efecto que varios activadores e inhibidores de esta vía tienen sobre la modificación de la velocidad de re-epitelización de Ap₄A 100 μM.

Estudiamos el efecto de Estaurosporina 1 nM (inhibidor de la actividad de las Proteína Quinasas), Bisindolilmaleimida-I 10 μ M (inhibidor de la actividad de la Proteína Quinasa C), PDBU 1 μ M (activador de la Proteína Quinasa C), U73122 (Inhibidor de la Fosfolipasa C) y U73343 (análogo inactivo de U73122 empleado como control negativo) ambos 3 μ M ($n = 8$ cada uno). Como en el caso de los ensayos descritos en los puntos 3.5.3 y 3.5.4, pre-incubamos las células con una solución de los inhibidores a la concentración marcada en medio Locke durante 30 minutos para Estaurosporina, Bisindolilmaleimida-I y PDBU y 10 minutos para U73122 y U73343, y pasado ese tiempo, incubamos 2 minutos con los agonistas a concentración 100 μ M también en medio Locke (en presencia de los antagonistas). En el caso de los controles, incubamos solo con medio Locke. De nuevo, el resto del protocolo es el descrito para los ensayos previos.

Por último, se testan los cinco inhibidores solos, empleándolos a la misma concentración que cuando se testan en presencia de Ap₄A. Incubamos la monocapa lesionada durante 30 minutos para Estaurosporina, Bisindolilmaleimida-I y PDBU y 10 minutos para U73122 y U73343 con la solución del inhibidor en medio Locke, o con medio Locke solo en el caso de las lesiones tomadas como control ($n = 8$ en cada caso). Posteriormente se retira la solución, se lavan las células y se añade medio DMEM completo fresco. El resto del procedimiento es igual al descrito.

3.5.6.- Ensayo de migración en la línea establecida “SIRC”.

Para comprobar que las células SIRC se comportan de la misma manera que las células del cultivo primario de epitelio corneal de conejo, en cuanto a variaciones en la migración celular tras el tratamiento con los diferentes dinucleótidos, se ha hecho un ensayo de migración en monocapas confluentes de células SIRC con Ap₄A o Ap₃A 100 μ M ($n = 8$ cada uno). Para realizar este ensayo, se ha utilizado el protocolo descrito en el apartado 3.5.1.

También se realiza el ensayo para las rutas intracelulares de MAPK, RhoA / ROCK-I y PLC/PKC, en las mismas condiciones que el realizado para cultivo primario descritas anteriormente.

3.6.- ANÁLISIS DE LOS DINUCLEÓTIDOS POR HPLC.

3.6.1.- Estudio de la estabilidad de los dinucleótidos tras los ensayos de migración *in vitro*.

El estudio de la estabilidad de los dinucleótidos tras la incubación en los ensayos de migración se realiza siguiendo el siguiente protocolo: realizamos la lesión del epitelio corneal en confluencia como hemos mencionado en el apartado 3.5. Tras la incubación con Ap₄A y Ap₃A 100 μM; en presencia o en ausencia de los antagonistas de los receptores P2 (suramina y RB-2 100 μM respectivamente), recogemos el medio de cultivo. Activamos la columna de intercambio iónico Sep-Pak Waters Accell Plus QMA Cartridges con 3 ml de agua, a continuación pasamos la muestra, volvemos a lavar la columna con 3 ml de agua y por último extraemos los nucleótidos con 1 ml de KCl 0.2 M HCl 0.1 M.

La determinación y cuantificación de la estabilidad de los dinucleótidos tras los ensayos realizados, se determina mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). El sistema cromatográfico consiste en una sistema Waters 1515 isocratic HPLC, con un detector de absorbancia 2487 dual y un inyector Reodyne, empleando para la determinación y manejo el software Breeze de Waters. La columna empleada para la detección es Novapack C18 (15 cm de largo y 0.4 cm de diámetro).

El equilibrado del sistema se realiza durante toda la noche con la siguiente fase móvil: 0.1 M KH₂PO₄, 2 mM tetrabutil amonio (TBA), 17 % acetonitrilo, pH = 7.5. La detección de los dinucleótidos se realiza a una longitud de onda de 260 nm. Los picos que se obtienen se transforman en concentraciones gracias a la comparación con controles estándar externos para diadenosina polifosfatos de concentración conocida.

3.6.2.- Estudio de la concentración de Ap₄A en la lágrima de conejo tras una lesión del epitelio corneal.

Para conocer la evolución de la concentración de Ap₄A en la lágrima de conejo con el tiempo tras la lesión de la cornea de conejo *in vivo*, lesionamos las corneas de los animales (n = 4) empleando discos de papel Whatman n° 1 de 5 mm de diámetro, empapados en n-heptanol y colocado sobre la superficie corneal durante 30 segundos.

Las muestras de lágrima van a ser recogidas antes de la lesión, justo en el momento de la lesión, y luego cada dos horas en el periodo de tiempo comprendido entre las 10 y las 36 horas y las 48 y las 60 horas posteriores a la lesión, periodo de tiempo que incluye tanto la fase de migración como la fase de división celular del proceso de re-epitelización corneal.

La secreción lagrimal la recogemos realizando el Test de Schirmer. Para ello colocamos la tira de Schirmer en la zona nasal de la conjuntiva del párpado inferior del ojo del conejo y lo mantenemos durante 5 minutos. Pasado ese tiempo, retiramos la tira del ojo del animal y anotamos el valor de secreción (1mm de tira de Schirmer humectada equivale a 1µl de secreción lagrimal). A continuación introducimos la tira en 500 µl de agua ultrapura.

La extracción de los nucleótidos de las muestras la realizamos siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior, utilizando las columnas de intercambio iónico Sep-Pak Waters Accell Plus QMA Cartridges.

La determinación y cuantificación de los niveles de Ap₄A se realiza mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con el mismo sistema cromatográfico descrito anteriormente. En este caso, la columna empleada para la detección es Sunfire C18 5 µm. El volumen de muestra analizado son 100 µl.

El equilibrado del sistema se realiza durante toda la noche con la siguiente fase móvil: 0.1 M KH₂PO₄, 2 mM TBA, 20 % acetonitrilo, pH = 7.5. La detección de los dinucleótidos se realiza a una longitud de onda de 260 nm. Los picos que se obtienen se

transforman en concentraciones gracias a la comparación con controles estándar externos para diadenosina polifosfatos de concentración conocida (10 μ l de una solución 10 μ M, es decir, 100 pmol). Además, debemos tener en cuenta los valores de secreción lagrimal para conocer la concentración final de Ap₄A en cada una de las condiciones.

3.7.- WESTERN BLOT PARA pERK1/2, ROCK-I, pMLC2 Y pp38.

Para realizar los ensayos de Western Blot en los cuales valoramos la activación de las rutas intracelulares de ERK1/2, RhoA / ROCK-I, pMLC2 y p38, sembramos monocapas confluentes de células SIRC en placas de 55 cm². Realizamos lesiones a lo largo (en forma de cruceta) con la punta de una pipeta de 1000 μ l. En medio Locke, vamos a incubar con Ap₄A o Ap₃A 100 μ M, y además, en presencia de los dinucleótidos, pre-tratamos con los siguientes antagonistas y/o inhibidores: suramina (para Ap₄A), RB-2 (para Ap₃A), U0126 (todos ellos a concentración 100 μ M), Y27632 (100 nM), Estaurosporina 1nM, Bisindolilmaleimida-I 10 μ M, U73122 y U73343 ambos 3 μ M, siguiendo el mismo protocolo descrito hasta ahora. Los tiempos de incubación para ver la expresión de proteínas son los siguientes: 0 horas, 2, 5, 10, 15 y 30 minutos, y 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas. Las células se mantienen en el incubador de células a 37 °C, 5 % CO₂ y una humedad del 95 %.

Pasados los tiempos de incubación, las células se recogen en PBS 1X frío y se centrifugan a 2000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Eliminamos el sobrenadante y dejamos el precipitado lo más seco posible. Congelamos ese precipitado a -20 °C hasta lisis.

Los precipitados congelados se lisan en Tampón de lisis (Tris 20 mM pH = 7.5, NaCl 150 mM, Triton X-100) conteniendo PMSF 1 mM, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, Pepstatin A 1 μ g/ μ l, Leupeptina 2 μ g/ μ l y Aprotinina 1 μ g/ μ l, con una aguja de 25G. Centrifugamos a 13000 rpm 20 minutos a 4°C y recogemos el sobrenadante que es donde están las proteínas.

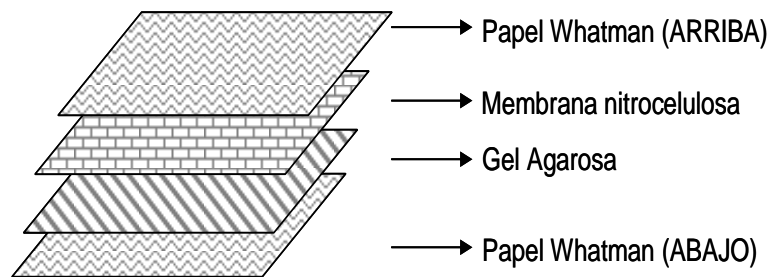
Para separar la fracción citoplasmática de la fracción nuclear, el precipitado celular se resuspende en 2 volúmenes de Tampón A (MgCl_2 1.5 mM, KCl 10 mM, Tris 10 mM, pH = 7.9) que contiene PMSF 1 mM, NaF 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, Pepstatin A 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Leupeptina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Aprotinina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y NP-40 0.05%. Tras centrifugación a 15000 rpm se recogen los sobrenadantes que serán la fracción proteica citoplasmática. Los precipitados se resuspenden en 1 volumen de Tampón B (Glycerol 20 %, MgCl_2 1.5 mM, KCl 10 mM, Tris 20 mM, pH = 7.9) y 2/3 de volumen de Tampón C (Glycerol 20 %, MgCl_2 1.5 mM, KCl 1.2 M, Tris 20 mM, pH = 7.9) que contiene PMSF 1 mM, NaF 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, Pepstatin A 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Leupeptina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y Aprotinina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Incubamos 45 minutos en hielo, en agitación, y procedemos a una centrifugación a velocidad máxima (20000 rpm), tras la cual recogeremos los sobrenadantes donde se encontrarán las proteínas nucleares.

La concentración de proteínas la determinamos mediante el método de Bradford. Para ello preparamos una recta patrón con BSA de 1 a 10 μg , y las muestras las valoramos diluidas 1:50 en tampón de lisis (también diluido 1:50).

Preparamos 45 μg de proteína total de cada una de las muestras analizadas por Bradford. Añadimos el correspondiente volumen de LBx3 (la mitad del volumen de muestra que vayamos a cargar), centrifugamos 1 min 5000 rpm a temperatura ambiente y calentamos en el baño a 90 °C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Dejamos enfriar un poco las muestras y cargamos en el gel.

Los geles que vamos a emplear tiene la siguiente concentración de acrilamida-bisacrilamida: 10 % para pERK1/2 y p-p38, 7 % para ROCK-I y 12 % para pMLC2. Corremos la electroforesis (MINI PROTEAN[®] 3 CELL) a un amperaje constante de 25 mA por gel durante unos 40 minutos.

Pasado ese tiempo, hidratamos, en el tampón de transferencia Semi-dry, durante 15 minutos, todo lo necesario para la transferencia: la membrana de nitrocelulosa, los geles, y los papeles whatman. Una vez hidratado realizamos el montaje en la fuente de transferencia (Trans-Blot[®] SD Semy-Dry transfer cell Bio-Rad). Para ello realizamos un sándwich con los diversos componentes en el orden adecuado:



Cuando está todo preparado, corremos la transferencia a voltaje constante de 22v durante 1 hora. Terminada la transferencia, se introduce la membrana en la solución de bloqueo (PBS 1X y leche en polvo al 5 %) durante 1 hora en agitación para bloquear las uniones inespecíficas. A continuación se incuba con el anticuerpo primario (anti pERK1/2, anti-ROCK-I, anti pMLC2 y anti-p-p38) diluidos 1:1000 en PBS 1X Tween-20 0.05 % y leche en polvo al 2 % durante toda la noche a 4 °C y en agitación. Una vez finalizada esta incubación, hacemos 3 lavados con PBS 1X Tween-20 0.05 % de 10 minutos cada uno, en agitación y a temperatura ambiente para eliminar los restos de anticuerpo primario, e incubamos con el anticuerpo secundario goat antimouse IgG-HRP en dilución 1:2000 en PBS 1X Tween-20 0.05 % durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Por último hacemos 3 lavados con PBS 1X Tween-20 0.05 % de 10 minutos cada uno, en agitación y a temperatura ambiente.

Las proteínas separadas se visualizan con “ECL sistema de detección” siguiendo las indicaciones del fabricante.

Una vez reveladas las membranas se lavan con solución de reprobing (Tris 1M pH = 6.8, SDS 10 %, β -mercaptoetanol 6.9 %) durante 30 minutos a 50 °C y con agitación ocasional para eliminar los restos de ECL, anticuerpo secundario y anticuerpo primario. A continuación se incuba con solución de bloqueo (PBS 1X y leche en polvo al 5 %) durante 1 hora en agitación para bloquear las uniones inespecíficas, y se incuba con el anticuerpo primario anti-ERK2 o anti-MLC2 en dilución 1:1000 o anti p38 1:500, para chequear si la carga de los pocillos es igual en todos los casos.

La intensidad de cada banda se examina por análisis densitométrico con el equipo KODAK Gel Logic 2000 y el software KODAK Molecular Imaging Software.

3.8.- INMUNOCITOQUÍMICA PARA pERK1/2 Y ROCK-I. ESTUDIO DE TRASLOCACIÓN AL NÚCLEO.

En presencia de Ap₄A o Ap₃A 100 μM con los pre-tratamientos U0126 100 μM e Y27632 100 nM, evaluamos la distribución intracelular de pERK1/2 y ROCK-I, para correlacionar los resultados de los ensayos de Western Blot, y para conocer la posible relación entre ambas rutas. Como marcador específico nuclear, empleamos PicoGreen staining (Ashley et al., 2005), porque el reactivo PicoGreen dsDNA marca de forma específica los ácidos nucleicos, y puede ser utilizado en inmunocitoquímica con un marcaje fluorescente visible en verde.

Las células SIRC se crecen hasta el 80 % de confluencia en cubreobjetos, y se lesiona la monocapa como hemos descrito anteriormente en el apartado 3.5. Las monocapas se incuban con U0126 100 μM o Y27632 100 nM durante 30 minutos, y en presencia de los inhibidores, las células se incuban con Ap₄A o Ap₃A 100 μM durante 2 minutos. También se incuban con Ap₄A o Ap₃A 100 μM durante 2 minutos en ausencia de inhibidores. Como control se emplean monocapas lesionadas que no son tratadas con nada. Tras la incubación, se añade MEM fresco y las células se incuban durante 1 hora o 15 minutos para obtener el máximo de activación para pERK1/2 y ROCK-I respectivamente.

Terminada esta incubación, se realiza la inmunocitoquímica para pERK1/2 siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.4. Las células son tratadas con los anticuerpos primarios anti-pERK1/2 o anti-ROCK-I (ambos 1:100) o PBS 1X BSA 3 % para los controles negativos. El anticuerpo secundario empleado es goat anti mouse IgG-TRICT (1:200), y en este mismo momento se co-incuba con PicoGreen 1:200 (para ello añadimos el reactivo PicoGreen a la disolución del anticuerpo secundario).

Las células se observan bajo microscopio confocal Axiovert 200M, equipado con el módulo confocal LSM 5 Pascal. Todas las imágenes son tratadas con el software Pascal que acompaña al equipo.

3.9. ENSAYOS CITOESQUELETO: INMUNOFLUOPRESCENCIA PARA FIBRONECTINA / uPA Y FALOIDINA / VINCULINA.

Para conocer la implicación real del citoesqueleto de actina, en el proceso de migración celular, estudiamos mediante inmunocitoquímica la evolución del marcaje de varias proteínas de matriz extracelular (Fibronectina y Uroquinasa Activadora de Plasminógeno (uPA)) y de citoesqueleto (Faloidina y Vinculina) implicadas en los procesos de adhesión celular, anclaje de citoesqueleto y formación-degradación de la matriz extracelular.

Sembramos células SIRC a confluencia en portas especiales (Lab-Tek chamber slides). Las monocapas confluentes se lesionan levantando la monocapa celular empleando una punta de pipeta de 10 μ l, se retira el medio de cultivo y se somete a las células a una incubación de 2 minutos con una solución de Ap₄A 100 μ M en medio Locke o, para las lesiones control, simplemente se incuba con el medio Locke. Pasado el tiempo de incubación, se lavan las células y se añade medio MEM fresco. La monocapa lesionada se incuba con esta dosis en tiempos 0 y 6 horas tras la realización de la lesión, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente en el punto 3.5.

Para los estudios de inmunocitoquímica recogemos las células a tiempos 0, 6, 10 y 24 horas tras la lesión y fijamos las mismas con PFA al 4 % (en el caso de Fibronectina, uPA y Faloidina) o con el Tampón A (100mM Pipes, MgCl₂ 0.5 mM, EGTA 0.1 mM, pH = 6.9) al que se le añade Formalina 3.7 %, Tritón X-100 0.2 % y Glycerol 2M para Vinculina. El resto de la inmunocitoquímica se realiza siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.4. Las células son tratadas con los anticuerpos primarios anti-Fibronectina (1:50), anti-uPA (1:50), anti-Vinculina (1:500) y anti-Faloidina (1:100) o PBS 1X BSA 3% para los controles negativos. El anticuerpo secundario empleado en todos los casos es goat anti mouse IgG-FITC (1:200). El montaje de los portas se realiza con el medio Vectashield.

Las células se observan bajo microscopio confocal Axiovert 200M, equipado con el módulo confocal LSM 5 Pascal. Todas las imágenes son tratadas con el software Pascal que acompaña al equipo.

3.10.- ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO DEL RECEPTOR P2Y₂.

3.10.1.- Clonaje y silenciamiento del receptor P2Y₂.

3.10.1.1.- Clonaje del receptor P2Y₂.

La falta de antagonistas selectivos que bloqueen la acción del receptor P2Y₂, nos ha llevado a investigar el papel del receptor P2Y₂ mediante el diseño de un siRNA capaz de eliminar la expresión de esta proteína en las células epiteliales corneales.

Para ello, lo primero que hemos realizado ha sido el clonaje del receptor P2Y₂ de conejo de la raza Nueva Zelanda, así como el diseño del siRNA contra el ARNm del mismo.

El ADNc para el receptor P2Y₂ de conejo ha sido clonado empleando una combinación de RT-PCR degenerada y una técnica de amplificación rápida de extremos del ADNc (RACE). El ARN total se extrae de las células epiteliales de cornea SIRC, empleando el kit RNeasy Mini siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. Para el diseño de oligonucleótidos degenerados se hizo una búsqueda de secuencias homólogas de los genes P2Y₂, en las bases de datos NCBI y EMBL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y <http://srs.ebi.ac.uk/>), se realizó el alineamiento de dichas secuencias mediante el programa informático ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y se buscaron zonas de secuencia conservada entre las diferentes especies estudiadas. Para la síntesis de la primera cadena de ADNc, 5 µg de ARN total se retrotranscriben mediante el kit SuperScript III Reverse Transcriptase y oligo(dT)₂₀. La reacción inicial de la PCR se realiza con un par de oligonucleótidos degenerados basados en dos regiones altamente conservadas de la secuencia del receptor P2Y₂ (Sentido, 5'-TGCAAGCTGGTGCGYTTTCCTYTTCTA-3' y Antisentido, 5'-AGYCTCTGCCCWGCCAGGAAGTAGAG-3'). La amplificación por PCR se realiza en un volumen de 50 µl con 2 µl de ADNc, Tampón PCR 1X, 2 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0.6 µM de cada oligonucleótido (Sentido y Antisentido) y 0.025U/µl de AmpliTaq Gold® DNA polymerase. Las condiciones de ciclación para la PCR son 95 °C 5 minutos; 5 ciclos de 95 °C 45 segundos, 72 °C 2 minutos; 5 ciclos

de 95 °C 45 segundos, 70 °C 45 segundos, 72 °C 2 minutos; y 25 ciclos de 95 °C 45 segundos, 64 °C 45 segundos, 72 °C 2 minutos.

Los productos de la PCR del tamaño esperado se purifican con el kit de extracción QIAGEN QIAquick en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5 %, se clonan y se secuencian. La identificación de clones de *E. coli* que presentaban dichas ligaciones, se realizó mediante PCR y digestión enzimática. La identificación mediante PCR se realizó a partir de colonias individuales de *E. coli* y utilizando los oligonucleótidos universales de M13 que flanquean el sitio de multiclonaje del vector pCR[®]2.1-TOPO[®]. En el caso de la identificación de clones mediante digestión enzimática, se utilizó ADN plasmídico aislado de colonias individuales (kit QuickLyse Miniprep) y la enzima de restricción EcoRI. Las condiciones de digestión fueron las recomendadas por Promega. La secuenciación del ADN se ha realizado en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid-Universidad Complutense. La secuencia de nucleótidos obtenida se compara con otras secuencias en el GenBank mediante el programa BLAST. Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos se realizan con el programa Clustal W2 program (Larkin et al., 2007). Tras la secuenciación, se sintetiza un nuevo par de oligonucleótidos (Sentido, 5'- TCAACGAGGACTTCAAGTAYGT-3' y Antisentido, 5'- CTGATACAAGTGAGGAAGAGGAT-3'), que se emplean para obtener información de secuencia contigua a la obtenida. La amplificación por PCR de estos nuevos productos se lleva a cabo en un volumen final de 50 µl empleando las mismas concentraciones de reactivos que las descritas para la primera amplificación, solo que en este caso la concentración de cada oligonucleótidos empleados es 0.4 µM. Las condiciones de ciclación para esta PCR son 95 °C 5 minutos; 10 ciclos de 95 °C 45 segundos, 60 °C 45 segundos (-1°C/ciclo), 72 °C 1 minuto; 30 ciclos de 95 °C 45 segundos, 50 °C 45 segundos, 72 °C 1 minuto; y 1 ciclo de 72 °C 7 minutos.

Para la obtención del extremo 5' de la secuencia codificante del ADNc del receptor P2Y₂ de conejo, se ha usado el kit FirstChoice RLM-RACE. Brevemente, 10 µg de ARN total son defosforilados, decapados y ligados al adaptador 5' RACE. El ARN-ligado se transcribe de forma reversa con random hexameros y se amplifica mediante una PCR anidada. El primer ciclo de PCR se lleva a cabo con un oligonucleotido Antisentido específico del receptor P2Y₂ de conejo (5'-

AGTGGTCGCGGGCGTAGTAG-3´) y un oligonucleótido Sentido que reconoce la secuencia del adaptador empleado incluido en el kit. 1 µl de los productos de PCR obtenidos se emplea como molde para una segunda vuelta de la PCR. Esta segunda PCR se realiza con un nuevo oligonucleótido Antisentido específico del receptor P2Y₂ de conejo (5´-ACACGGCCAGGTGGAACATGTA-3´) y un oligonucleótido Sentido que reconoce la secuencia del adaptador interno incluido en el kit. De nuevo, los productos de la PCR del tamaño esperado se purifican en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5 %, se clonan y se secuencian. La secuencia de nucleótidos obtenida se compara con otras secuencias en el GenBank mediante el programa BLAST. Los alineamientos de la secuencia de aminoácidos se realizan con el programa Clustal W2 program (Larkin et al., 2007).

3.10.1.2.- Cultivo de *E. coli*, aislamiento de ADN plasmídico, electroforesis y purificación de fragmentos de ADN y digestiones y modificaciones de fragmentos de ADN.

La estirpe DH5α de *Escherichia coli* ha sido utilizada para ser transformada y ser vehículo de clonación de las distintas construcciones generadas en vectores. *E. coli* DH5α se cultiva en medio Luria-Bertani (LB) líquido y medio LB sólido a 37 °C y con agitación. Posteriormente, los cultivos son conservados a -20 °C en medio LB-Glicerol. Ligación y transformación de los mismos

Los fragmentos de ADN fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa con un contenido en bromuro de etidio de 0.1 µg/ml, en tampón TAE a un voltaje constante de 70v. A continuación purificamos la secuencia empleando el Kit de extracción QIAquick gel extraction kit, siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.

Una vez purificados los fragmentos se produce la ligación de los mismos en bacterias competentes para la amplificación de los mismos empleando el TOPO TA cloning kit como hemos mencionado previamente. A continuación se purifica el plásmido con el inserto mediante el Quicklyse Miniprep kit, siguiendo las instrucciones del mismo. A continuación se produce la digestión de los fragmentos empleando el

enzima de restricción EcoRI. La digestión de ADN se realiza siguiendo las condiciones recomendadas por la casa suministradora de las distintas enzimas de restricción empleadas. Tras la digestión, los vectores empleados en la construcción son defosforilados previamente a la ligación con los insertos. La defosforilación se lleva a cabo durante 2 horas a 37 °C con fosfatasa alcalina que posteriormente se inactiva por calor (65 °C durante 15 minutos).

La concentración de ADN se determina para realizar las ligaciones inserto-vector, necesarias para crear las distintas construcciones utilizadas en este trabajo así como para la secuenciación tanto de productos de PCR como de las nuevas construcciones generadas. La determinación se realizó mediante el sistema PicoGreen® dsDNA Quantitation realizando las medidas fluorescentes en un espectrofluorímetro de luminiscencia con unas longitudes de onda de 480λ y 520λ, respectivamente. La curva patrón se obtuvo de una solución de DNA λ estandar, de 2 μg/ml, mediante diluciones de TE (curva entre 1-700 pmol/ml).

3.10.1.3.- Silenciamiento del receptor P2Y₂.

Para el diseño del duplex de ARN (siRNA) específico para el receptor P2Y₂ de conejo, la secuencia codificante del mismo (**número de acceso del GenBank EU886321**) se introduce en la web de Ambion para realizar la búsqueda de secuencias diana de los siRNA (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html). Esta herramienta considera una serie de criterios empíricos como son: 1) los nucleótidos con los que se inicia la secuencia del oligonucleótido (que sugiere que empiece por AA, y si no puede ser, por GA CA o TA), 2) la secuencia diana del ARNm equivale al dsRNA (que preferiblemente se sitúe en el marco de lectura abierto), 3) el contenido en GC (recomienda que sea entre 32 y 53 %), y 4) el análisis comparativo mediante BLAST que evita secuencias similares. Finalmente el programa hace un listado de las zonas más idóneas para garantizar el funcionamiento del dúplex de ARN interferente de pequeño tamaño (siRNA). Dos secuencias de las nueve encontradas (máximo contenido en GC del 60%) fueron las seleccionadas y sintetizadas. Las secuencias nucleotídicas de las dianas siRNA seleccionadas son las siguientes:

P2Y₂ siRNA #1, 5'-AATGAGGACTTCAAGTACGTG-3' (nucleotidos 82-103).

P2Y₂ siRNA #2, 5'-AACCTGTACTGCAGCATCCTC-3' (nucleotidos 346-367).

Ambos siRNAs se han obtenido de Applied Biosystems, de forma liofilizada y anillada, y se han resuspendido en agua libre de RNasas/ NaCl 0.9 % antes de su uso.

3.10.2.- Estudios *in vitro*.

3.10.2.1.- Transfección del siRNA para el receptor P2Y₂ en las células SIRC.

3.10.2.1.1.- Validación del método de transfección.

El método de transfección se ha llevado a cabo como lo describe Ambion y empleando el reactivo siPORT NeoFX, y preparando los complejos de transfección en medio sin suero Opti-MEM I. La validación del método de transfección y la determinación de las condiciones óptimas de trabajo se ha realizado en las células SIRC y con un siRNA no silenciador marcado con Cy3. Se ha validado tanto la concentración de reactivo de transfección empleado como el número de células a transfectar, llegando a unas condiciones óptimas de 50000 células y 3 µl de agente de transfección siPORT NeoFX.

Pasado el tiempo de incubación, para evaluar la eficiencia de transfección realizamos las siguientes pruebas:

1) Las células SIRC se incuban durante 24 horas con 30 nM de siRNA Cy3 y observamos la fluorescencia en las células vivas y también en células fijadas con PFA al 4 % en PBS 0.15M, las cuales incubamos con el reactivo PicoGreen a dilución 1:200 durante 10 minutos y observamos la fluorescencia bajo microscopio confocal Axiovert 200M, equipado con el módulo confocal LSM 5 Pascal.

2) Estudiamos la viabilidad celular de las diferentes transfecciones mediante el método del Azul Tripán. Para ello, una vez tripsinizadas las células, las resuspendemos en 50 µl

de medio Locke al que le añadimos 50 μ l de Azul Tripán, incubamos 10 minutos y contamos las células viables y las totales empleando la cámara de Neubauer.

3.10.2.1.2.- Eficiencia de silenciamiento para el siRNA del receptor P2Y₂.

Una vez validado el protocolo de transfección, realizamos la transfección con el siRNA para el receptor purinérgico P2Y₂.

Preparamos una suspensión de células con 50000 células, y cinco concentraciones diferentes de los dos siRNA a testar (P2Y₂ siRNA #1 y P2Y₂ siRNA #2) (25 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM y 300 nM) preparadas en medio OPTI-MEM I, para estudiar cual es la concentración que produce el silenciamiento apropiado para nuestro ensayo. Una vez preparadas las células y el siRNA, se realiza la transfección siguiendo el protocolo descrito por la casa Ambion para el agente de transfección siPORT NeoFX. Mezclamos suavemente e incubamos en la estufa de cultivos a 37 °C 24 h 37 °C, 5 % CO₂ y una humedad del 95 %.

Una vez comprobada que la concentración de ambos siRNA para el receptor P2Y₂ más efectiva es es 300nM, evaluamos el silenciamiento a las 72 horas de la transfección mediante un ensayo de inmunocitoquímica, en el cual vamos a tener dos condiciones, por un lado el control con el agente de transfección siPORT NeoFX y por otro, el siRNA para el receptor P2Y₂. Pasado ese tiempo de incubación, fijamos las células con PFA al 4 % en PBS 0.15M durante 15 minutos a temperatura ambiente y seguimos el protocolo de inmunocitoquímica descrito anteriormente. Las células son incubadas a 4 °C durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-P2Y₂ en dilución 1:50 o PBS 1X BSA 3 % para los controles negativos. El anticuerpo secundario empleado en todos los casos es donkey anti goat IgG-FITC (1:200), e incubamos 1 hora a temperatura ambiente. El montaje de los portas se realiza con el medio Vectashield con DAPI. Finalmente, la observación de los resultados se realiza mediante microscopía confocal empleando el Zeiss Axiovert 200M, equipado con el módulo confocal LSM 5 Pascal.

3.10.2.2.- Ensayo de migración en presencia de siRNA frente al receptor P2Y₂.

Todas las validaciones anteriores nos han llevado a determinar que la concentración de siRNA para el receptor P2Y₂ idónea para la transfección es 300 nM.

Realizamos la transfección con las dos secuencias de siRNA para el receptor P2Y₂ (P2Y₂ siRNA #1 y P2Y₂ siRNA #2) de la forma descrita en el punto anterior y pasadas 72 horas de la misma, cuando las células están al 100 % de confluencia, realizamos el ensayo de migración siguiendo el protocolo habitual. Tras lesionar la monocapa con una punta de pipeta p10, tratamos las lesiones con Ap₄A 100 µM en medio Locke durante 2 minutos (los controles se incuban durante ese periodo de tiempo con medio Locke). Pasado ese tiempo añadimos medio MEM completo fresco. La monocapa lesionada se incuba con esta dosis en tiempos 0 y 6 horas tras la realización de la lesión, siguiendo el mismo protocolo de aplicación descrito anteriormente. Se toman imágenes cada dos horas durante el periodo de tiempo de 10 horas tras la realización de la lesión, y posteriormente a las 24 horas. El área de las lesiones se determina con el software LSM 5 Pascal. En el tiempo que hay entre medida y medida del área, las células se mantienen en la estufa de cultivos a 37 °C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad.

Las condiciones en las cuales testamos la velocidad de migración son las siguientes (n = 4 para cada condición):

- 1) Control transfectado con el reactivo siPORT NeoFX.
- 2) Control transfectado con el reactivo siPORT NeoFX y tratado con Ap₄A 100 µM.
- 3) Células transfectadas con siRNA #1 para P2Y₂.
- 4) Células transfectadas con siRNA #1 para P2Y₂ y tratado con Ap₄A 100 µM.
- 5) Células transfectadas con siRNA #2 para P2Y₂.

6) Células transfectadas con siRNA #2 para P2Y₂ y tratado con Ap₄A 100 μM.

3.10.3.- Estudios *in vivo*.

3.10.3.1.- Validación del silenciamiento del receptor P2Y₂ *in vivo*.

3.10.3.1.1.- RT-PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCRq).

Para validar la eficiencia del siRNA y su efecto sobre su diana, se realizan medidas de reducción de los niveles para el ARNm del receptor P2Y₂ realizando ensayos de RT-PCRq.

Instilamos durante cuatro días consecutivos alícuotas del siRNA #2 a dosis 10 nM en un volumen de 40 μl de NaCl 0.9 %. Las muestras se recogen 48, 72 y 96 horas después de la primera instilación del siRNA. Para esta recolección de estas muestras se realizan Citologías de Impresión. Para ello, tras la instilación de anestésia tópica (0.4 % oxibuprocaina y 1 % tetracaina), se coloca sobre la zona central de la cornea un disco de 5 mm de diámetro de acetato de celulosa y se somete a una leve presión durante 15 segundos para asegurarnos que recogemos el mayor número de células posible. Inmediatamente se transfiere el disco con la muestra celular a un tubo que contiene 350 μl de reactivo para extracción de ARN (RNeasy Mini Kit), y se guardan las muestras a -80 °C hasta su posterior utilización.

Tras descongelar las muestras y agitarlas en el vortex para su homogeneización, la extracción del ARN se realiza siguiendo el protocolo de QIAGEN para el Kit RNAeasy Mini. Para evitar la contaminación con ADN genómico se realiza un paso de digestión del ADN en columna.

Para la síntesis de ADN, 30 μl de ARN total se retrotranscribe empleando el kit High Capacity cDNA RT. La cuantificación relativa de la expresión génica se lleva a cabo en triplicado mediante RT-PCR a tiempo real en el sistema ABI Prism 7300 Real-Time PCR utilizando el kit Quantitect SYBR Green siguiendo las instrucciones de la casa comercial QIAGEN para condiciones de ciclación: un paso de activación a 95 °C

15 minutos; repetición de 40 ciclos de desnaturalización / anillamiento y extensión a 94 °C 15 segundos, 60 ° C 30 segundos y 72 ° C 30 segundos; seguido de la curva de disociación a 95 ° C 15 segundos, 60 °C 30 segundos y 95 °C 15 segundos.

Los siguientes oligonucleótidos específicos para el receptor P2Y₂ se diseñaron para la amplificación por PCR a tiempo real:

P2Y₂ Oligonucleótido Sentido: 5'- TGGAGCCGTCTCTAACCCCTGA-3'.

P2Y₂ Oligonucleótido Antisentido: 5'- GCTGGCACGCTGAACCAGTA-3'.

El nivel de ARNm para P2Y₂ se normaliza con el gen control HPRT1, empleando los oligonucleótidos con la siguiente secuencia:

HPRT1 Oligonucleótido Sentido: 5'- CTGGCAAACAATGCAGACCT-3'.

HPRT1 Oligonucleótido Antisentido: 5'- GTCCTTTTCACCAGCAGGCTT-3'.

Para calcular el porcentaje de ARNm para P2Y₂ restante se emplea el método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

3.10.3.1.2.- Inmunohistoquímica para P2Y₂.

Para estudiar el silenciamiento del receptor P2Y₂ mediante el empleo del siRNA #2, realizamos un ensayo en el cual vamos a lesionar las corneas de los conejos siguiendo el protocolo siguiente:

Instilamos durante tres días consecutivos (a la misma hora, 10:00 horas de la mañana), alícuotas del siRNA a dosis 10 nM en un volumen de 40 µl de NaCl 0.9 % (ver esquema siguiente), y a las 22:00 horas del tercer día de instilación lesionamos las corneas empleando discos de papel Whatman n° 1 de 5 mm de diámetro, empapados en n-heptanol y colocado sobre la superficie corneal durante 30 segundos.

Esperamos 10 horas (lo que *in vivo* corresponde con la fase de latencia), y a las 8:00 horas del cuarto día de ensayo, volvemos a instilar el siRNA para P2Y₂ en dosis 10 nM en 40 µl de NaCl 0.9 %, y comenzamos con las instilaciones de Ap₄A 100 µM cada seis horas (ver esquema) hasta el tiempo máximo de las 36 horas posteriores a la lesión (ver esquema).

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
00:00					
02:00					Ap ₄ A
04:00					
06:00					
08:00				Lesión 12 h siRNA Ap ₄ A para 24 y 36 h	Ap ₄ A
10:00	siRNA	siRNA	siRNA		Sacrificar conejo 36 h, enuclear y fijar PFA
12:00					
14:00				Ap ₄ A para 24 y 36 h	
16:00					
18:00				Ap ₄ A para 12 h Ap ₄ A para 24 y 36 h	
20:00				Sacrificar conejo 12 h, enuclear y fijar en PFA	
22:00			Lesión 24 y 36 h	Sacrificar conejo 24 h, enuclear y fijar en PFA	
24:00					

Las condiciones control y Ap₄A, comienzan con la lesión el Día 3 a las 22:00h, siguiendo el día 4 con las instilaciones de NaCl 0.9 % y Ap₄A respectivamente, hasta el momento del sacrificio y enucleación de los ojos.

A los tiempos de 12, 24 y 36 horas sacrificamos los animales con una sobredosis de Propofol-Lipuro 1 %, enucleamos los ojos, diseccionamos las corneas y las fijamos en PFA 4 % a 4 °C durante unas 6 horas aproximadamente, y procedemos a la inclusión en Jung Tissue medio de criomontaje, y con el criostato Leica CM1850 realizamos secciones de 10 µm de grosor en portas gelatinados.

Una vez tenemos los cortes, procedemos a bloquear las uniones inespecíficas con la solución de bloqueo (PBS 1x BSA 3 %, Triton X-100 1 %, FBS 5 %), incubando con ella 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizan dos lavados con PBS 1x BSA 3 % de 5 minutos cada uno, e incubamos con el anticuerpo primario anti-P2Y₂ 1:50 o PBS 1x BSA 3 % en el caso de los controles negativos. Este anticuerpo se incubaba toda la noche a 4 °C en atmósfera húmeda y oscuridad. Finalizada la incubación, lavamos las células con PBS 1x BSA 3 % durante 10 minutos, y repitiéndolo tres veces, realizando posteriormente la incubación con el anticuerpo secundario donkey anti-goat anti Ig-G FITC) en dilución 1:200. Finalmente, montamos los portas con medio de montaje Vectashield con DAPI, y observamos los resultados mediante microscopía confocal empleando el Zeiss Axiovert 200M, equipado con el módulo confocal LSM 5 Pascal.

3.10.3.2.- Ensayos de migración en presencia de siRNA frente al receptor P2Y₂.

Para estudiar el efecto que la instilación del siRNA para el receptor P2Y₂ tiene en la migración del epitelio corneal lesionado en corneas completas en conejos vivos, realizamos un ensayo de migración celular para Ap₄A 100 µM in vivo tras la instilación del siRNA P2Y₂ #2.

Los protocolos de instilación del siRNA para P2Y₂ y de lesión corneal son los mismos que los descritos en el apartado anterior.

Las tres condiciones de lesiones en las que vamos a estudiar la velocidad de migración son:

- 1) Control con NaCl 0.9 %.
- 2) Ap₄A 100 μM.
- 3) siRNA para P2Y₂ + Ap₄A 100 μM.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
00:00				
02:00				
04:00				
06:00				
08:00				siRNA/Ap ₄ A/foto
10:00	siRNA	siRNA	siRNA	foto
12:00				foto
14:00				Ap ₄ A/foto
16:00				foto
18:00				foto
20:00				Ap ₄ A/foto
22:00			Lesión	
24:00				

Las condiciones control y Ap₄A, comienzan con la lesión el Día 3 a las 22:00h, siguiendo el día 4 con las instilaciones de NaCl 0.9 % y Ap₄A respectivamente junto con la toma de imágenes.

El ensayo de migración lo realizamos en el periodo de tiempo comprendido entre las 10 y las 24 horas posteriores a la lesión. Empleando la lámpara de hendidura Topcon SL-8Z y el software IMAGEnet 2000 asociado, estudiamos el desarrollo de las

lesiones, tomando imágenes cada 2 horas (desde las 10 horas de la lesión hasta las 22 horas de la misma).

3.11.- EFECTO DE LOS DINUCLEÓTIDOS EN LA ETAPA DE DIVISIÓN CELULAR.

3.11.1.- Estudio de la proliferación del epitelio corneal *in vitro*.

3.11.1.1.- Efecto de Ap₄A en la proliferación celular.

Para conocer si la activación por Ap₄A de las células epiteliales corneales lesionadas tiene alguna implicación en la fase de división celular, realizamos un ensayo de proliferación celular en células SIRC en placas de 96 pocillos (recubiertas con gelatina) empleando el kit CyQUANT[®] NF Cell Proliferation Assay.

Sembramos 10000 células / pocillo, y una vez están adheridas realizamos una incubación en medio MEM sin suero durante toda la noche para detener las células en la misma etapa del ciclo celular. A continuación comenzamos con los distintos tratamientos (n = 8 en cada caso):

- 1) Control (medio Locke).
- 2) Ap₄A 100 μM.
- 3) Suramina 100 μM + Ap₄A 100 μM.
- 4) AG1478 100 μM + Ap₄A 100 μM.
- 5) U0126 100 μM + Ap₄A 100 μM.
- 6) Y27632 100 μM + Ap₄A 100 μM.
- 7) Estaurosporina 1 μM + Ap₄A 100 μM.

8) Bisindolilmaleimida-I 10 μM + Ap_4A 100 μM .

9) U73122 3 μM + Ap_4A 100 μM .

10) U73343 3 μM + Ap_4A 100 μM .

Como en los ensayos de migración celular, pre-incubamos con los antagonistas e inhibidores a la concentración determinada en medio Locke durante un periodo de tiempo de 30 minutos (salvo el pre-tratamiento con U73122 y U73343 que es 10 minutos), y seguidamente incubamos las células con Ap_4A durante 2 minutos. Transcurrido ese tiempo, se lavan las células y se añade medio MEM completo fresco. La monocapa se incuba cada 6 horas hasta un periodo de tiempo de 36 horas, siguiendo el mismo protocolo de aplicación descrito para los ensayos de migración celular. En el tiempo que hay entre las distintas incubaciones, las células se mantienen en la estufa de cultivos a 37 °C, 5 % CO_2 y 95 % de humedad.

A las 24 y 36 horas del inicio de las incubaciones, medimos la proliferación celular para cada tratamiento. Para ello seguimos las indicaciones que nos indica Invitrogen en el Kit CyQUANT[®] NF Cell Proliferation Assay, y una vez hemos añadido los 100 μl de la solución fluorescente, incubamos 30 minutos a 37 °C y medimos la fluorescencia a tiempo final en el lector de placas Fluoroscanner ASCENT FL con el software ASCENT v 2.6 acoplado. La medida se lleva a cabo con una excitación a 485 nm y una detección de la emisión a 530 nm.

Los valores de proliferación vienen determinados en tanto por ciento en unidades arbitrarias de fluorescencia.

3.11.1.2.- Efecto de Ap_3A en la proliferación celular.

A parte de intentar conocer el papel de Ap_4A en la fase de división celular, estudiamos el papel de Ap_3A en la misma, realizando un ensayo similar al descrito en el punto anterior.

Sembramos 10000 células / pocillo, y una vez están adheridas realizamos el mismo procedimiento que el descrito para Ap₄A. A continuación comenzamos con los distintos tratamientos (n = 24 en cada caso), y realizamos el ensayo en placas de 96 pocillos recubiertas con gelatina:

- 1) Control (medio Locke).
- 2) Ap₃A 100 μM.
- 3) SB203580 100 μM + Ap₃A 100 μM.
- 4) U0126 100 μM + Ap₃A 100 μM.

Seguimos el mismo protocolo de actuación que el descrito para el estudio de proliferación con Ap₄A, siguiendo las instrucciones del kit CyQUANT[®] NF Cell Proliferation Assay, y realizando las medidas de fluorescencia a tiempo final en el lector de placas Fluoroscan ASCENT FL con el software ASCENT v 2.6 acoplado, con una excitación a 485 nm y una detección de la emisión a 530 nm.

Los valores de proliferación vienen determinados en tanto por ciento en unidades arbitrarias de fluorescencia.

3.11.1.3.- Efecto de la combinación de Ap₄A y Ap₃A en la proliferación celular.

Por último, estudiamos el efecto que la combinación de Ap₃A y Ap₄A tienen en la proliferación de las células epiteliales corneales. Para ello, realizamos un ensayo de proliferación celular en células SIRC en placas de 96 pocillos recubiertas con gelatina, las cuales tratamos con una concentración fija de Ap₃A o Ap₄A y concentraciones crecientes del dinucleótidos contrario como indicamos a continuación. Sembramos 10000 células / pocillo, y una vez están adheridas realizamos una incubación en medio MEM sin suero durante toda la noche para detener las células en la misma etapa del ciclo celular. A continuación comenzamos con los distintos tratamientos (n = 8 en cada caso):

- 1) Control (medio Locke).
- 2) Ap₄A 100 μM + Ap₃A 0.1 μM.
- 3) Ap₄A 100 μM + Ap₃A 1 μM.
- 4) Ap₄A 100 μM + Ap₃A 10 μM.
- 5) Ap₄A 100 μM + Ap₃A 100 μM.
- 6) Ap₄A 100 μM + Ap₃A 1 mM.
- 7) Ap₃A 100 μM + Ap₄A 0.1 μM.
- 8) Ap₃A 100 μM + Ap₄A 1 μM.
- 9) Ap₃A 100 μM + Ap₄A 10 μM.
- 10) Ap₃A 100 μM + Ap₄A 100 μM.
- 11) Ap₃A 100 μM + Ap₄A 1 mM.

En este caso, pre-incubamos con el dinucleótido a concentración 100 μM durante un tiempo de 2 minutos, y a continuación incubamos con las concentraciones seriadas del otro dinucleótido durante 2 minutos. Transcurrido ese tiempo, se lavan las células y se añade medio MEM completo fresco. La monocapa se incuba cada 6 horas hasta un periodo de tiempo de 36 horas, siguiendo el mismo protocolo de aplicación descrito anteriormente.

De nuevo, a las 24 y 36 horas del inicio de las incubaciones, medimos la proliferación celular para cada tratamiento. Para ello seguimos las indicaciones que nos indica el fabricante en el Kit CyQUANT[®] NF Cell Proliferation Assay, y una vez

hemos añadido los 100 μ l de la solución fluorescente, incubamos 30 minutos a 37 °C y medimos la fluorescencia a tiempo final en el lector de placas Fluoroscan ASCENT FL con el software ASCENT v 2.6 acoplado, y realizando las medidas con una excitación a 485 nm y una detección de la emisión a 530 nm.

Los valores de proliferación vienen determinados en tanto por ciento en unidades arbitrarias de fluorescencia.

3.11.2.- Estudio de proliferación del epitelio corneal mediada por Ap₄A *in vivo*. RT-PCR cuantitativa para CCNE1 y CDK2.

Para verificar la implicación del sistema Ap₄A / P2Y₂ en la etapa de proliferación tras una lesión en el epitelio corneal *in vivo*, vamos a estudiar la activación del sistema CCNE1 / CDK2 (Ciclina E1 / Quinasa dependiente de Ciclina 2), un sistema implicado en el paso de fase G1 a fase S del ciclo celular, en lesiones tratadas con Ap₄A tanto en presencia como en ausencia del siRNA para el receptor P2Y₂.

Como en el caso del ensayo de migración, instilamos durante tres días consecutivos (a la misma hora, 10:00 horas de la mañana), alícuotas del siRNA a dosis 10 nM en un volumen de 40 μ l de NaCl 0.9 %, y a las 22:00 horas del tercer día de instilación lesionamos las corneas empleando discos de papel Whatman n° 1 de 5 mm de diámetro, empapados en n-heptanol y colocado sobre la superficie corneal durante 30 segundos. De nuevo, tras las 10 horas que dura la fase de latencia *in vivo*, volvemos a instilar el siRNA para P2Y₂ en dosis 10 nM en 40 μ l de NaCl 0.9 %, y comenzamos con las instilaciones de Ap₄A 100 μ M cada seis horas (ver esquema) hasta el tiempo máximo de 36 horas posteriores a la lesión.

Las tres condiciones de lesiones en las que vamos a estudiar la activación de estas proteínas son:

- 1) Control con NaCl 0.9 %.
- 2) Ap₄A 100 μ M o Ap₃A 100 μ M.

3) siRNA para P2Y₂ + Ap₄A 100 μM o siRNA para P2Y₂ + Ap₄A 100 μM.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
00:00					
02:00					Ap ₄ A o Ap ₃ A
04:00					
06:00					
08:00				siRNA/Ap ₄ A o Ap ₃ A	Ap ₄ A o Ap ₃ A
10:00	siRNA	siRNA	siRNA		Citología Impresión 36h
12:00					
14:00				Ap ₄ A o Ap ₃ A	
16:00					
18:00					
20:00				Ap ₄ A/ o Ap ₃ A	
22:00			Lesión	Citología Impresión 24h	
24:00					

Las condiciones control, Ap₄A y Ap₃A, comienzan con la lesión el Día 3 a las 22:00h, siguiendo el día 4 con las instilaciones de NaCl 0.9 %, Ap₄A o Ap₃A respectivamente junto con la recogida de las muestras.

A las 24 y 36 horas posteriores a la lesión (72 y 96 horas posteriores a la primera instilación del siRNA), realizamos una citología de impresión de la misma manera que la realizada para ver la expresión del P2Y₂, y se procede a la extracción del ARN total empleando el Kit RNeasy Mini siguiendo el protocolo descrito por QIAGEN, y para evitar la contaminación con ADN genómico se realiza un paso de digestión del ADN en columna.

Como en el caso de del estudio de expresión para P2Y₂, 30 µl de ARN total se retrotranscribe empleando el kit High Capacity cDNA RT. La cuantificación relativa de la expresión génica se lleva a cabo en triplicado mediante RT-PCR a tiempo real en el sistema ABI Prism 7300 Real-Time PCR utilizando el kit Quantitect SYBR Green siguiendo las instrucciones de la casa comercial QIAGEN. Los siguientes oligonucleótidos específicos para el CCNE1 y CDK2 se diseñaron para la amplificación por PCR a tiempo real:

CCNE1 Oligonucleótido Sentido: 5'-CAGGTTGCGTACCTGAATGA-3'.

CCNE1 Oligonucleótido Antisentido: 5'-CGACATCCAGGACACAGAGA-3'.

CDK2 Oligonucleótido Sentido: 5'-GGTCCTGCACCGAGATCTAA-3'.

CDK2 Oligonucleótido Antisentido: 5'-ACCACCTCGTGGGTGTAAGT-3'.

El nivel de ARNm para estas proteínas se normaliza con el gen control HPRT1, empleando los oligonucleótidos ya descritos en el punto 3.10.3.1.1.

Las condiciones de ciclación para la PCR son las mismas descritas en el punto 3.10.3.1.1. y son las que define QIAGEN para el kit Quantitect SYBR Green.

Para calcular el porcentaje de ARNm para P2Y₂ restante se emplea el método Pfaffl (Pfaffl, 2001).

3.12.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.

ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR:

La disminución del área lesionada durante el proceso de migración celular, es un proceso no lineal y por tanto, para determinar esta disminución empleamos una modificación del estudio de la velocidad constante descrito previamente (Crosson et al., 1986). La migración se determina por regresión lineal del descenso de área lesionada

durante las 10 primeras horas de medición, y se obtiene de la pendiente de la recta de regresión, expresándose como Δ descenso de área por hora. El tiempo total de cierre de la lesión se calcula mediante extrapolación de la recta de regresión en el eje del tiempo, cuando el área lesionada equivale a 0.

La velocidad de migración, expresada como Velocidad Estimada de Migración (VEM), y el tiempo que tarda la herida en cerrar, denominado Tiempo Estimado de Re-epitelización (TER), tanto en lesiones control como tratadas, se comparan empleando el test estadístico de one-way ANOVA. Los valores los expresamos como media \pm S.E.M (error estándar de la media). El nivel de significancia para las diferencias está indicado en cada caso.

Cuando representamos la regresión lineal del descenso de área lesionada, normalizamos los resultados en relación al valor de 100% equivalente al área medido al inicio del ensayo (tiempo 0 horas), para normalizar la variabilidad en las lesiones entre un pocillo y otro, así como entre los diversos ensayos realizados, siguiendo la estrategia de otros autores (Desai et al., 2004). Las variaciones de VEM se expresan como % descenso de área $\cdot h^{-1}$, y todos los datos se expresan en relación a los datos control para minimizar las variaciones intrínsecas debidas al sistema.

ANÁLISIS DE DINUCLEÓTIDOS POR HPLC:

Para calcular la concentración de dinucleótidos tras su análisis por HPLC, los picos que se obtienen se transforman en concentraciones gracias a la comparación con controles estándar externos para diadenosina polifosfatos de concentración conocida. Además, para conocer la evolución de la concentración de Ap₄A en corneas lesionadas, debemos tener en cuenta tanto el volumen inyectado para su análisis por HPLC como los valores de secreción lagrimal.

ENSAYOS DE WESTERN BLOT:

Para representar los resultados de los ensayos de Western Blot para pERK1/2, ROCK-I, pp38 y pMLC2, tras el análisis densitométrico de las bandas (en el sistema de

imágenes Kodak Gel Logic 200 acoplado al Kodak molecular image software), la intensidad de banda se relativiza en función a los valores de ERK2, p38 o MLC2 respectivamente. Las variaciones de intensidad se expresan como intensidad de señal en % en relación al control y se expresan como media \pm S.E.M, debido a que todos los resultados se refieren al control para minimizar las diferencias intrínsecas, de igual forma que en los ensayos de migración celular.

ANÁLISIS CUALITATIVO DE FLUORESCENCIA:

La distribución intracelular de pERK1/2 y ROCK-I se determina mediante la cuantificación densitométrica de la intensidad de señal para pERK1/2 y ROCK-I en el núcleo y en el citoplasma de varias imágenes (n = 4). En cada caso, los resultados se expresan como media \pm S.E.M y viene representada en unidades arbitrarias. La cuantificación densitométrica en este caso se realiza con el software del módulo confocal Pascal (LSM 5; microscopio Zeiss Axiovert 200M).

La cuantificación de la señal para el receptor P2Y₂ en los ensayos realizados con el siRNA para este tanto *in vivo* como *in vitro* se realiza mediante análisis densitométrico de la intensidad de la señal para P2Y₂ de la misma manera descrita en el párrafo anterior.

ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR:

Los resultados de cuantificación *in vitro* realizados con el Kit CyQUANT[®] NF Cell Proliferation Assay, realizamos la media de las medidas de los pocillos tratados con el mismo agonista / antagonista-inhibidor, y normalizamos en tanto por ciento en base a los resultados control (100 %) en ausencia de cualquier agonista o antagonista / inhibidor, y comparando los mismo mediante el test estadístico de one-way ANOVA.

ENSAYOS DE RT-PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL:

Para realizar la cuantificación relativa del nivel de ARNm para P2Y₂, CCNE1 y CDK2 en las corneas tratadas con Ap₄A, Ap₃A, y P2Y₂ siRNA en presencia de los

dinucleótidos con los niveles de ARNm en corneas control, se emplea el método Pfaffl (Pfaffl, 2001). Se preparan curvas estandar para P2Y₂, CCNE1, CDK2 y HPRT1 empleando diluciones seriadas de ADNc en función de su correspondiente Ct. La eficiencia de amplificación para todos los genes fue determinada, siendo la pendiente cercana a 2 en todos los casos (por ejemplo $E_{CCNE1} = 1.96$, $E_{HPRT1} = 2.09$). Controles en los cuales no se ha realizado la transcripción reversa se emplearon para descartar contaminación con ADN genómico. Por último, la generación de las curvas de melting confirma la presencia de un único producto específico y la ausencia de dímeros de oligonucleótidos.

Resultados

4.- RESULTADOS

4.1.- INMUNOCITOQUÍMICA PARA CITOQUERATINA 3.

Para confirmar que las células aisladas mediante el protocolo descrito para la realización del cultivo primario, son efectivamente células de epitelio corneal, realizamos un estudio inmunocitoquímico para citoqueratina 3. Esta proteína es un componente de los filamentos intermedios y es característica de las células epiteliales. Como se ha visto una expresión selectiva de esta proteína en córnea de varias especies y tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad del epitelio corneal, empleamos esta proteína como marcador para discriminar células epiteliales corneales (Schermer, 1986, Lu et al., 2001).

En la Figura 16A, observamos la morfología de las células aisladas vista bajo microscopía de Nomarski. Estas células aisladas tienen una morfología poligonal característica de las células epiteliales. Cuando estudiamos la señal del anticuerpo específico para Citoqueratina 3, vemos que todas las células de nuestro cultivo primario se marcan de forma positiva (marcaje de color verde) para esta proteína (Figura 16 B). El marcaje se localiza a lo largo de todo el citoplasma celular y se corresponde con la posición de los filamentos intermedios en las células. Cuando estudiamos los resultados de las células incubadas en ausencia del anticuerpo primario anti-citoqueratina 3 (control negativo), observamos que no existe señal fluorescente (Figura 16C).

Por tanto, podemos concluir, que las células aisladas en cultivo primario son con toda seguridad, células epiteliales de córnea y, es por ello que comenzamos a investigar en ellas el papel de diversos dinucleótidos extracelulares en el proceso de migración celular.

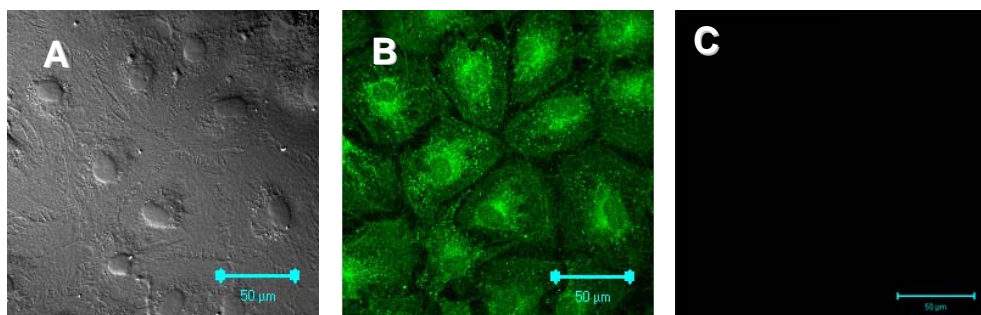


Figura 16: *Inmunocitoquímica para Citoqueratina 3 en cultivo de células de epitelio corneal de conejo. (A) Células de epitelio corneal de conejo mostrando la morfología poligonal bajo microscopía Nomarski (40X). (B) Marcaje celular con anti-citoqueratina 3 a lo largo de todo el citoplasma de la célula epitelial corneal (40X). (C) Control negativo.*

4.2.- EFECTO DE LOS DINUCLEÓSIDOS POLIFOSTATO Y NUCLEÓTIDOS EN EL PROCESO DE RE-EPITELIZACIÓN CORNEAL.

4.2.1.- Estudio de los distintos di- y mononucleótidos a concentración 100 µM.

Para conocer cual es el efecto que sobre la migración celular tienen los diversos dinucleósido polifosfatos (Ap_3A , Ap_4A , Ap_5A y Up_4U) y nucleótidos (ATP, UTP, ADP y UDP), empezamos ensayando estos a concentración 100 µM siguiendo el procedimiento descrito en Material y Métodos.

Cuando comparamos los resultados de las lesiones tratadas con las lesiones control, observamos la existencia de tres comportamientos diferentes en la migración celular de las células del epitelio corneal de conejo en cultivo:

1) Por un lado, encontramos que tres de los agonistas ensayados (**Ap_4A , ATP y UTP**) poseen la capacidad de acelerar la migración celular, por lo que producen un aumento en la velocidad estimada de migración (VEM) acompañado de un descenso en el tiempo estimado de reepitelización (TER) cuando lo comparamos con las lesiones control.

2) Otros tres agonistas (**Ap_3A , Ap_5A y UDP**) hacen el efecto opuesto, es decir, tienen la capacidad de frenar la migración, produciendo un descenso en la VEM con el consecuente aumento en el TER cuando lo comparamos con las lesiones control, y

3) Los otros dos agonistas restantes (**U_{p4}U** y **ADP**) no alteran la migración celular si lo comparamos con la migración en las lesiones control, es decir, presentan valores de VEM y de TER similares a los del control.

En la Figura 17A, encontramos una serie de imágenes en las que comparamos la migración de las lesiones control con la migración tras el tratamiento con Ap₄A, Ap₃A y ADP 100 μM, en distintos periodos de tiempo (0, 6 y 10 horas). Como podemos observar, la incubación con Ap₄A produce una aceleración del proceso de migración, reduciendo de forma significativa el tiempo necesario para cerrar completamente la lesión. Con Ap₃A ocurre lo contrario, es decir, aumenta significativamente el tiempo necesario para cerrar la lesión al frenarse la migración celular. Sin embargo, cuando incubamos con ADP, no observamos ninguna variación significativa en la migración celular si comparamos con la migración de las lesiones control.

Lo mismo podemos observar en la Figura 17B, donde encontramos la representación de la variación del área lesionada con el tiempo, tanto en las lesiones control como en las lesiones tratadas con Ap₄A, Ap₃A y ADP todos 100 μM.

Tanto en la Figura 18 como en la Tabla 6, encontramos los resultados en valores de VEM (Figura 18A) y de TER (Figura 18B) para todos los compuestos ensayados a la concentración 100 μM.

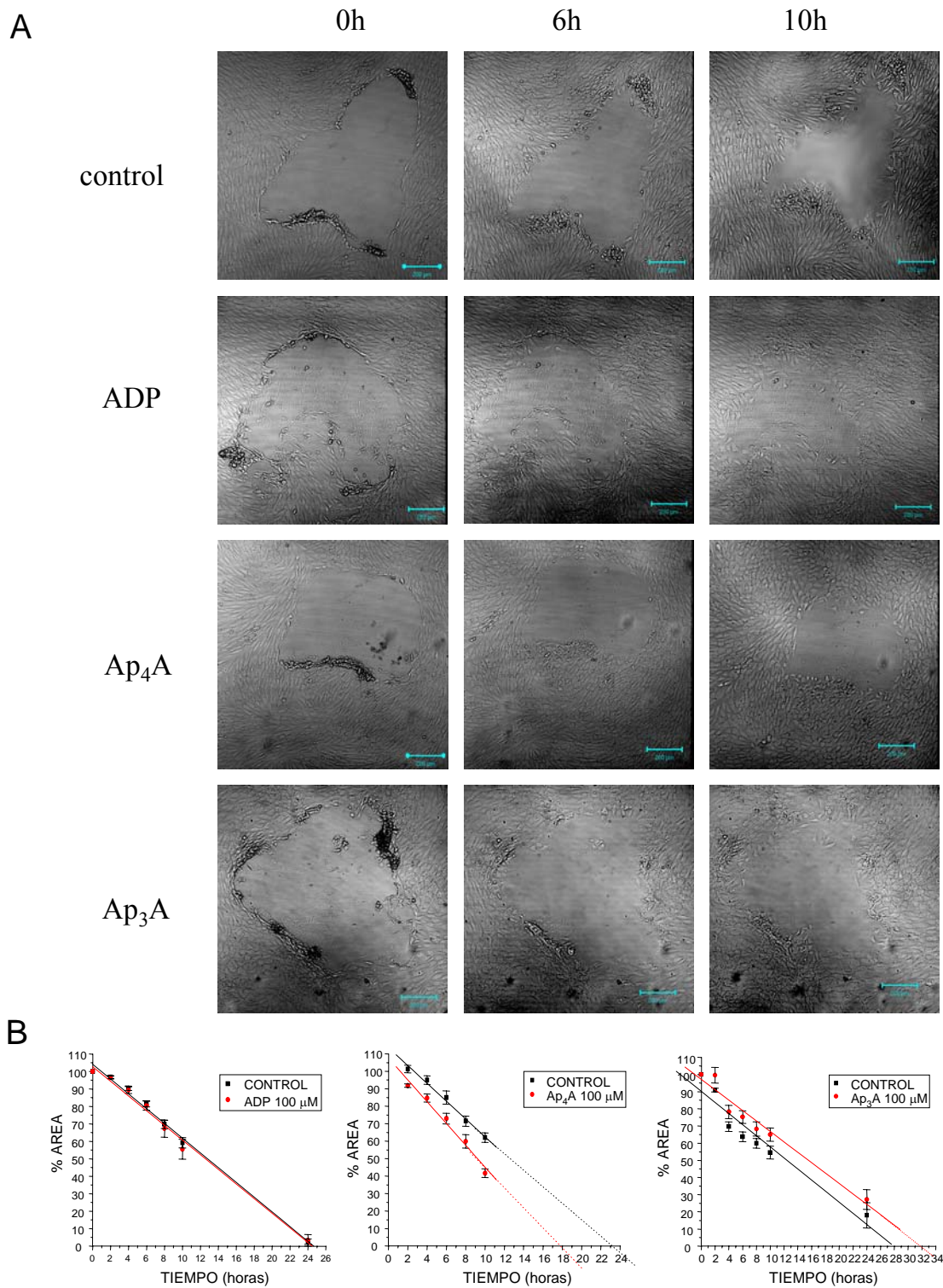
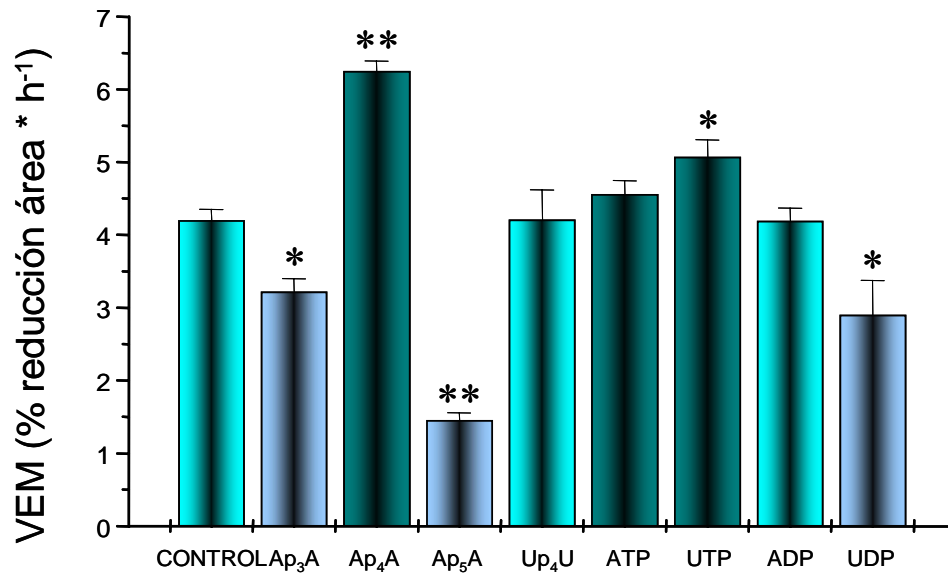


Figura 17: Ensayos de migración para Ap₄A, Ap₃A y ADP a concentración 100 μ M. (A) Imágenes del proceso de migración en monocapas en cultivo tomadas a tiempos 0, 6 y 10 horas en ausencia (Control) y presencia de ADP, Ap₄A y Ap₃A 100 μ M. (B) Gráficas representando la variación del área lesionada vs tiempo para ADP, Ap₄A y Ap₃A 100 μ M.

A



B

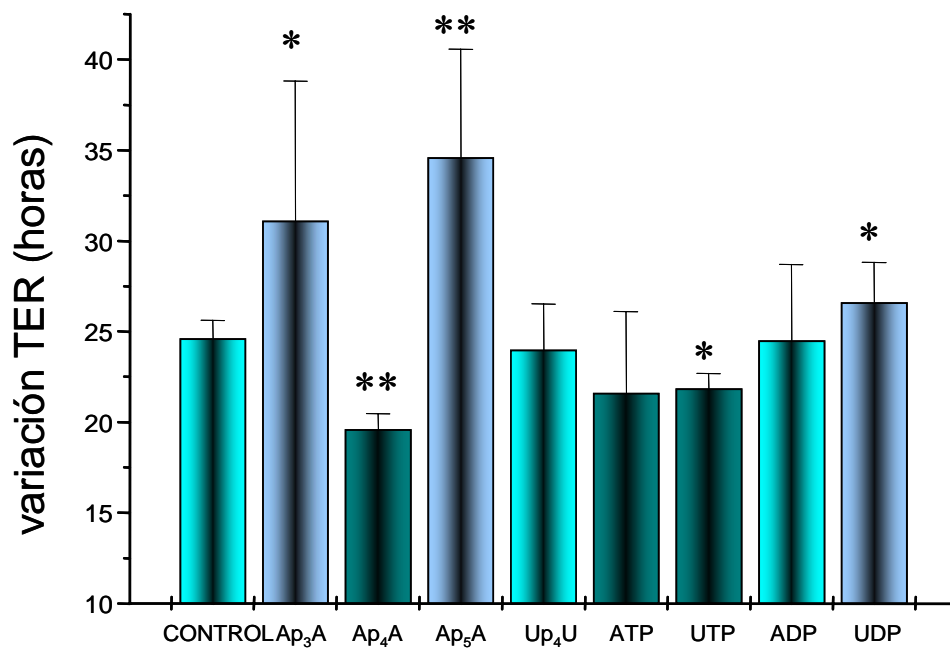


Figura 18: Resumen de los efectos de VEM y de TER para todos los compuestos estudiados a concentración 100 μM . (A) Valores de VEM en % reducción área $\cdot h^{-1}$ para los ocho agonistas testados. (B) variación de TER en horas para los mismos agonistas. Los valores vienen definidos como media \pm s.e.m. (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ vs. control).

COMPUESTO (100 μM)	VEM (% reducción área * h^{-1})	Δ EHT (- aceleración + retardo)
CONTROL	$4.20 \pm 0.15 \%$	0 h
Ap ₃ A	$3.83 \pm 0.18 \%^*$	+ 6.5 h
Ap ₄ A	$6.25 \pm 0.33 \%^{**}$	- 5 h
Ap ₅ A	$3.14 \pm 0.11 \%^{**}$	+ 10 h
Up ₄ U	$4.21 \pm 0.41 \%$	0 h
ATP	$4.56 \pm 0.09 \%$	- 3 h
UTP	$5.07 \pm 0.28 \%^*$	- 2.75 h
ADP	$4.19 \pm 0.18 \%$	0 h
UDP	$3.82 \pm 0.35 \%^*$	+ 2 h

Tabla 6: Valores de VEM y de TER para di- y mononucleótidos en el proceso de migración celular. Valores expresados como media \pm s.e.m. para ocho experimentos independientes. VEM calculado como % reducción área * h^{-1} . Para el TER: (+) representa el retraso en la migración con respecto a los valores control (expresados en horas) y, (-) representa la aceleración en el proceso de migración con respecto a los valores control (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ vs. control).

4.2.2.- Curvas concentración-respuesta para di- y mononucleótidos.

Conociendo los seis agonistas que modifican en algún sentido la migración celular en el epitelio corneal de conejo (Ap₄A, ATP y UTP, que aceleran de forma significativa la migración, y Ap₃A, Ap₅A y UDP, que tiene el efecto opuesto), hemos realizado ensayos de migración celular, incubando las células epiteliales lesionadas con diversas concentraciones (0.01 μM a 1mM) de cada uno estos agonistas, con la idea de generar las respectivas curvas de concentración-respuesta ($n = 8$ en cada caso).

En la Figura 19A, encontramos las curvas de concentración-respuesta en valores de VEM para aquellos compuestos que aceleran la migración celular (Ap₄A, ATP y UTP). La incubación del epitelio corneal con dosis graduales de Ap₄A y UTP, responde a un patrón sigmoide con valores pD_2 de 6.05 ± 0.49 y 5.97 ± 0.6 respectivamente (lo que corresponde a unos valores de EC_{50} de 0.89 μM para Ap₄A y 1.07 μM para UTP). Sorprendentemente, cuando estudiamos la concentración-respuesta para ATP, observamos con este mononucleótido sigue una respuesta en forma de cam

(Figura 19A): la exposición a bajas concentraciones de agonista ($1 \mu\text{M}$) está asociado con la máxima aceleración de la migración celular (valores pD_2 de 6), mientras que a altas concentraciones ($10 \mu\text{M}$ y 1mM) no se produce aceleración en la migración. Tan solo somos capaces de observar una cierta aceleración de la migración cuando incubamos las células con concentración $100 \mu\text{M}$ de ATP.

Cuando realizamos el mismo tipo de experimentos con los compuestos que tienen efecto retardante en la migración celular (Ap_3A , Ap_5A y UDP), encontramos curvas concentración-respuesta para VEM que siguen un comportamiento sigmoide en los tres casos (Figura 19B). Los valores pD_2 obtenidos son: 5.29 ± 1.5 para Ap_3A , 5.759 ± 0.09 para Ap_5A y 5.62 ± 0.97 para UDP , lo que resulta en valores EC_{50} de $5.13 \mu\text{M}$, $1.73 \mu\text{M}$ y $2.39 \mu\text{M}$ respectivamente.

En las Figuras 19C y 19D, encontramos las gráficas de concentración-respuesta para los valores de TER para cada uno de los compuestos estudiados. Para aquellos compuestos que aceleran VEM, observamos un descenso en TER, que en el caso de Ap_4A y UTP , sigue un proceso sigmoide, mientras que para ATP , tenemos una gráfica de concentración-respuesta donde a bajas concentraciones el TER disminuye, aumentando a concentraciones altas de ATP . En el caso de los compuestos que frenan la migración celular, encontramos de nuevo un comportamiento sigmoide en los tres casos (Ap_3A , Ap_5A y UDP).

Si nos basamos en los resultados de las curvas concentración-respuesta, es posible discriminar un orden de potencia de los compuestos estudiados que aceleran la migración: $\text{Ap}_4\text{A} > \text{UTP} > \text{ATP}$. De la misma forma, el rango de potencia de actuación de los compuestos que reducen la migración celular es el siguiente: $\text{Ap}_5\text{A} > \text{Ap}_3\text{A} \cong \text{UDP}$.

Estos perfiles farmacológicos nos sugieren la existencia de dos receptores purinérgicos diferentes en las células del epitelio corneal implicados en la migración celular: un receptor P2Y_2 implicado en la aceleración de la migración, y un receptor P2Y_6 que sería el responsable del retardo de la misma.

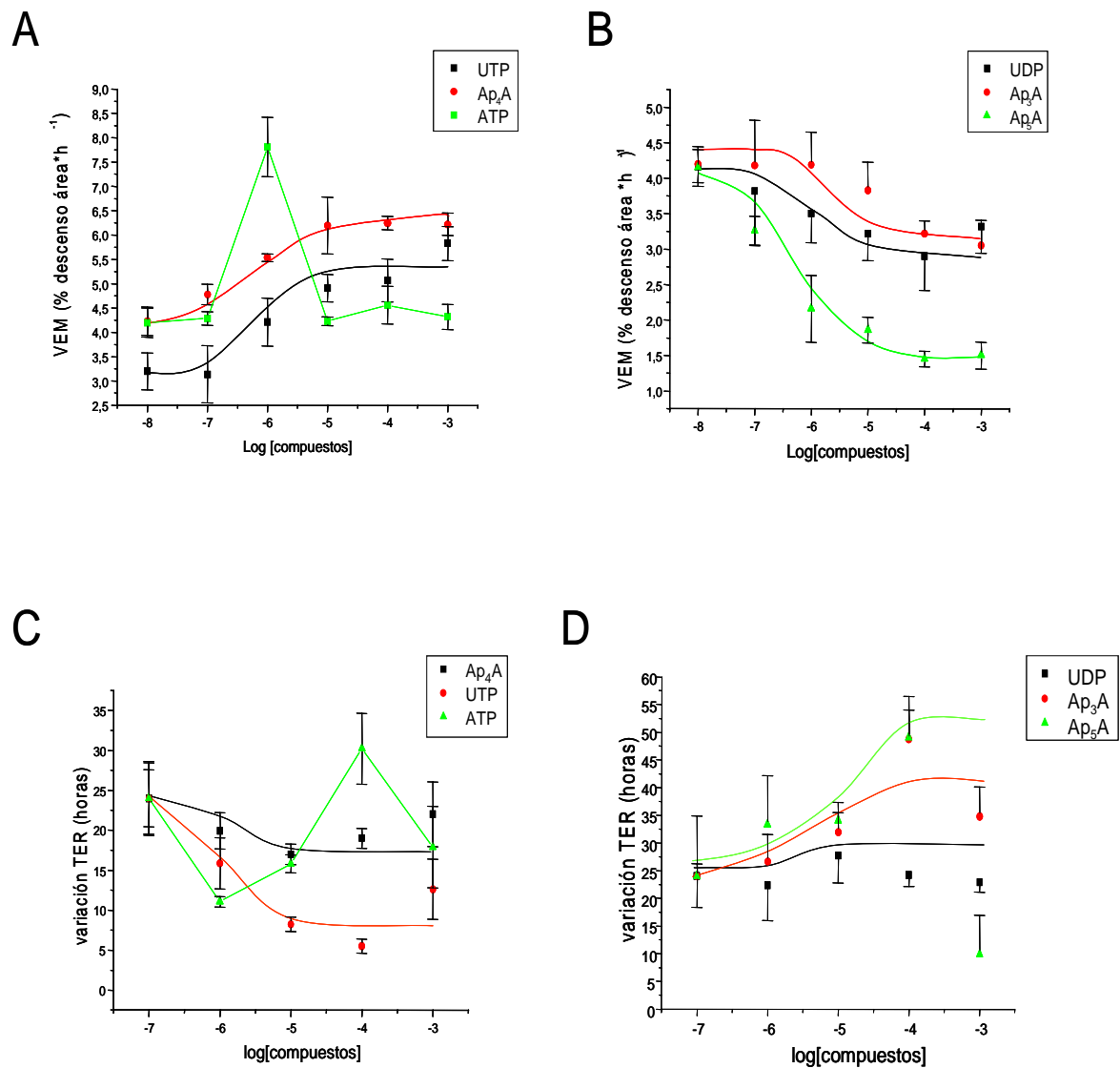


Figura 19: Curvas concentración–respuesta para di- y mononucleótidos en el rango de migración celular. (A) Curva concentración–respuesta para los valores de VEM de los tres agonistas que incrementan la migración celular (Ap_4A , ATP, y UTP). Ap_4A y UTP siguen un patrón sigmoide, mientras que ATP sigue un patrón de campana. (B) Patrón sigmoide de las curvas concentración–respuesta para VEM de los agonistas que frenan la migración celular (Ap_3A , Ap_5A , y UDP). (C) Perfil de las curvas concentración–respuesta para el TER de los agonistas que aceleran la migración celular. (D) Perfil de las curvas concentración–respuesta para el TER de los agonistas que retardan la migración celular.

4.3.- ESTUDIOS DE MIGRACIÓN CELULAR CON ANTAGONISTAS DE RECEPTORES P2.

Como acabamos de mencionar, el perfil farmacológico nos indica la presencia de dos receptores purinérgicos (P2Y₂ y P2Y₆) implicados en el proceso de migración del epitelio corneal. Para discriminar qué receptores purinérgicos son los que realmente están involucrados en ambos procesos, se han realizado ensayos con los antagonistas de los receptores purinérgicos suramina, Ácido 6-azofenil-2'4' disulfónico-piridoxalfosfato (PPADS) y reactivo azul 2 (RB-2).

A partir de ahora, los agonistas que vamos a emplear para los ensayos son: Ap₄A como agonista tipo de aceleración de la migración celular, y Ap₃A como agonista tipo del retardo en la misma (en base a la potencia retardante, deberíamos emplear Ap₅A, pero como hemos visto en algunos ensayos de migración que se produce muerte celular, nos decantamos por Ap₃A).

4.3.1.- Ensayos de migración con antagonistas de receptores P2 a concentración 100 μM.

Para conocer cual de los tres antagonistas mencionados es efectivo tanto en el caso de los agonistas que aceleran la migración, como en el caso de los que la frenan, comenzamos ensayando los tres antagonistas a concentración 100 μM en presencia de Ap₄A o Ap₃A (ambos a concentración 100 μM) (n = 8 cada uno), como hemos descrito en Material y Métodos.

Como observamos en la Figura 20A, la aplicación de una concentración 100 μM de suramina, PPADS y RB-2, revierte de forma significativa el efecto acelerador que Ap₄A tiene en la migración del epitelio corneal, observando como la VEM se reduce mientras que TER incrementa (Tabla 7). En esta reversión del efecto de Ap₄A, el antagonista más efectivo es la suramina.

Cuando realizamos el mismo tipo de ensayo en presencia de Ap₃A 100 μM, vemos como suramina es incapaz de revertir el efecto que produce este dinucleótido,

obteniendo valores de VEM y de TER similares a los obtenidos cuando tratamos las lesiones con Ap₃A solo (Figura 20B, Tabla 8). De forma sorprendente e inesperada, la aplicación de PPADS y RB-2 100 μ M potencian el efecto que Ap₃A tiene en la migración celular (siendo más potente RB-2), ya que obtenemos valores inferiores de VEM, aumentando consecuentemente el tiempo necesario para cerrar la lesión (Tabla 8). Estos resultados nos indican que tanto PPADS como RB-2 favorecen la acción de Ap₃A a través del receptor que inhibiría la migración del epitelio corneal.

A parte de estudiar el efecto que estos antagonistas P2 tienen en la migración de las células del epitelio corneal en presencia de los dinucleótidos Ap₄A y Ap₃A, hemos evaluado el efecto que en el mismo proceso tiene la incubación con los tres antagonistas a concentración 100 μ M solos, es decir, sin la presencia de ninguno de los agonistas testados hasta ahora. En la Figura 20C observamos como los tres antagonistas producen un retardo en la migración de las células epiteliales de córnea, cuando lo comparamos con la migración de lesiones control. Estos resultados también nos indican, que en ausencia de ningún agonista, el antagonista P2 más efectivo a concentración 100 μ M es PPADS (Tabla 9).

Este hecho sugiere la presencia de nucleótidos extracelulares en el medio, y que estos nucleótidos activarían de forma preferencial el receptor implicado en la aceleración de la migración celular.

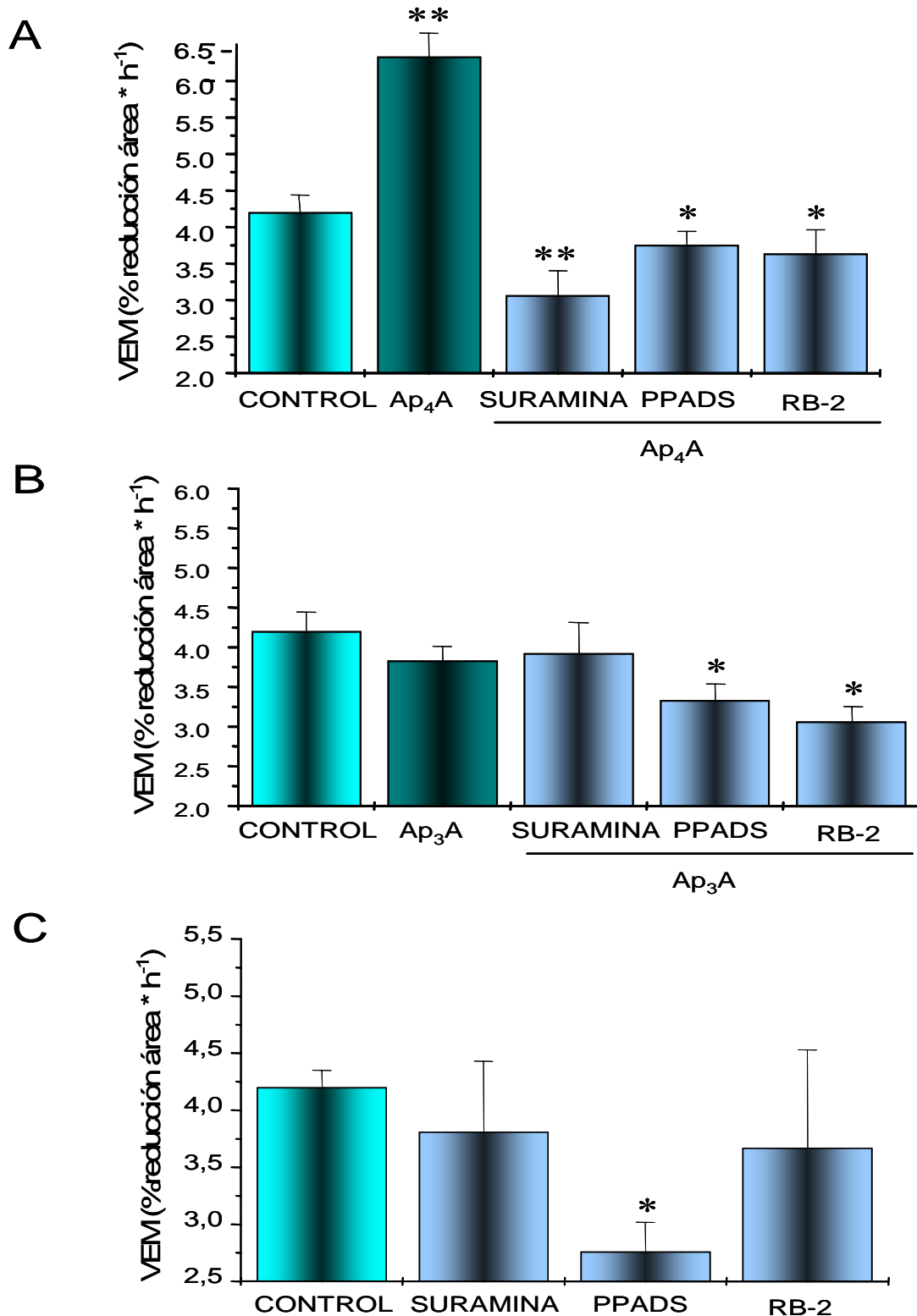


Figura 20: Datos de VEM para los antagonistas P2 a concentración 100 μM , tanto en presencia como en ausencia de Ap_4A o Ap_3A 100 μM . (A) Valores de VEM en % reducción área * h^{-1} para los tres antagonistas en presencia de Ap_4A . (B) Valores de VEM en % reducción área * h^{-1} para los tres antagonistas en presencia de Ap_3A . (C) Valores de VEM en % reducción área * h^{-1} para los tres antagonistas en ausencia de cualquier agonista. (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ vs. control).

COMPUESTO (100 μ M)	VEM (% reducción área * h^{-1})	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	4.20 \pm 0.15 %	0 h
Ap ₄ A	6.25 \pm 0.33 %**	- 5 h
Suramina+Ap ₄ A	3.06 \pm 0.34 %**	11 h
PPADS+Ap ₄ A	3.75 \pm 0.19 %*	+ 6 h
RB-2+Ap ₄ A	3.63 \pm 0.33 %*	+ 7 h

Tabla 7: Valores de VEM y de TER para Ap₄A 100 μ M en presencia de los antagonistas de los receptores P2 en concentración 100 μ M. Valores expresados como media \pm s.e.m. para ocho experimentos independientes. VEM calculado como % reducción área * h^{-1} . Para el TER: (+) representa el retraso en la migración con respecto a los valores control (expresados en horas) y, (-) representa la aceleración en el proceso de migración con respecto a los valores control (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.001$ vs. control).

COMPUESTO (100 μ M)	VEM (% descenso área * h^{-1})	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	4.20 \pm 0.15 %	0 h
Ap ₃ A	3.83 \pm 0.18 %	+ 6.5 h
Suramina+Ap ₃ A	3.92 \pm 0.39 %	+ 6 h
PPADS+Ap ₃ A	3.33 \pm 0.38 %*	+ 10.5 h
RB-2+Ap ₃ A	3.06 \pm 0.38 %*	+ 12.5 h

Tabla 8: Valores de VEM y de TER para Ap₃A 100 μ M en presencia de los antagonistas de los receptores P2 a concentración 100 μ M. Valores expresados como media \pm s.e.m. para ocho experimentos independientes. VEM calculado como % reducción área * h^{-1} . Para el TER: (+) representa el retraso en la migración con respecto a los valores control (expresados en horas) y, (-) representa la aceleración en el proceso de migración con respecto a los valores control (* $p < 0.05$ vs. control).

COMPUESTO (100 μ M)	VEM (% reducción área * h^{-1})	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	4.20 \pm 0.15 %	0 h
Suramina	3.81 \pm 0.62 %	+ 2 h
PPADS	2.76 \pm 0.54 % *	+ 8.5 h
RB-2	3.67 \pm 0.86 %	+ 3 h

Tabla 9: Valores de VEM y de TER para antagonistas de los receptores P2 a concentración 100 μ M en ausencia de agonistas. Valores expresados como media \pm s.e.m. para ocho experimentos independientes. VEM calculado como % reducción área * h^{-1} . Para el TER: (+) representa el retraso en la migración con respecto a los valores control (expresados en horas) y, (-) representa la aceleración en el proceso de migración con respecto a los valores control (* $p < 0.05$ vs. control).

4.3.2.- Curvas concentración-respuesta para antagonistas P2.

Una vez que conocemos que antagonistas P2 de los tres estudiados son efectivos para Ap_4A y Ap_3A , pasamos a realizar los ensayos de concentración-respuesta para estos antagonistas efectivos: suramina en el caso de Ap_4A y RB-2 en el caso de Ap_3A , testando concentraciones entre $0.1 \mu M$ y $1mM$, en presencia de Ap_4A o Ap_3A $100 \mu M$, según el antagonista ($n = 8$ en cada caso).

La habilidad de suramina para antagonizar el efecto que Ap_4A $100 \mu M$ tiene en la migración, se observa en la Figura 21A. Concentraciones seriadas de suramina van disminuyendo la capacidad aceleradora de la migración de Ap_4A siguiendo un patrón sigmoide de actuación. Los valores pA_{50} de suramina son de 5.17 ± 0.59 (lo que corresponde con un valor de IC_{50} de $6.76 \mu M$).

Cuando se realizan los ensayos de concentración-respuesta con RB-2 y Ap_3A $100 \mu M$ (Figura 21B), el antagonista tiene de nuevo un comportamiento sigmoide, y presenta unos valores de pA_2 de 3.48 ± 0.30 (valores de IC_{50} de $331.13 \mu M$).

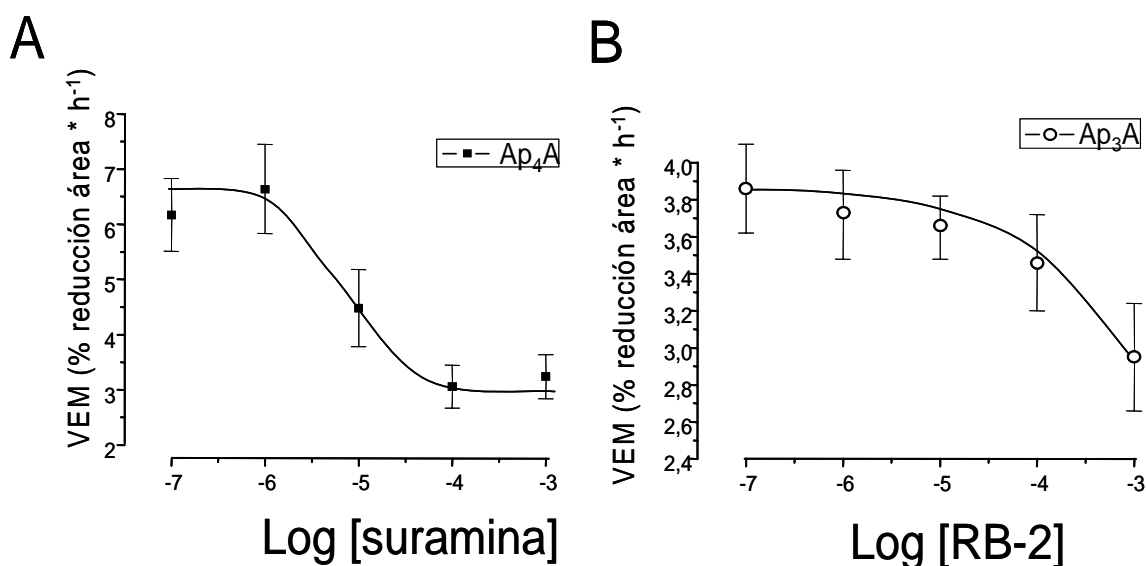


Figura 21: Curvas concentración-respuesta para los antagonistas suramina y RB-2. (A) Curva concentración-respuesta para el efecto del antagonista suramina en presencia de Ap_4A $100 \mu M$. (B) Curva concentración-respuesta para el efecto del antagonista RB-2 en presencia de Ap_3A $100 \mu M$.

Aún estando descrita la baja selectividad de los antagonistas por los receptores P2, hay trabajos descritos que indican una mayor selectividad de suramina por P2Y₂ y de RB-2 por P2Y₆ (Burnstock et al., 2006; von K lgegen, 2006). Estos datos, junto con los resultados descritos en este apartado para los antagonistas P2 en la migraci3n del epitelio corneal en presencia de Ap₄A o Ap₃A 100 μM, reafirman nuestra teoría de que el receptor P2Y₂ es el responsable de la aceleraci3n de la migraci3n vía Ap₄A, mientras que P2Y₆ es el encargado de ralentizar la misma tras la activaci3n de Ap₃A, durante el proceso de re-epitelizaci3n corneal.

4.4.- ANÁLISIS DE LOS DINUCLE3TIDOS POR HPLC.

4.4.1.- Estudio de la estabilidad de los dinucle3tidos tras los ensayos de migraci3n *in vitro*.

Los dinucle3tidos pueden degradarse mediante la acci3n de ecto-enzimas que transforman estas moléculas en mononucle3tidos. Se puede dar el caso de que el efecto descrito sea debido a productos de degradaci3n de los dinucle3tidos en lugar del efecto propio de estos. Para comprobar si esto es así en el caso de la migraci3n celular, se ensayaron Ap₄A y Ap₃A, bajo las condiciones descritas en Material y Métodos (n= 4 en cada caso), y se estudi3 la degradaci3n de los dinucle3tidos por HPLC.

En cuanto al comportamiento extracelular de Ap₄A, no ha sido posible observar ningún producto derivado de su hidr3lisis tras 2 minutos de incubaci3n (Figura 22A, 22C). Incluso en presencia del antagonista suramina (del que se ha descrito que bloquea alguna de las ecto-nucleotidasas), no fue posible encontrar diferencias en ningún caso.

Cuando se estudia Ap₃A, tampoco observamos ningún tipo de hidr3lisis tras 2 minutos (Figura 22B, 22C). De nuevo, la presencia del antagonista (en este caso RB-2) tampoco afecta a la hidr3lisis de Ap₃A.

Por tanto, podemos concluir que la modificaci3n en el ratio de migraci3n del epitelio corneal, es producida por los dinucle3tidos y no por sus productos de degradaci3n.

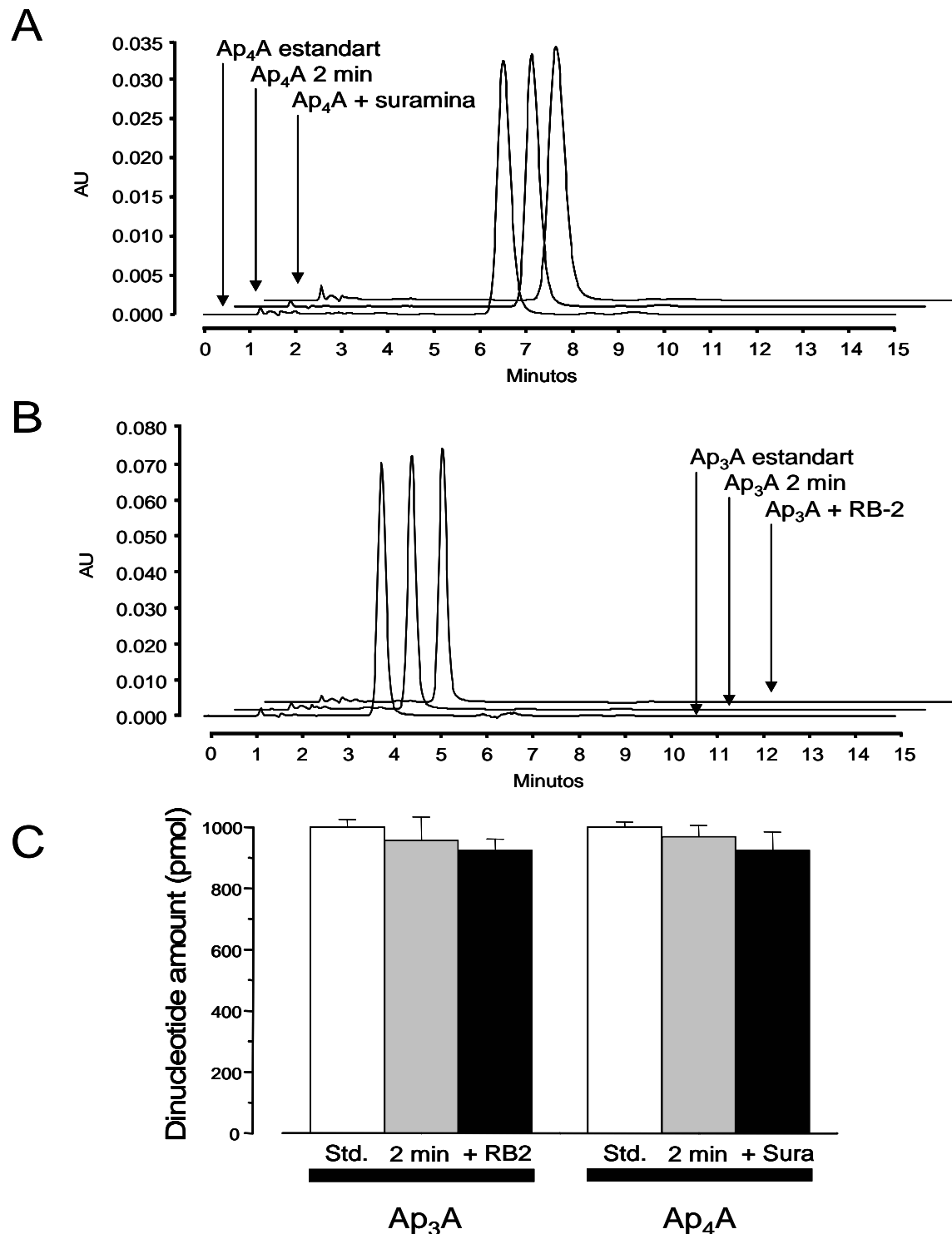


Figura 22: Estabilidad de los diadenosina polifosfatos Ap₄A y Ap₃A en cultivo de células epiteliales de córnea por HPLC. (A) Ensayo de estabilidad para Ap₄A, en presencia de suramina como inhibidor ectoenzimático, en el cual se detecta una mínima degradación. (B) Estabilidad de Ap₃A ensayada de la manera descrita en métodos. Ap₃A en ausencia y en presencia de RB-2, es mínimamente degradado por las enzimas extracelulares. (C) Gráfica en la que se muestran los cambios en la cantidad de Ap₃A y Ap₄A bajo las condiciones descritas en (A) y (B). Sura: Suramina.

4.4.2.- Estudio de la concentración de Ap₄A en la lágrima de conejo tras una lesión del epitelio corneal.

Para conocer el papel de los receptores P2Y₂ y P2Y₆ en la cornea, resulta interesante valorar los niveles de los dinucleótidos después de una lesión para ver si existen cambios que puedan estimular los receptores P2Y.

Tras la realización de las lesiones corneales con el disco de papel Whatman nº 1 empapado en n-heptanol como se indica en la sección 3.6. 2 de Material y Métodos, recogemos la secreción lagrimal mediante el test de Schirmer, y tras el procesado de la misma, procedemos al análisis de las distintas muestras mediante HPLC.

Recogemos muestras en los siguientes periodos de tiempo:- 0.5, 0, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 48, 50, 52, 54, 56, 58 y 60 horas, periodo de tiempo que incluye una etapa previa a la lesión, y el tiempo que cubre las fases de migración y de división celular del proceso de re-epitelización corneal.

En la Figura 23A encontramos una serie de cromatogramas donde aparece el pico para Ap₄A en el tiempo de retención correspondiente a este dinucleótido (en base a los controles estándar externos empleados) de las muestras de lágrima de conejo recogidas a los tiempos 0, 10, 20, 32 y 54 horas posteriores a la lesión. La Figura 23B refleja el comportamiento de la concentración de Ap₄A en la lágrima con el tiempo tras la lesión corneal. Como podemos apreciar, entre las 0 horas y las 10 horas posteriores a la lesión (tiempo que corresponde con la fase de latencia) se produce un descenso en los niveles de Ap₄A, comenzando a recuperar los niveles de la lesión a las 12 horas de la misma, y permaneciendo en valores más o menos constantes hasta las 50 horas post-lesión, momento en el cual se produce un nuevo aumento en la concentración de Ap₄A, permaneciendo de nuevo en valores constantes hasta la última medida.

Estos resultados nos reflejan la presencia de este dinucleótido en las fases de migración y de división celular, lo que indicaría el papel fundamental de esta molécula en ambas etapas del proceso de re-epitelización corneal *in vivo*.

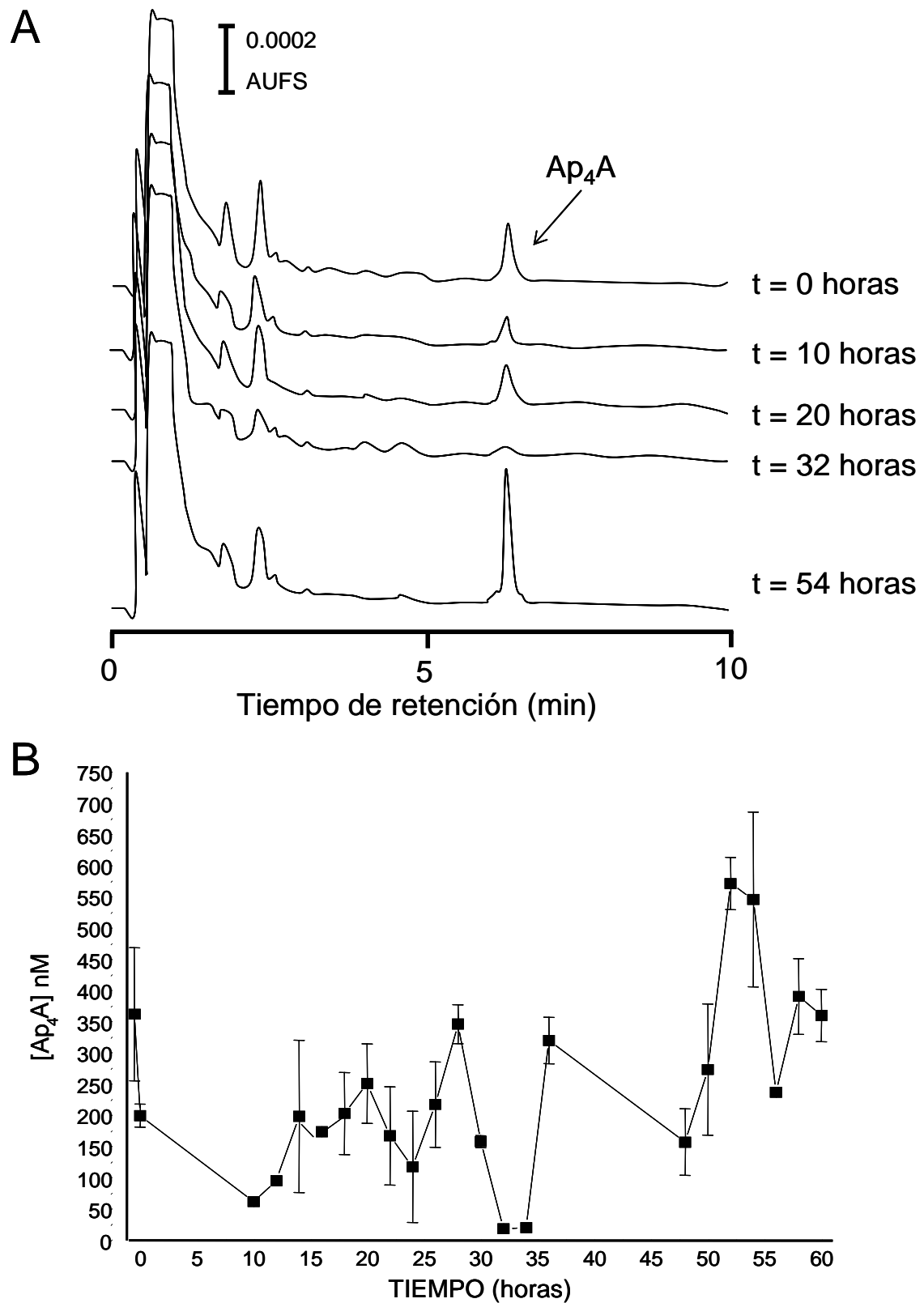


Figura 23: Concentración de Ap₄A en la lagrime de conejo tras la realización de una lesión corneal. (A) Cromatograma en cinco muestras de lágrima donde localizamos el pico que corresponde a Ap₄A- (B) Gráfica representando las variaciones de concentración de Ap₄A en la lagrime a lo largo del tiempo tras una lesión en el epitelio corneal in vivo.

4.5.- ESTUDIOS DE MIGRACIÓN CON INHIBIDORES DE LAS RUTAS INTRACELULARES.

Está descrito que de entre las rutas intracelulares implicadas en la transmisión de señal tras la activación de receptores P2Y por nucleótidos, están las rutas de MAPK (ERK1/2) y RhoA / ROCK-I (Yang et al., 2004; Klepeis et al., 2004; Weinger et al., 2005).

Para conocer si son estas rutas intracelulares las implicadas en los efectos que sobre la re-epitelización corneal tienen los dinucleótidos que aceleran y retardan la migración celular, realizamos varios ensayos de migración con diversos antagonistas de las mismas, para intentar discriminar la vía de actuación de los dinucleótidos para producir el efecto de aceleración y de retardo de la migración del epitelio corneal.

4.5.1.- Ensayos de migración con inhibidores de la autofosforilación de TyrK y de MAPK.

El primer ensayo de migración que hicimos fue con AG1478, un antagonista general de Tirosin Quinasas y con el inhibidor U0126, inhibidor de la ruta de las ERK1/2 a nivel de MEK, ambos a una concentración 100 μ M, tanto en presencia como en ausencia de Ap₄A o Ap₃A 100 μ M (n = 8 en cada caso).

Cuando estudiamos el efecto de estos antagonistas e inhibidores sobre la migración con Ap₄A 100 μ M, observamos lo siguiente: cuando comparamos la migración celular de las lesiones tratadas con AG1478 y U0126 con las lesiones tratadas con Ap₄A 100 μ M en ausencia de cualquier inhibidor, encontramos que se produce un retardo en la migración en ambos casos, disminuyendo la VEM y aumentando el tiempo necesario para cerrar las lesiones de forma completa (Figura 24A, Tabla 10).

Sin embargo, cuando evaluamos el efecto que estos inhibidores tienen sobre la migración celular con Ap₃A 100 μ M, comprobamos que AG1478 retrasa aún más la migración celular si lo comparamos con Ap₃A solo, mientras que U0126 acelera la

migración celular alcanzando valores de VEM y de TER similares a los valores control (lesiones no tratadas con ningún inhibidor y/o agonista) (Figura 24B y Tabla 11).

Por último, cuando ensayamos estos dos inhibidores solos, sin la presencia de ningún agonista, a concentración 100 μM , vemos que los tres producen un retardo en la migración celular, cuando comparamos los valores de VEM y de TER con los valores para las lesiones control (Figura 24C y Tabla 12).

COMPUESTO (100 μM)	VEM (% reducción área * h ⁻¹)	Δ EHT(- aceleración + retardo)
Control	4.20 \pm 0.15 %	0 h
Ap ₄ A	6.25 \pm 0.33 %***	- 5 h
U0126+Ap ₄ A	3.62 \pm 0.42 %***	+ 12 h
AG1478+Ap ₄ A	3.16 \pm 0.09 %***	+ 26 h

Tabla 10: Valores de VEM y de TER para los inhibidores de las rutas intracelulares en presencia de Ap₄A ambos a concentración 100 μM . Valores expresados como media \pm s.e.m. para ocho experimentos independientes. (+) representa el retraso en horas en relación al control, mientras que (-) representa la aceleración sobre los valores control (*** $p < 0.0001$ vs. control).

COMPUESTO (100 μM)	VEM (% reducción área * h ⁻¹)	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	4.20 \pm 0.15 %	0 h
Ap ₃ A	3.83 \pm 0.18 %***	+ 6.5 h
U0126+Ap ₃ A	4.31 \pm 0.47 %	- 4 h
AG1478+Ap ₃ A	3.48 \pm 0.22 %	+ 8.5 h

Tabla 11: Valores de VEM y TER para los inhibidores de las rutas intracelulares en presencia de Ap₃A ambos a concentración 100 μM . Valores expresados como media \pm s.e.m. para ocho experimentos independientes. (+) representa el retraso en horas en relación al control, mientras que (-) representa la aceleración sobre los valores control (*** $p < 0.0001$ vs. control).

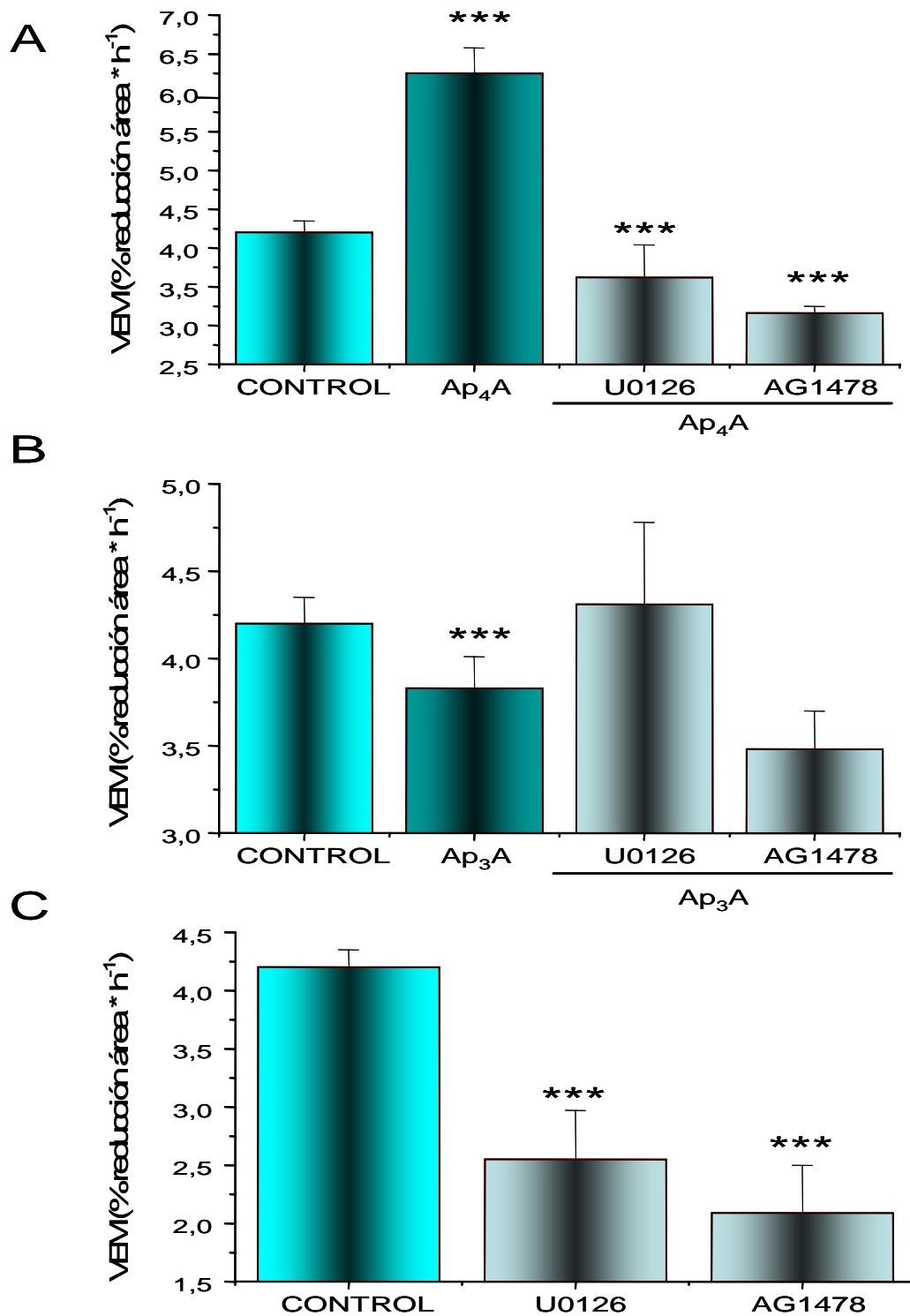


Figura 24: Ensayos de migración celular con inhibidores de las rutas intracelulares. (A) Variación de VEM cuando los antagonistas U0126 y AG1478 se testan en presencia de Ap₄A todos ellos a una concentración de 100 μ M. (B) Variación de VEM cuando los inhibidores U0126 y AG1478 se testan en presencia de Ap₃A todos ellos a una concentración de 100 μ M. (C) Efecto de los dos inhibidores en ausencia de cualquier dinucleótido. (***) $p < 0.0001$ vs. control).

COMPUESTO (100 μ M)	VEM (% reducción * h ⁻¹)	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	4.20 \pm 0.15 %	0 h
U0126	2.55 \pm 0.42 %***	+ 11 h
AG1478	2.09 \pm 0.41 %***	+ 13 h

Tabla 12: Valores de VEM y TER para los inhibidores de las rutas intracelulares a concentración 100 μ M en ausencia de agonistas. Valores expresados como media \pm s.e.m. para ocho experimentos independientes. (+) representa el retraso en horas en relación al control, mientras que (-) representa la aceleración sobre los valores control (***) $p < 0.0001$ vs. control).

4.5.2.- Ensayos de migración con inhibidores de la ruta RhoA / ROCK-I.

Como en la migración de las células interviene el citoesqueleto de actina, y la intervención de éste no es solo vía fibras de estrés (vía RhoA / ROCK-I), sino que también lo hacen la formación de lamelipodios y de filopodios (vía cdc42 y Rac1), queremos comprobar si estas dos últimas rutas también están implicadas en la aceleración o retardo de la migración celular del epitelio corneal provocado por Ap₄A o Ap₃A 100 μ M, a la vez que comprobamos el grado de implicación de la ruta RhoA / ROCK-I.

Para ello testamos una serie de inhibidores de la vía RhoA / ROCK-I: Y27632 100 nM (inhibidor de la vía a nivel de ROCK-I), (-)-Blebbistatina 10 μ M (inhibidor selectivo de miosina II no muscular), Óxido de Fenilarsina (PAO) 5 μ M (inhibe a nivel de RhoA y la internalización de los receptores de membrana) y ML7 25 μ M (inhibe la Quinasa de cadena ligera de miosina), junto con un agonista de la misma: PTD4-PfnI (una profilina que facilita la polimerización de actina) a 11.2 μ g/ μ l. Los ensayos los hacemos tanto en presencia como en ausencia de Ap₄A o Ap₃A 100 μ M (n = 4 cada uno).

En caso de Ap₄A, la pre-incubación de 30 minutos con Y27632 produce un retardo en la migración provocada por este agonista, lo que conlleva un descenso en la VEM con el consecuente aumento en el TER (Figura 25A y Tabla 13). En cuanto al efecto de los inhibidores PAO y ML7, observamos como se produce un daño letal en las

células, y estas mueren entre las 2 y 6 horas posteriores a la incubación con estos inhibidores. Sin embargo, no todas las células mueren, y las lesiones en las que permanecen las células vivas, son incapaces de cerrarse, es decir, las células pierden la capacidad de migración (Figura 25A y Tabla 13). En cuanto a (-)-Blebbistatina, observamos que aunque las células cambian de morfología mientras están en presencia de este compuesto, se recuperan posteriormente y si son capaces de migrar y cerrar la lesión, aunque si lo comparamos con la migración de Ap_4A solo, vemos que es mucho más lenta, produciéndose una disminución de la VEM con el consecuente aumento en el TER (Figura 25A y Tabla 13). Por último, cuando incubamos con la proteína PTD4-PfnI 11.2 $\mu g/\mu l$ y a continuación lo hacemos con Ap_4A 100 μM , la capacidad de migración del sistema es intermedia entre la migración control y la causada por Ap_4A 100 μM solo (Figura 25A y Tabla 13).

Cuando hacemos el mismo tipo de ensayo con Ap_3A , observamos que el pre-tratamiento con Y27632 produce una aceleración en la velocidad de migración de las células lesionadas, alcanzando valores de VEM y de TER similares a los valores control en ausencia de agonistas y antagonistas (Figura 24B y Tabla 14). El pre-tratamiento con PAO y ML7 produce el mismo efecto descrito para Ap_4A (Figura 25B y Tabla 14). En cuanto a (-)-Blebbistatina, vemos que se produce un retraso mayor de la migración celular tanto si lo comparamos con los valores de VEM y de TER para lesiones control como con los valores para las lesiones tratadas con Ap_3A solo (Figura 25B y Tabla 14). Finalmente, PTD4-PfnI 11.2 $\mu g/\mu l$ produce aceleración de la migración si lo comparamos con Ap_3A solo, llevando los valores de VEM y TER a niveles control (Figura 25 y Tabla 14).

En relación con los resultados de migración de los inhibidores en ausencia de dinucleótidos, observamos que Y27632 produce un retardo en la migración celular, cuando comparamos los valores de VEM y de TER con los valores para las lesiones control (Figura 25C y Tabla 15). Además, comprobamos de nuevo el mismo efecto letal para PAO y ML7, mientras que (-)-Blebbistatina frena significativamente la migración celular en relación al control y PTD4-PfnI 11.2 $\mu g/\mu l$ la acelera (Figura 25C y Tabla 15).

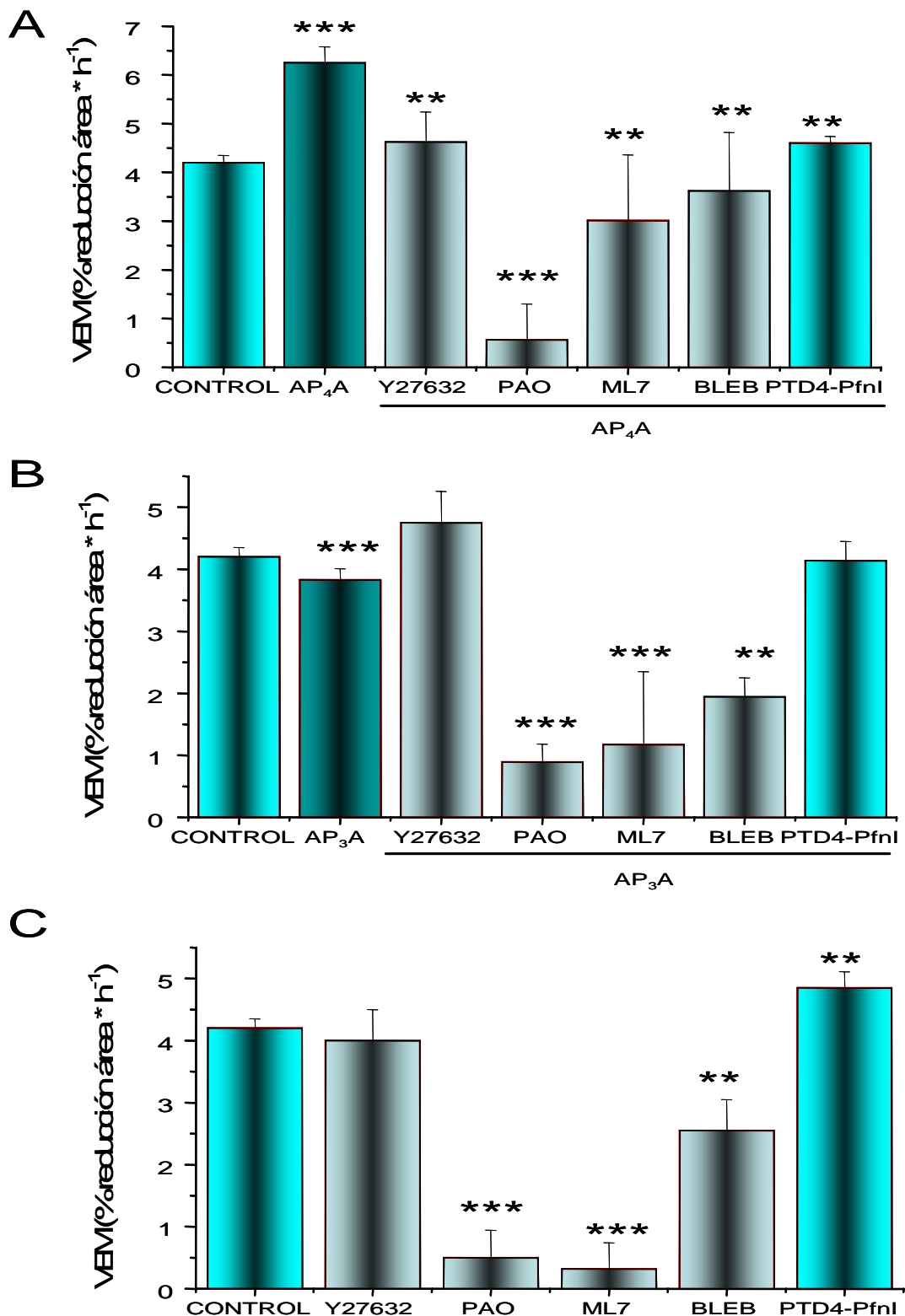


Figura 25: Ensayos de migración con inhibidores de la vía RhoA/ROCK-I. (A) Variación de VEM expresado como % descenso área * h⁻¹ tras pre-tratamiento con los inhibidores y de PTD4-PfnI de la vía en presencia de Ap₄A. (B) Variación de VEM tras pre-tratamiento con los inhibidores y de PTD4-PfnI de la vía en presencia de Ap₃A. (C) Efecto de los cuatro inhibidores junto a PTD4-PfnI en ausencia de los dinucleótidos (Bleb: Blebbistatina, *** p < 0.0001, ** p < 0.01, * p = < 0.1 v.s control).

COMPUESTO	VEM (% reducción área* h ⁻¹)	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	4.20 ± 0.15 %	0 h
Ap ₄ A 100 μM	6.25 ± 0.33 %***	- 5 h
Y27632 100 nM +Ap ₄ A 100 μM	4.62 ± 0.62 %**	+ 6 h
PAO 5 μM +Ap ₄ A 100 μM	0.56 ± 0.74 %***	-----
ML7 25 μM +Ap ₄ A 100 μM	3.01 ± 1.35 %**	-----
Blebblistatina 10 μM +Ap ₄ A 100 μM	3.62 ± 1.2 %*	+ 4 h
PTD4-PfnI 11.2 μg/μl +Ap ₄ A 100 μM	4.60 ± 0,14 %	- 4 h

Tabla 13: Valores de VEM y de TER para los inhibidores de la ruta RhoA / ROCK-I en presencia de Ap₄A 100 μM. Valores expresados como media ± s.e.m. para ocho experimentos independientes. (+) representa el retraso en horas en relación al control, mientras que (-) representa la aceleración sobre los valores control. (*** p < 0.0001, ** p < 0.01, * p = < 0.1 vs. control).

COMPUESTO	VEM (% reducción área * h ⁻¹)	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	4.20 ± 0.15 %	0 h
Ap ₃ A 100 μM	3.83 ± 0.18 %***	+ 6.5 h
Y27632 100 nM +Ap ₃ A 100 μM	4.75 ± 0.51 %	- 6 h
PAO 5 μM +Ap ₃ A 100 μM	0.89 ± 0.29 %***	-----
ML7 25 μM +Ap ₃ A 100 μM	1.17 ± 1.18 %***	-----
Blebblistatina 10 μM +Ap ₃ A 100 μM	1.94 ± 0.31 %**	+ 10.5 h
PTD4-PfnI 11.2 μg/μl +Ap ₃ A 100 μM	4.14 ± 0,31 %	0h

Tabla 14: Valores de VEM y de TER para los inhibidores de la ruta RhoA/ROCK-I en presencia de Ap₃A 100 μM. Valores expresados como media ± s.e.m. para ocho experimentos independientes. (+) representa el retraso en horas en relación al control, mientras que (-) representa la aceleración sobre los valores control. (*** p < 0.0001, ** p < 0.01, * p = < 0.1 vs. control).

COMPUESTO	VEM (% reducción área * h ⁻¹)	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	4.20 ± 0.15 %	0 h
Y27632 100 nM	4.00 ± 0.50 %	+ 1 h
PAO 5 μM	0.50 ± 0.44 %***	-----
ML7 25 μM	0.32 ± 0.42 %***	-----
Blebbistatina 10 μM	2.55 ± 0.50 %*	+ 20 h
PTD4-PfnI 11.2 μg/μl	4.85 ± 0.26 %	- 5 h

Tabla 15: Valores de VEM y de TER para los inhibidores de la ruta RhoA / ROCK-I en ausencia de agonistas. Valores expresados como media ± s.e.m. para ocho experimentos independientes. (+) representa el retraso en horas en relación al control, mientras que (-) representa la aceleración sobre los valores control. (***p < 0.0001, **p < 0.01, *p = < 0.1 vs. control).

Todos estos ensayos realizados (ensayos de migración celular con antagonistas de ambas vías intracelulares), nos indican lo siguiente:

1) La activación del receptor P2Y₂ vía Ap₄A produciría la activación de ambas vías intracelulares (ERK1/2 y RhoA / ROCK-I). Por eso, cuando se inhibe una de las dos rutas, se produce un retardo en la migración celular, llegando incluso a producirse una muerte celular en alguno de los casos (Figura 26A).

2) Los resultados para Ap₃A parecen más contradictorios: como hemos visto, cuando inhibimos la ruta de las ERK1/2, en lugar de producirse un mayor retraso en la migración celular (algo que sería esperable tras ver los resultados de Ap₄A), observamos el efecto contrario, es decir, una aceleración de la migración. En cuanto a los resultados de los antagonistas del citoesqueleto, parecen indicar que esta ruta no estaría implicada en el retraso de la migración celular producido por Ap₃A (Figura 26B).

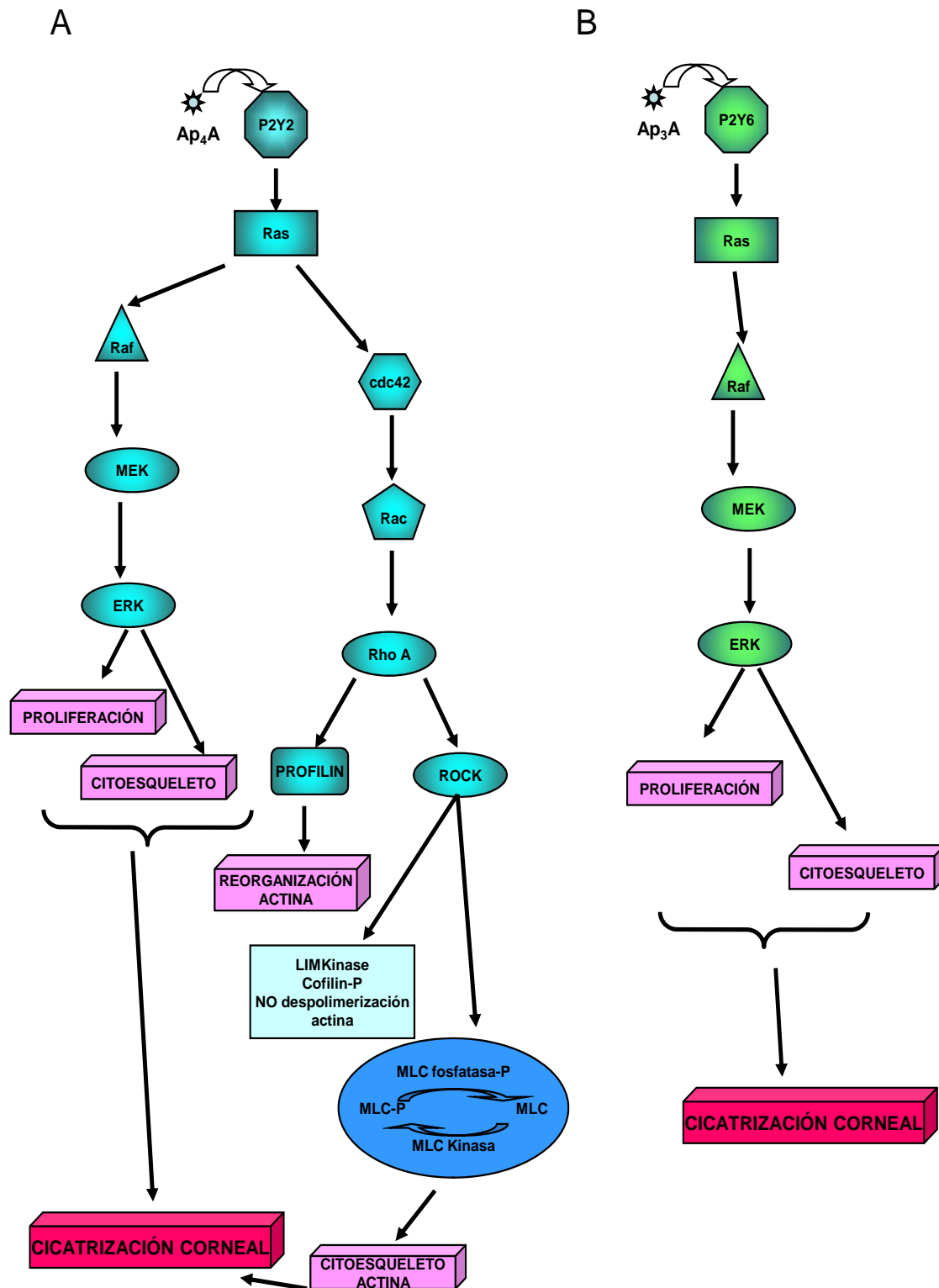


Figura 26: Rutas intracelulares activadas por los dinucleótidos en el proceso de migración celular. (A) La activación del receptor P2Y₂ por el dinucleótido Ap₄A produce la activación de las rutas de ERK1/2 y del Citoesqueleto de actina. (B). Activación de ERK1/2 vía Ap₃A y el receptor P2Y₆.

4.5.3 Ensayos de migración con inhibidores de la ruta Fosfolipasa C / Proteína Quinasa C.

Existen diversos trabajos en los cuales es diversos factores de crecimiento, producen su efecto en el proceso de migración celular mediante la activación de la ruta Fosfolipasa C / Proteína Quinasa C (PLC / PKC) (Rieck et al., 2001; Chandrasekher et al., 2001; Sharma et al., 2007).

Para conocer si en el efecto acelerador de la migración del epitelio corneal que produce Ap_4A está implicada la ruta PLC / PKC, ruta que es la vía de actuación más habitual para los receptores $P2Y_2$, realizamos ensayos de migración celular en los cuales testamos el efecto que tienen los inhibidores Estaurosporina 1 nM (inhibidor de la Proteína Quinasa C), Bisindolilmaleimida-I 10 μM (inhibidor de la Proteína Quinasa C), U73122 3 μM (inhibidor de la Fosfolipasa C) y U73343 3 μM (control negativo de U73122) tanto en presencia como en ausencia de Ap_4A 100 μM .

El pre-tratamiento con Estaurosporina, Bisindolilmaleimida-I y U73122 produce en todos los casos un retraso en la migración celular en las lesiones (disminuye la VEM), lo que conlleva un aumento del TER de la lesión, si lo comparamos tanto con la migración de las lesiones tratadas con Ap_4A solo como con las lesiones control en ausencia de agonistas o antagonistas. De los tres testados, observamos como U73122 es el más potente en el retraso de la migración de las lesiones (Figura 27A y tabla 16). En el caso del control negativo U73343, observamos como la migración no se ve alterada en relación a la migración de las lesiones tratadas con Ap_4A (Figura 27A y Tabla 16).

En el estudio de migración de las células tratadas con los inhibidores solos, observamos de nuevo que tanto Estaurosporina como Bisindolilmaleimida-I y U73122 producen un descenso notable en la velocidad de migración con un aumento en el tiempo necesario para cerrar la misma, siendo de nuevo el más potente U73122 (Figura 27B y Tabla 17). El control negativo U73343 no produce ninguna variación en la velocidad de migración ni en el tiempo estimado de cierre de la misma si lo comparamos con las lesiones control en ausencia de los inhibidores (Figura 27B y Tabla 17).

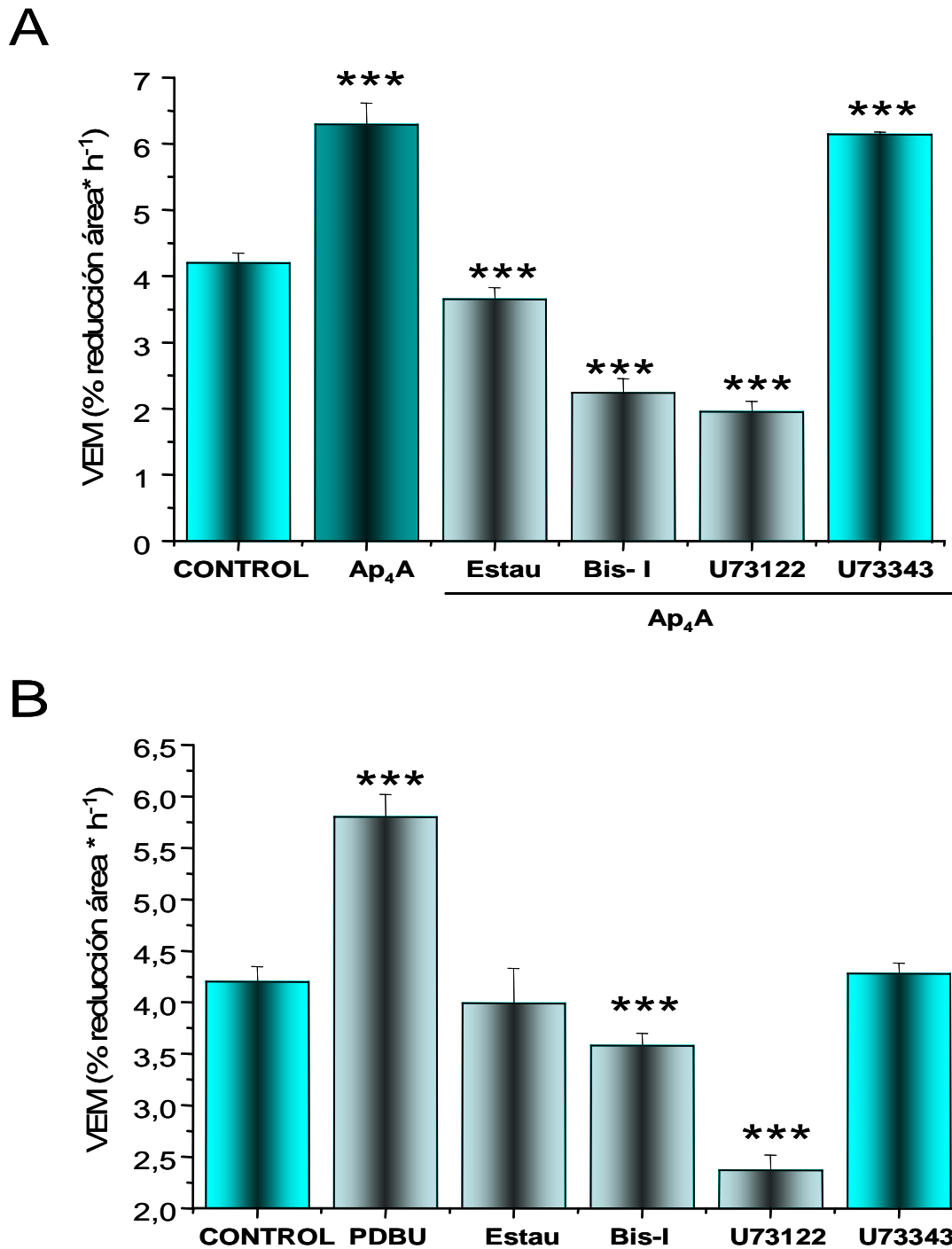


Figura 27: Ensayos de migración con inhibidores de la vía PLC / PKC. (A) Variación de VEM en % reducción área * h⁻¹ tras pre-tratamiento con los inhibidores de la vía en presencia de Ap₄A. (B) Variación de VEM en % reducción área * h⁻¹ en ensayos de migración en ausencia de agonista. (Estau: Estaurosporina, Bis-I: Bisindolilmaleimida-I, *** p < 0.001 vs. control).

COMPUESTO	VEM (% reducción área* h ⁻¹)	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	4.20 ± 0.15 %	0 h
Ap ₄ A 100 μM 6.	25 ± 0.33 % ***	- 5 h
Estau 1 nM+ Ap ₄ A 100 μM 3.	65 ± 0.18 % ***	+ 6 h
Bis-I 10 μM + Ap ₄ A 100 μM 2.	24 ± 0.21 % ***	+ 30 h
U73122 3 μM + Ap ₄ A 100 μM 1.	92 ± 0.16 % ***	+ 38 h
U73343 3 μM + Ap ₄ A 100 μM 6.	10 ± 0.04 % ***	0 h

Tabla 16: Valores de VEM y de TER para los inhibidores de la ruta PLC / PKC en presencia de Ap₄A. Valores expresados como media ± s.e.m. para ocho experimentos independientes. (+) representa el retraso en horas en relación al control, mientras que (-) representa la aceleración sobre los valores control. (Estau: Estaurosporina, Bis-I: Bisindolilmaleimida-I, *** p < 0.0001 vs. control).

COMPUESTO (μM)	VEM (% reducción área * h ⁻¹)	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	4.20 ± 0.15 %	0 h
PDBU 1 μM 5.	80 ± 0.22 % ***	- 8 h
Estaurosporina 1 nM	3.99 ± 0.34 %	+ 3h
Bisindolilmaleimida I 10 μM 3.	58 ± 0.12 % ***	+ 6 h
U73122 3 μM 2.	37 ± 0.15 % ***	+ 20 h
U73343 3 μM 4.	28 ± 0.10 %	0 h

Tabla 17: Valores de VEM y TER para los inhibidores de la ruta PLC / PKC en ausencia de Ap₄A. Valores expresados como media ± s.e.m. para ocho experimentos independientes. (+) representa el retraso en horas en relación al control, mientras que (-) representa la aceleración sobre los valores control. (***) p < 0.0001, ** p < 0.01, * p = < 0.1 vs. control).

4.6.- ENSAYOS DE MIGRACIÓN CON LAS CELULAS “SIRC”.

Como se ha mencionado en la sección de Material y Métodos, hemos realizado unos ensayos de migración celular con Ap_4A o Ap_3A $100 \mu M$, para comprobar si las células inmortales de epitelio corneal de conejo (SIRC) siguen los mismos patrones de actuación en cuanto a migración, que los cultivos primarios de epitelio corneal de conejo.

Los ensayos se han realizado siguiendo el mismo protocolo que para el mismo tipo de ensayos realizado con los cultivos primarios. Tras lesionar la monocapa celular ($n = 8$ en cada caso), incubamos con Ap_4A o Ap_3A $100 \mu M$. En la Figura 28A, encontramos los resultados de migración en valores de variación de área lesionada frente al tiempo (VEM), para Ap_4A y Ap_3A y para el control (incubación solo con medio Locke). Como vemos, Ap_4A produce un incremento en la velocidad de migración si lo comparamos con la velocidad de migración de lesiones control que representa un descenso concomitante en el tiempo estimado de cierre (TER). Por el contrario, Ap_3A produce un retardo en la velocidad de migración cuando lo comparamos con la situación control, incrementando el TER.

Por otro lado, en la Figura 28B, encontramos una serie de imágenes donde podemos comparar el efecto de Ap_4A y de Ap_3A en la migración de las células epiteliales SIRC.

Por consiguiente, estas células presentan un comportamiento virtualmente idéntico al comportamiento de las células obtenidas en cultivo primario. Esto indica que pueden emplearse como alternativa a los cultivos primarios.

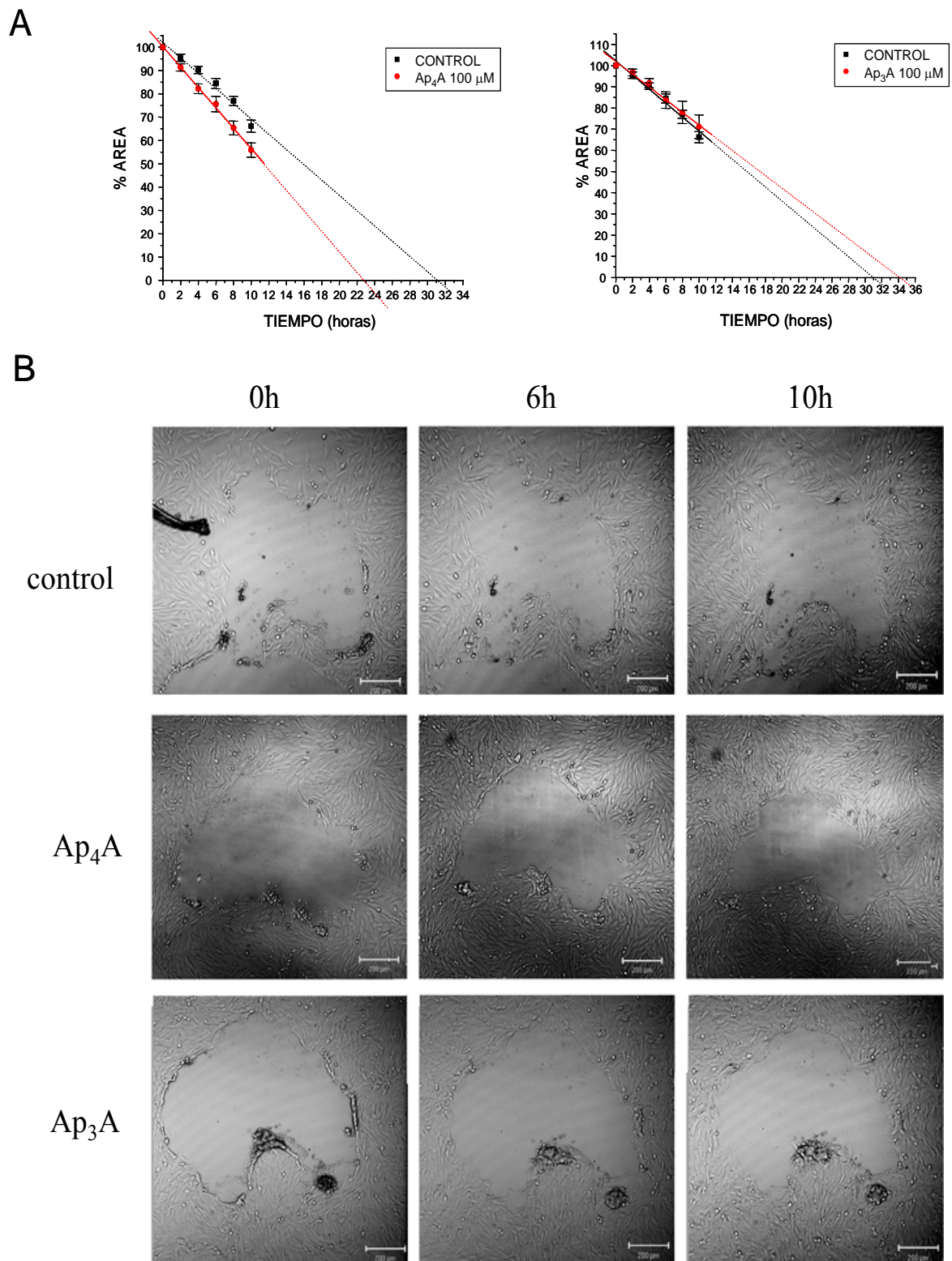


Figura 28: Ensayos de migración con Ap₄A y Ap₃A 100 μM en cultivo inmortalizado SIRC. (A) Gráficas que representan la variación del área lesionada frente al tiempo siguiendo el protocolo descrito en métodos. (B) Imágenes en las que comparamos el proceso de migración en condiciones controles y tras tratamientos con Ap₄A y Ap₃A 100 μM. Imágenes tomadas a 0, 6 y 10 horas en ausencia (control) y en presencia de los dinucleótidos.

En las células SIRC, la incubación con AG1478 y con U0126 previa a la incubación con Ap_4A produce un retraso en la velocidad de migración, reduciendo la VEM, aumentando el TER (Figura 29A y Tabla 18). Cuando ensayamos los inhibidores del citoesqueleto de actina en presencia de Ap_4A , observamos que tanto Y27632 como (-)-Blebbistatina producen un retraso estadísticamente significativo en la VEM con un aumento en el TER (Figura 29B y Tabla 18). La pre-incubación con los inhibidores de PLC y PKC en presencia de Ap_4A , produce un retraso estadísticamente significativo en VEM con el concomitante aumento de TER en todos los casos, si lo comparamos tanto con la migración de las lesiones tratadas con Ap_4A como con las lesiones control en ausencia de cualquier compuesto (Figura 29C y Tabla 19).

COMPUESTO	VEM (% reducción área * h ⁻¹)	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	3.28 ± 0.27 %	0 h
Ap₄A 100μM	4.35 ± 0.11 % ***	8 h
U0126 + Ap₄A 100μM	2.52 ± 0.32 % ***	+ 12 h
AG1478 + Ap₄A 100μM	2.20 ± 0.19 % ***	+ 26 h
Y27632 100 nM + Ap₄A 100μM	3.21 ± 0.68 % **	+ 6 h
(-)-Bleb 10 μM + Ap₄A 100 μM	2.51 ± 1.0 % *	+ 12 h

Tabla 18: Valores de VEM y de TER para Ap_4A e inhibidores de las rutas MAPK y citoesqueleto de actina en el proceso de migración celular en células inmortales SIRC. Valores expresados como media ± s.e.m. para ocho experimentos independientes. (+) representa el retraso en horas en relación al control, mientras que (-) representa la aceleración sobre los valores control. (-)-Bleb: (-)-Blebbistatina, *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p = < 0.1$ vs.control).

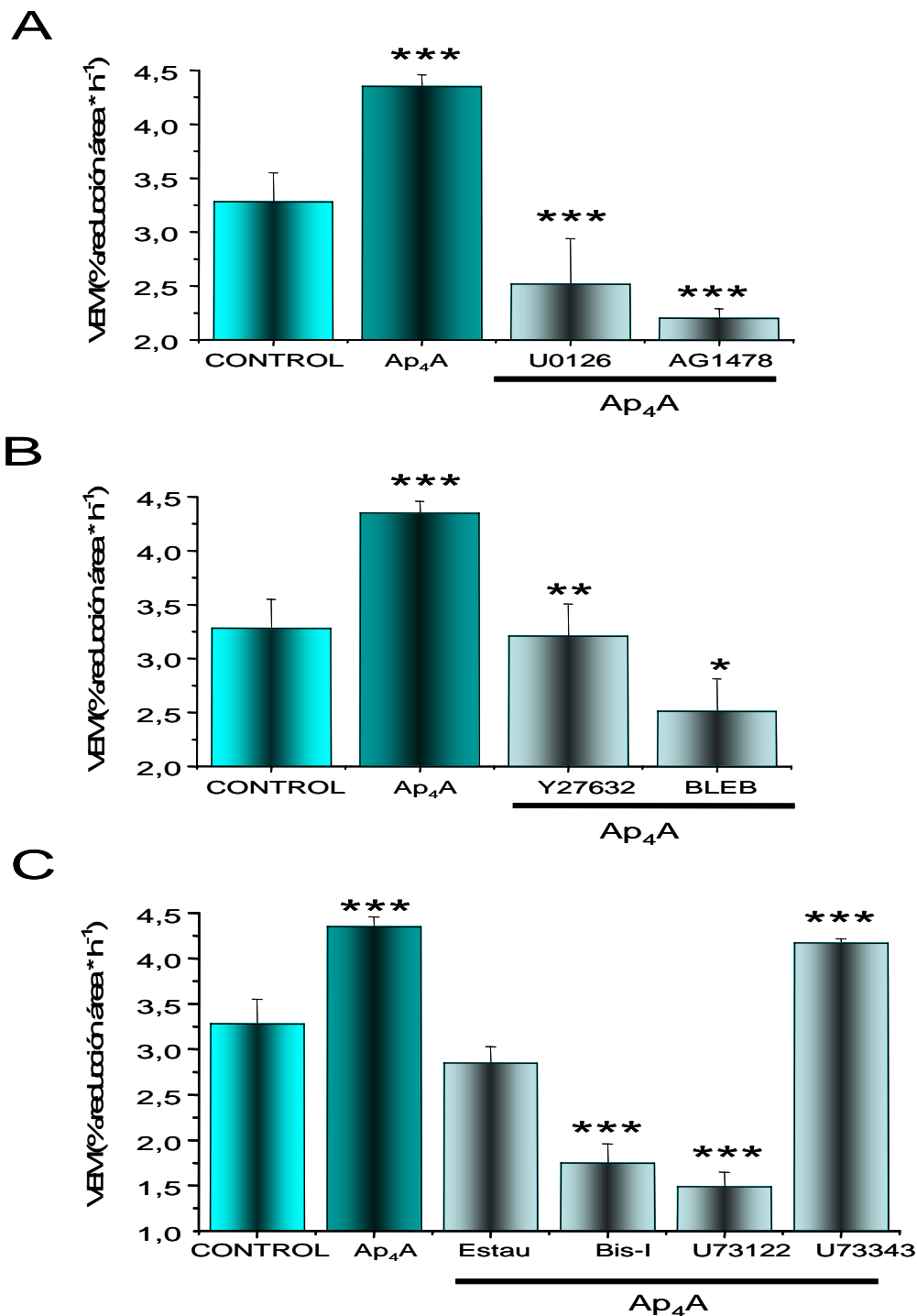


Figura 29: Efecto de los inhibidores de MAPK, citoesqueleto de actina y PLC/PKC en la migración celular en presencia de Ap₄A en células SIRC. (A) Variación de VEM en % reducción área * h⁻¹ tras el pre-tratamiento con los inhibidores de Tirosin Quinasa y MAPK en presencia de Ap₄A. (B) Variación de VEM en % reducción área * h⁻¹ en ensayos de migración en presencia de los inhibidores de la ruta del citoesqueleto de actina. (C). Variación de VEM en % reducción área * h⁻¹ en ensayos de migración en presencia de los agonistas e inhibidores de la vía PLC/PKC. (Bleb: -(-) Bleblistaina; Estau: Estaurosporina, Bis-I: Bisindolilmaleimida-I, *** p < 0.0001, ** p < 0.01, * p < 0.1 vs. control).

COMPUESTO (μM)	VEM (% reducción area $\cdot \text{h}^{-1}$)	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	$3.28 \pm 0.27 \%$	0 h
Ap ₄ A 100 μM	$4.35 \pm 0.11 \%$ ***	- 8 h
Stau 1 nM+ Ap ₄ A 100 μM	$2.85 \pm 0.18 \%$	+ 6 h
Bis- I 10 μM + Ap ₄ A 100 μM	$1.75 \pm 0.21 \%$ ***	+ 30 h
U73122 3 μM + Ap ₄ A 100 μM	$1.49 \pm 0.16 \%$ ***	+ 38 h
U73343 3 μM + Ap ₄ A 100 μM	$4.25 \pm 0.08 \%$ ***	0 h

Tabla 19: Valores de VEM y de TER para Ap₄A e inhibidores de las ruta PLC / PKC en el proceso de migración celular en células inmortales SIRC. Valores expresados como media \pm s.e.m. para ocho experimentos independientes. (+) representa el retraso en horas en relación al control, mientras que (-) representa la aceleración sobre los valores control. (Stau: Estaurosporina, Bis-I: Bisindolilmaleimida-I, *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$ vs. control).

Los mismos ensayos realizados en presencia de Ap₃A nos indican lo siguiente: de nuevo, la preincubación con U0126 produce un aumento en la VEM con una disminución del TER de 3 horas cuando lo comparamos con el dinucleótido solo. La pre-incubación con AG1478 también produce un descenso en la VEM con un incremento en el TER de 8.5 horas (Figura 30A y Tabla 20). Sin embargo, la pre-incubación con los inhibidores de la ruta de l citoesqueleto de actina produce dos tipos de comportamiento distintos: 1) por un lado Y27632 produce un aumento en la VEM con un descenso del TER de 6 horas si lo comparamos con Ap₃A, y 2) (-) Blebbistatina produce un retraso significativo en la VEM con un incremento en el TER de 10.5 horas (Figura 30B, Tabla 20).

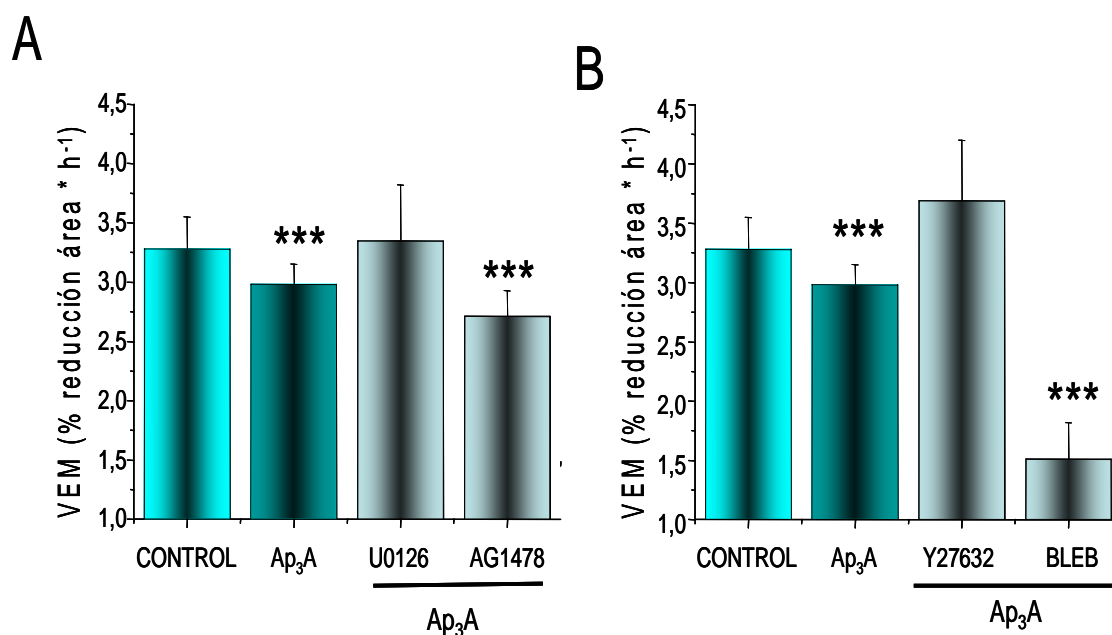


Figura 30: Efecto de los inhibidores de MAPK y citoesqueleto de actina en la migración celular en presencia de Ap_3A en células SIRC. (A) Variación de VEM en % reducción área * h^{-1} en tras el pre-tratamiento con los inhibidores de Tirosin Quinasa y MAPK en presencia de Ap_3A . (B) Variación de VEM en % reducción área * h^{-1} en ensayos de migración en presencia de los inhibidores de la ruta del citoesqueleto de actina. (Bleb: (-)Blebbistatina, *** $p < 0.000$ vs. control).

COMPUESTO	VEM (% reducción área * h^{-1})	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	3.28 ± 0.27 %	0 h
Ap_3A 100 μ M	2.98 ± 0.17 % ***	+ 8 h
U0126 + Ap_3A 100 μ M	3.35 ± 0.42 %	- 4 h
AG1478 + Ap_3A 100 μ M	2.71 ± 0.31 % ***	+ 8.5 h
Y27632 100 nM + Ap_3A 100 μ M	3.69 ± 0.61 %	- 6 h
(-)Bleb 10 μ M + Ap_3A 100 μ M	1.51 ± 0.35 % ***	+ 10.5 h

Tabla 20: Valores de VEM y de TER para Ap_3A e inhibidores de las rutas MAPK y citoesqueleto de actina en el proceso de migración celular en células inmortales SIRC. Valores expresados como media \pm s.e.m. para ocho experimentos independientes. (+) representa el retraso en horas en relación al control, mientras que (-) representa la aceleración sobre los valores control. (-)Bleb: (-)Blebbistatina, *** $p < 0.0001$ vs. control).

Cuando estudiamos el comportamiento de los inhibidores solos en la migración del epitelio corneal SIRC, observamos como U0126, AG1478, Y27632 y (-)Blebbistatina producen un descenso en la VEM de forma significativa frente al control en ausencia de cualquier compuesto, lo que conlleva un aumento en el TER en todos los casos (Figura 31A y 31B y Tabla 21). De nuevo tanto Estaurosporina como Bisindolilmaleimida-I y U73122 producen un descenso notable en la VEM con un aumento en el TER necesario para cerrar la misma, siendo de nuevo el más potente U73122 (Figura 31C). El control negativo U73343 no produce ninguna variación ni en VEM ni en el TER si lo comparamos con las lesiones control en ausencia de los inhibidores (Figura 31C). En cuanto al agonista selectivo PDBU, observamos como se produce un aumento significativo en VEM con el consecuente descenso de TER cuando lo comparamos con las lesiones control.

COMPUESTO	VEM (% reducción área * h ⁻¹)	Δ EHT (- aceleración + retardo)
Control	3.28 ± 0.27 %	0 h
AG1478 100μM	1.63 ± 0.41 %***	+ 13 h
U0126 100μM	1.99 ± 0.42 % ***	+11 h
Y27632 100 nM	3.12 ± 0.50 %	+1 h
(-)Bleb 10 μM	1.99 ± 0.50 % **	+20 h
Estaurosporina 1 nM	3.12 ± 0.34 % ***	+3 h
Bis-I 10 μM	2.79 ± 0.12 %***	+6 h
U73122 3 μM	1.85 ± 0.15 %***	+20 h
U73122 3 μM	3.34 ± 0.10 %	0 h
PDBU 1 μM	4.51 ± 0.15 %***	-8 h

Tabla 21: Valores de VEM y de TER para los inhibidores de las rutas intracelulares en ausencia de agonistas en el proceso de migración celular en células inmortales SIRC. Valores expresados como media ± s.e.m. para ocho experimentos independientes. (+) representa el retraso en horas en relación al control, mientras que (-) representa la aceleración sobre los valores control. (-)Bleb: (-)Blebbistatina; Bis-I: Bisindolilmaleimida-I, *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$ vs. control).

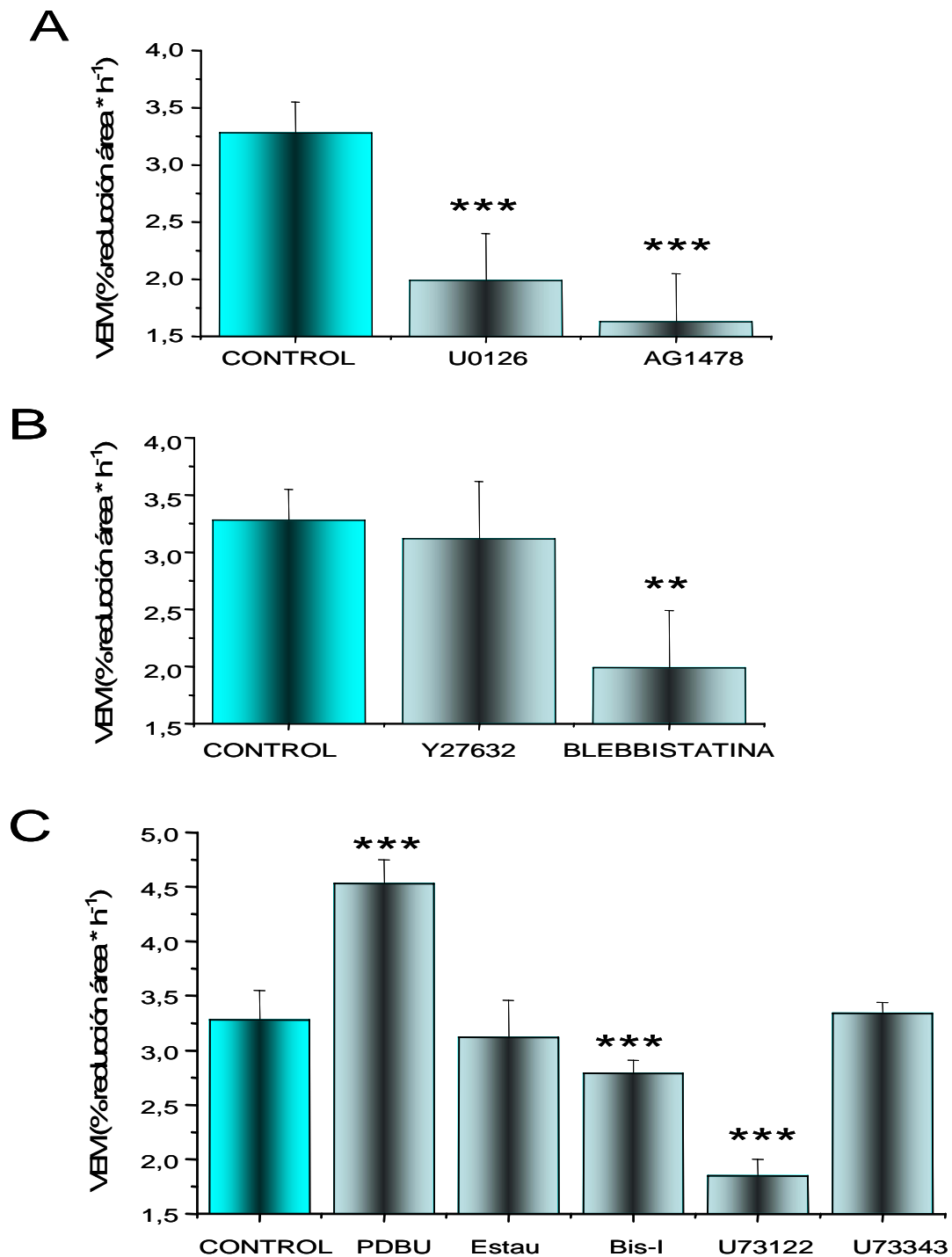


Figura 31: Efecto de los inhibidores de MAPK, citoesqueleto de actina y PLC/PKC en la migración celular en células SIRC. (A) Variación de VEM en % reducción área * h⁻¹ tras el pre-tratamiento con los inhibidores de Tirosin Quinasa y MAPK. (B) Variación de VEM en % reducción área * h⁻¹ en ensayos de migración en presencia de los inhibidores de la ruta del citoesqueleto de actina. (C). Variación de VEM en % reducción área * h⁻¹ en ensayos de migración en presencia de los agonistas e inhibidores de la vía PLC / PKC. (Estau: Estaurosporina, Bis-I: Bisindolilmaleimida-I, *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p = < 0.1$ vs. control).

Por tanto, podemos decir que tanto el cultivo primario como el cultivo inmortalizado, se comportan de la misma manera a nivel de migración celular tras lesionar la monocapa celular, ya que la respuesta generada en las células de la línea inmortal SIRC tras una lesión en cuanto al efecto que Ap_4A y Ap_3A tienen en la modulación de la migración celular, es idéntica a la respuesta que ocasionan estos dinucleótidos en células del cultivo primario lesionadas.

4.7.- ESTUDIOS DE SILENCIAMIENTO DEL RECEPTOR P2Y₂.

4.7.1.- Clonaje del receptor P2Y₂.

Para determinar el papel del receptor nucleotídico P2Y₂ en la migración celular del epitelio corneal de conejo inducida por Ap_4A mediante la tecnología del siRNA, hemos clonado previamente el ADNc de este receptor de conejo. Basándonos en las regiones conservadas de las secuencias codificantes para los receptores P2Y₂ de humano, rata, ratón y cerdo, se diseñan oligonucleótidos generados para realizar experimentos de RT-PCR con ARN total extraído de células SIRC. Tras la secuenciación de los productos de PCR, un nuevo par de oligonucleótidos se diseñan para obtener la información de la secuencia contigua. Finalmente, las secuencias obtenidas tras la realización de una nueva RT-PCR, se emplean para diseñar oligonucleótidos específicos para el receptor P2Y₂ de conejo, y facilitar la amplificación del extremo 5' de ADNc (5'RACE). El ensamblaje de las secuencias obtenidas da como resultado una secuencia de 1131 pb (número de acceso al GenBank **EU886321**). Las búsquedas en las bases de proteínas revelan que la secuencia deducida tiene una homología de secuencia de aminoácidos del 93 % con las proteínas P2Y₂ conocidas (Figura 32).

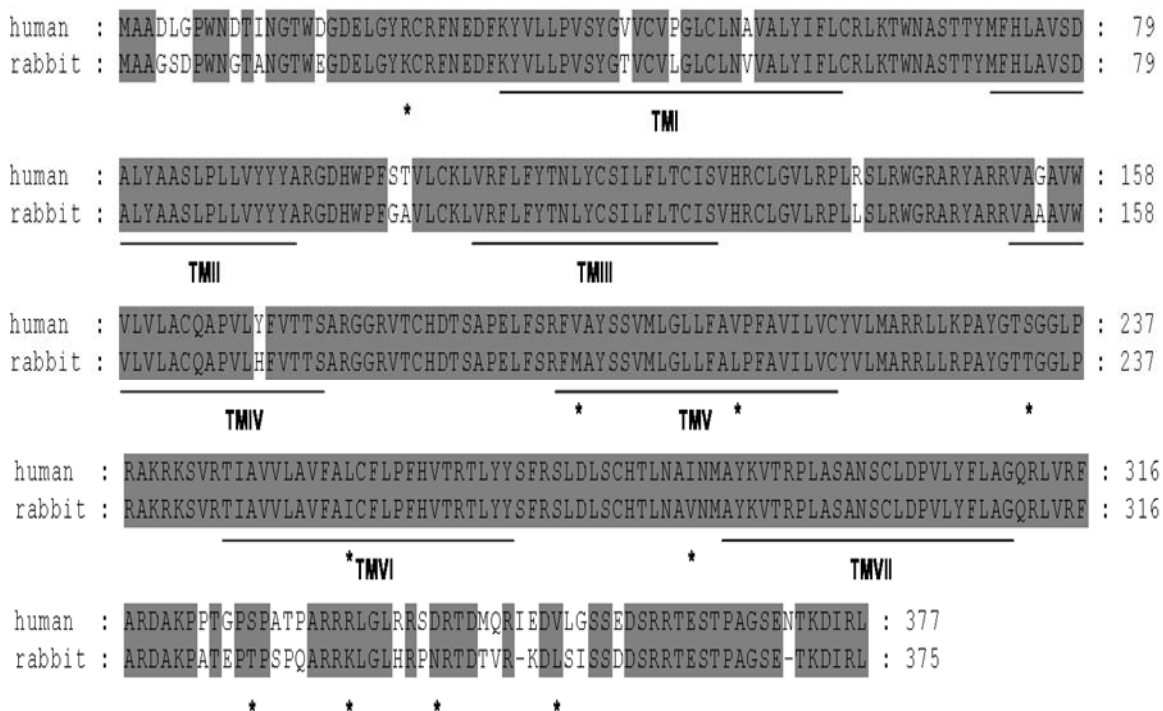


Figura 32: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de receptor $P2Y_2$ de conejo clonado con la secuencia del receptor $P2Y_2$ humano. Los aminoácidos idénticos están sombreados y las sustituciones conservativas están sombreadas y marcadas con *. Interrupciones (-) se introducen para un mejor alineamiento. Dominios transmembrana se indican con las líneas continuas (TM I a TM VII). Las búsquedas en las bases de datos de proteínas revelan que la secuencia deducida tiene una elevada homología con la secuencia de aminoácidos del receptor $P2Y_2$ (93%). **Números de acceso del GenBank:** EU886321 (conejo) y NP_788086.1 (humano).

4.7.2.- Estudios *in vitro*.

4.7.2.1.- Transfección de las células “SIRC”.

4.7.2.1.1.- Validación del método de transfección.

Para confirmar la transfección del siR NA, incubamos las células SIRC durante 24 horas con 30 nM de un siRNA que no reconoce ningún gen de mamífero y que está marcado con una sonda fluorescente en el extremo 5' (siRNA para el Control Negativo marcado con Cy3™). Tras lavar con PBS 1X los cultivos y fijarlos con PFA 4 %, visualizamos la fluorescencia bajo el microscopio. La presencia de células positivas

para Cy3 indican la transfección satisfactoria del siRNA (Figura 33A). La detección de los núcleos celulares se realiza con un marcaje con PicoGreen (Figura 33B). La Figura 33C nos muestra la muestra celular por Nomarski en la cual vemos que la viabilidad celular es buena. Por último, en la Figura 33D encontramos la co-localización de la señal para Cy3 con la señal para el marcador nuclear Pico Green, lo que nos indica la perfecta transfección de las células con este siRNA.

Además, ensayos de viabilidad celular con Azul Tripán han demostrado que bajo estas condiciones de transfección, las células SIRC no se afectan significativamente (81 % de viabilidad celular).

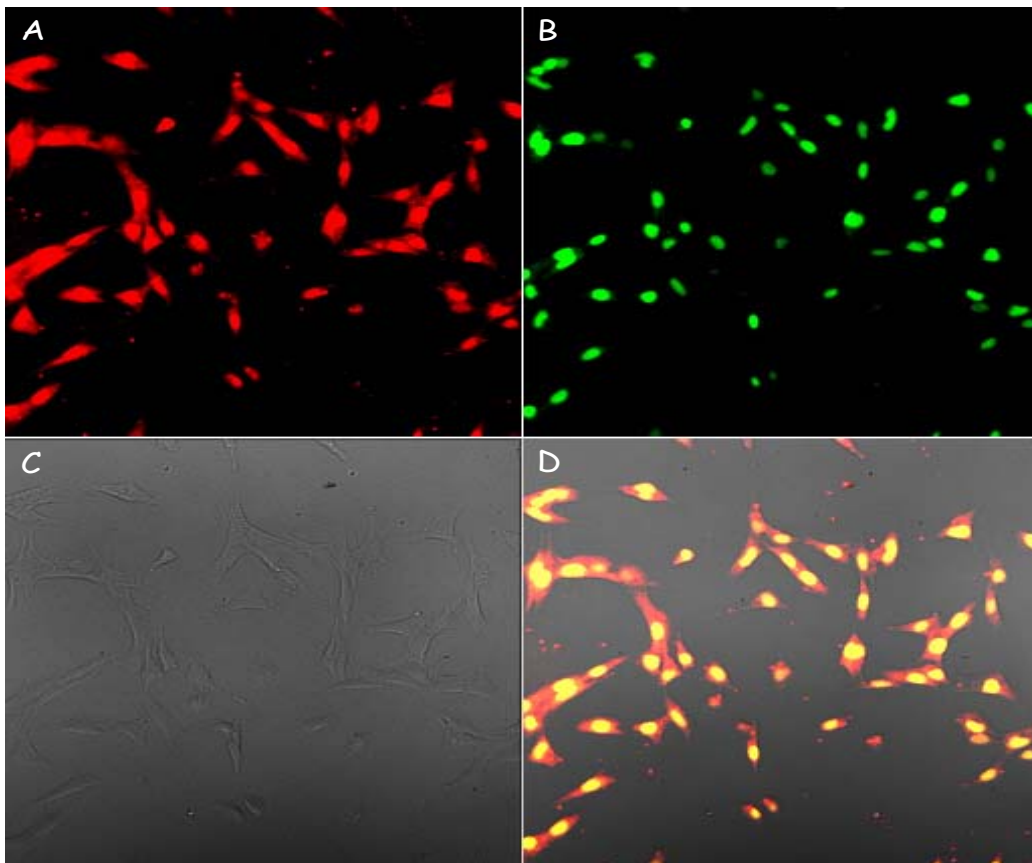


Figura 33: Eficiencia de transfección de las células SIRC. Células SIRC transfectadas con 30 nM de Cy3-siRNA, a las 24 horas de la transfección. (A) localización de Cy3-siRNA en el interior de células SIRC. (B) detección de los núcleos de células SIRC con PicoGreen. (C) visualización de células SIRC por Nomarski. (D) co-localización de Cy3-siRNA y núcleos. Fluorescencia roja, Cy3; fluorescencia verde, PicoGreen. Imágenes tomadas a 40X aumentos.

4.7.2.1.2.- Eficiencia de silenciamiento para el siRNA del receptor P2Y₂. Inmunocitoquímica para P2Y₂.

Para verificar la eficiencia de los siRNA diseñados en el silenciamiento del receptor P2Y₂, se realizan ensayos de Inmunocitoquímica siguiendo el protocolo descrito en Material y Métodos.

Pasadas 72 horas de la transfección de las células con 300 nM P2Y₂ siRNA #1, 300 nM P2Y₂ siRNA #2 o con el agente de transfección siPORT solo (Control), observamos como tras la transfección con el P2Y₂ siRNA #1 no se produce una reducción en la señal para P2Y₂ cuando lo comparamos con las condiciones control en las cuales empleamos solo el agente de transfección siPORT (Figura 34A). Sin embargo, cuando transfectamos las células con el P2Y₂ siRNA #2, encontramos un marcado descenso en la señal para el receptor si lo comparamos con las células control (Figura 34A). Estos resultados indican que solo el P2Y₂ siRNA #2 tiene la capacidad de inhibir la expresión del receptor P2Y₂ en las células SIRC.

La cuantificación de la cantidad de receptor P2Y₂ no silenciado se realiza mediante la medida de la intensidad de la señal fluorescente tanto en los casos control como en las células transfectadas con el siRNA #2. En la Figura 34B encontramos la gráfica que detalla la señal para el receptor P2Y₂ medida en cada caso. Como podemos observar, la señal de receptores en las células control es de 1698.82 ± 12.66 (niveles de fluorescencia en unidades arbitrarias, UA), mientras que en las células transfectadas con el P2Y₂ siRNA #2 tienen una señal para P2Y₂ de 547.04 ± 6.78 UA.

Estos datos indican que los niveles de la proteína P2Y₂ se reducen aproximadamente un 68 % en relación a los valores control, cuando tratamos con el P2Y₂ siRNA #2.

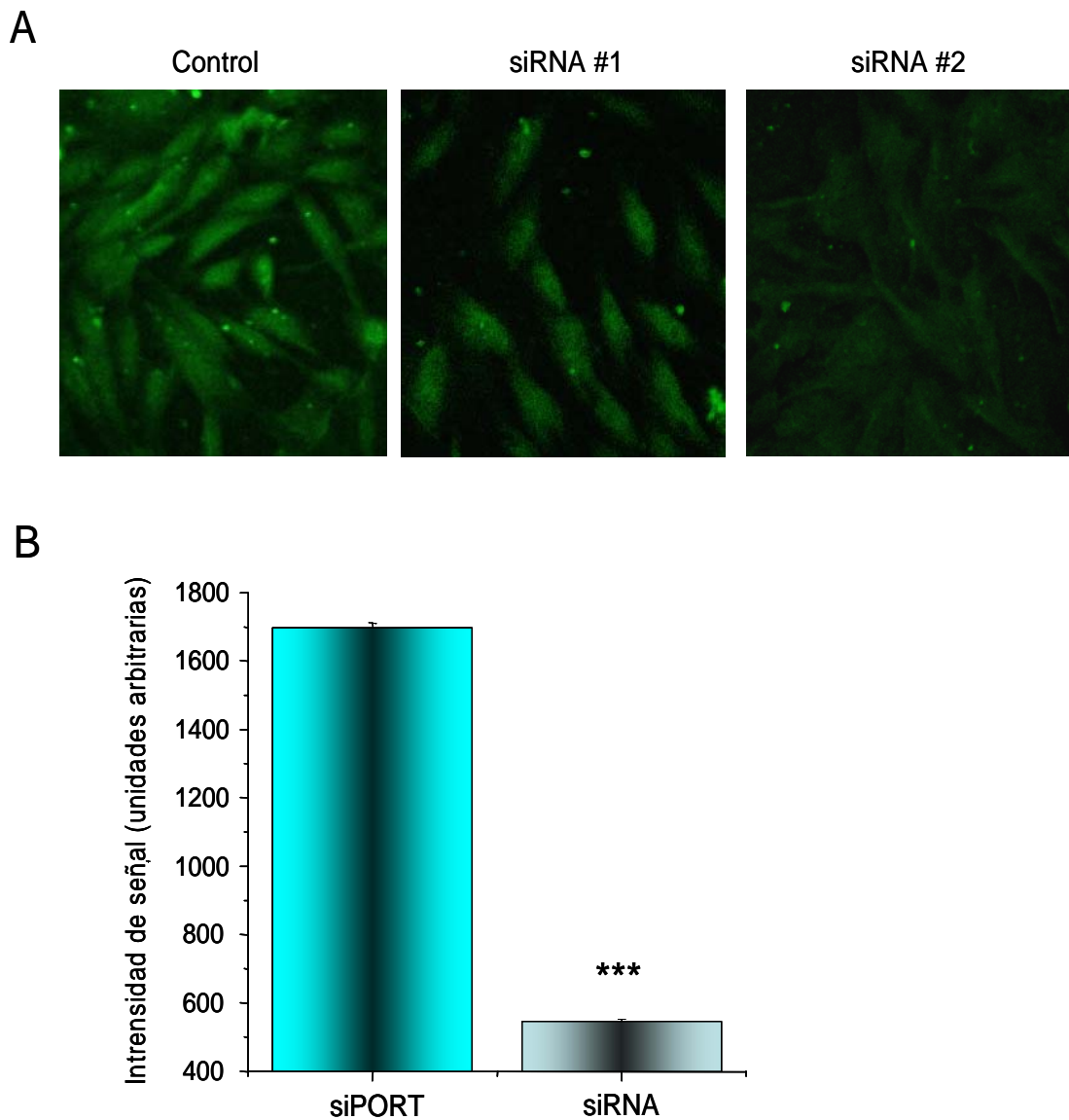


Figura 34: Immunolocalización del receptor $P2Y_2$ en células SIRC transfectadas con $P2Y_2$ siRNA. (A) Las células SIRC se incuban durante 72 horas con el agente de transfección siPORT solo (control) o con los siRNA para $P2Y_2$ siRNA #1 y siRNA #2. Señal para $P2Y_2$ en verde. Imágenes tomadas a 40 X aumentos. (B) Cuantificación de la intensidad de señal para el receptor $P2Y_2$ en condiciones control y transfectadas con $P2Y_2$ siRNA #2 72 horas tras la transfección (***) $p < 0.001$ vs. control).

4.7.2.1.3.- Efecto del silenciamiento del receptor $P2Y_2$ en el proceso de migración celular *in vitro*.

En base a los resultados farmacológicos descritos en esta tesis doctoral, el efecto acelerador que el dinucleótido Ap_4A tiene en el proceso de migración celular del epitelio corneal lesionado está mediado por un receptor purinérgico $P2Y_2$.

Para conocer el papel exacto de este receptor en la migración activada por Ap_4A , realizamos un ensayo de migración en células transfectadas con $P2Y_2$ siRNA #1 y con $P2Y_2$ siRNA #2. Transcurridas 72 horas de la transfección de las células, lesionamos la monocapa celular y tratamos con Ap_4A , en las condiciones descritas anteriormente.

De los dos siRNA testados, observamos como cuando transfectamos con el $P2Y_2$ siRNA #1 (Figura 35), la migración celular se ralentiza mucho (VEM de 0.31 ± 0.27 %, en % reducción de área * h^{-1}) si lo comparamos tanto con el control transfectado con el agente de transfección siPORT solo (VEM de 1.08 ± 0.06 %, y un TER de 86 horas) como con las células transfectadas y tratadas con Ap_4A 100 μM (VEM de 3.03 ± 0.11 % y un TER de 30 horas), llegando incluso a no conseguir un descenso total de l área lesionada. Cuando transfectamos las células con el siRNA #1 y las tratamos con Ap_4A , observamos como la VEM de migración se ralentiza (VEM de 1.37 ± 0.21 % y un TER de 74 horas) si lo comparamos con las células transfectadas y tratadas con Ap_4A , pero cuando lo comparamos con las células transfectadas con el agente de transfección solo, observamos como se produce un aumento de VEM y una disminución de TER (Figura 35).

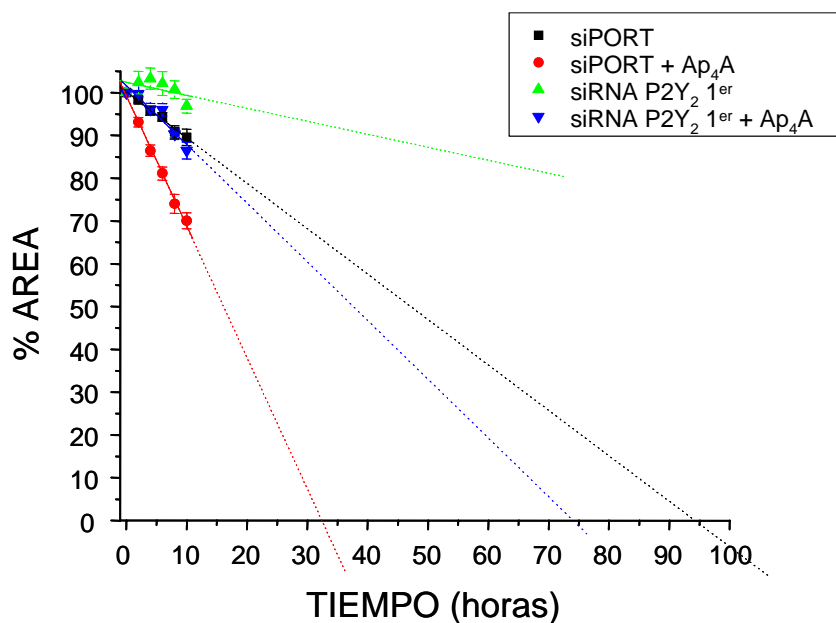


Figura 35: Efecto del $P2Y_2$ siRNA #1 en la migración del epitelio corneal de conejo inducida por Ap_4A . La gráfica refleja la variación del área lesionada en porcentaje frente al tiempo. Ap_4A acelera la migración de las células transfectadas con siPORT en comparación con las células transfectadas con el $P2Y_2$ siRNA en presencia de Ap_4A ($P2Y_2$ siRNA + Ap_4A).

El efecto que la transfección con el P2Y₂ siRNA #2 tiene en la migración celular está reflejado en la Figura 36. En la Figura 36A, encontramos una serie de imágenes que demuestran que la migración de las células transfectadas con el agente de transfección siPORT en presencia de Ap₄A, producen un aumento en la VEM, con el consecuente descenso en el TER, en comparación con las células control con el agente de transfección solo, y que cuando transfectamos las células con el P2Y₂ siRNA #2 en presencia de Ap₄A, retardamos la migración celular. Las gráficas de la Figura 36B reflejan la variación del área lesionada con el tiempo, así como la VEM para células control (transfectadas solo con el agente de transfección siPORT), para células transfectadas con el agente siPORT en presencia de Ap₄A (100 μM), y para las células transfectadas con el P2Y₂ siRNA #2 tanto en presencia como en ausencia del dinucleótido. Como podemos apreciar, Ap₄A aumenta de forma significativa la velocidad de migración (3.03 ± 0.11 %) cuando lo comparamos con el control (1.08 ± 0.06 %), lo que lleva acoplado un concomitante descenso en el TER, cerrando las lesiones tratadas con Ap₄A 56 horas antes que en ausencia de cualquier agonista. En el caso de las células tratadas con el P2Y₂ siRNA #2 y con el P2Y₂ siRNA #2 + Ap₄A, encontramos un fuerte descenso en la VEM en ambos casos (1.26 ± 0.21 % y 1.19 ± 0.10 % respectivamente), que lleva acoplado un aumento en el TER de 80 y 86 horas respectivamente, cuando lo comparamos con las células transfectadas con el agente de transfección siPORT en presencia de Ap₄A, siendo estos valores de VEM y de TER cercanos a los valores de las migraciones control.

Todos estos resultados confirman la eficacia de silenciamiento del receptor P2Y₂ del P2Y₂ siRNA #2, y además, confirman el papel de este receptor en la migración del epitelio corneal llevada a cabo por el dinucleótido Ap₄A.

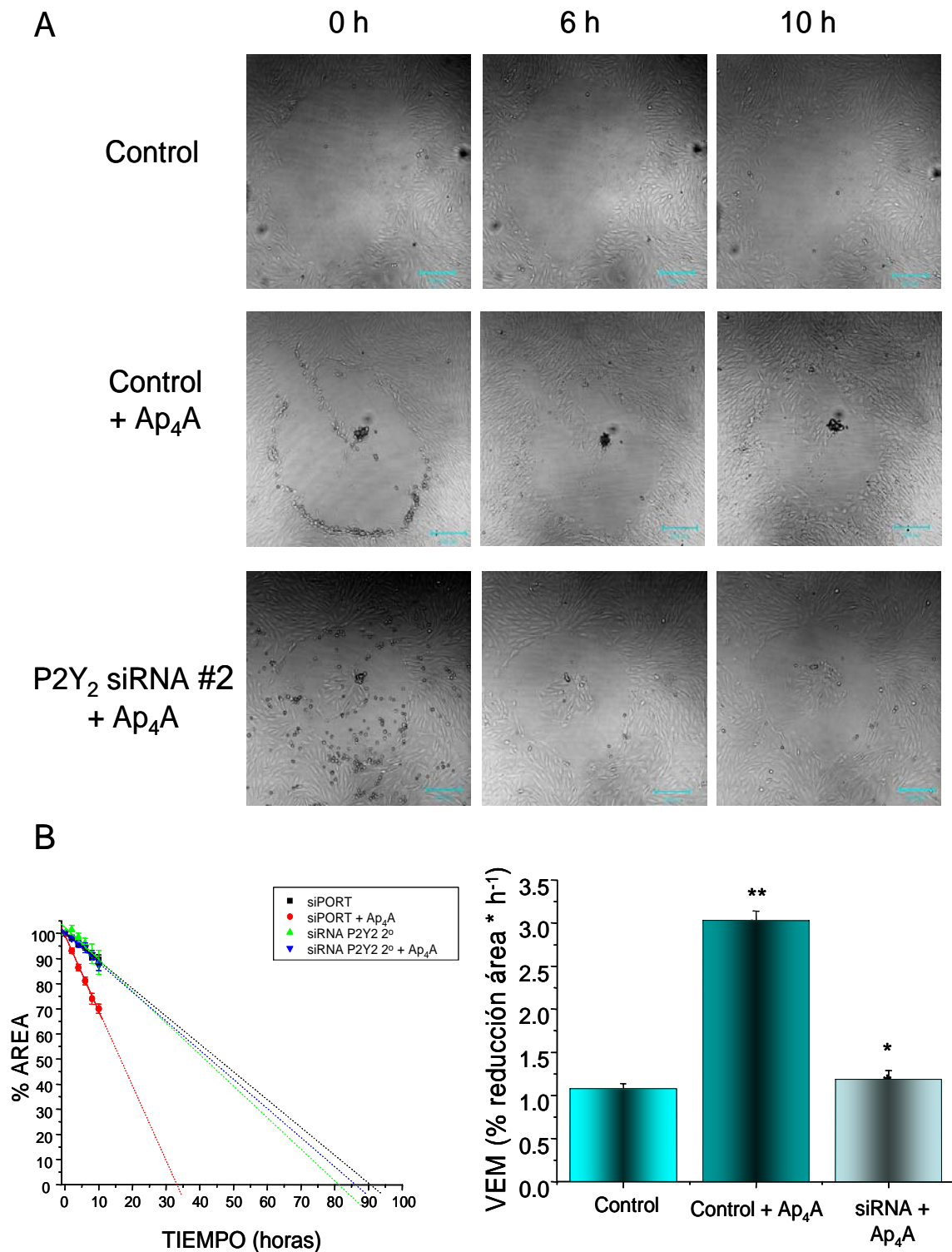


Figura 36: Efecto del P2Y₂ siRNA #2 en la migración del epitelio corneal de conejo inducida por Ap₄A. (A) Imágenes de células transfectadas control, en presencia de Ap₄A y en presencia de P2Y₂ siRNA + Ap₄A a tiempos 0, 6 y 10 horas posteriores a la lesión. (B) La gráfica refleja la variación del área lesionada en porcentaje frente al tiempo. Ap₄A acelera la migración de las células transfectadas con siPORT en comparación con las células transfectadas con el P2Y₂ siRNA en presencia de Ap₄A (P2Y₂ siRNA + Ap₄A). (***) $p < 0.0001$, (** $p < 0.001$ vs. control).

4.7.3.- Estudios *in vivo*.

4.7.3.1.- Validación de la transfección *in vivo*.

4.7.3.1.1.- Cuantificación de los niveles de ARNm para P2Y₂ por análisis de RT-PCRq.

Una vez validado el efecto de los siRNA para el receptor P2Y₂ *in vitro*, estudiamos el efecto que este mismo siRNA tiene en animales vivos.

La cuantificación de la eficiencia de silenciamiento por el siRNA #2 se ha estudiado por RT-PCRq de las muestras obtenidas por citología de impresión 48, 72 y 96 horas después de la primera instilación con el siRNA. Mediante esta técnica de citología de impresión se recogen las células superficiales del epitelio corneal, células en las que vamos a extraer el ARN para el estudio por RT-PCRq de los niveles de P2Y₂. La Figura 37 muestra un notable descenso en la expresión del ARNm para P2Y₂ tras 48 y 72 horas de la instilación de la primera dosis del siRNA, quedando respectivamente un 23.00 ± 5.65 % y 10.36 ± 4.47 % de expresión de ARNm para P2Y₂ en relación al control (100 %). Sin embargo, a las 96 horas de la primera instilación (36 horas después de la lesión corneal) la expresión del ARNm para este receptor recupera los niveles basales.

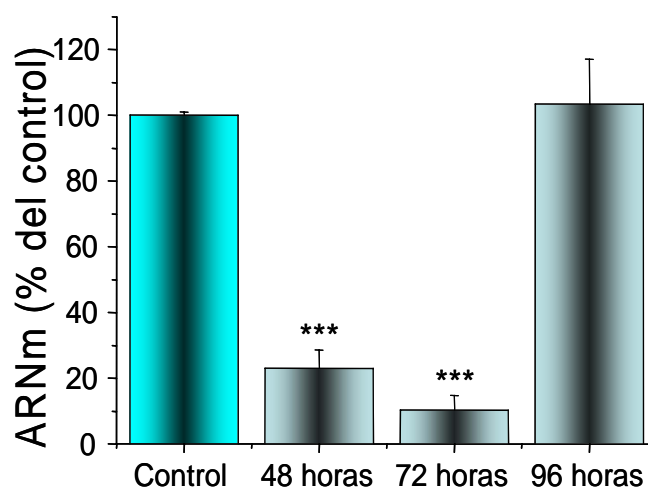


Figura 37: Cuantificación de los niveles de ARNm para P2Y₂ por análisis de RT-PCRq. Los valores relativos de expresión en las muestras tratadas con el siRNA vienen expresados en porcentaje en relación a las corneas control no tratadas (100 % de expresión) (***) $p < 0.001$ vs. control).

4.7.3.1.2.- Inmunocitoquímica para el receptor P2Y₂ en corneas intactas.

La disminución en la expresión del ARNm para el receptor P2Y₂ tras la instilación del siRNA, demuestra la eficiencia del silenciamiento del mismo.

Para localizar y estudiar el silenciamiento del receptor P2Y₂ en las corneas (control, tratamiento con Ap₄A y tratamiento con siRNA#2 + Ap₄A), sacrificamos los animales, enucleamos los ojos y diseccionamos las corneas a tiempos 12, 24 y 36 horas después de la lesión (de 72 a 96 horas de la primera instilación del siRNA), y realizamos un ensayo de inmunocitoquímica en el cual vamos a realizar una cuantificación cualitativa de la expresión del receptor, expresando los resultados en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA).

Como podemos apreciar en la Figura 38A, a las 24 horas de la lesión, la señal para el receptor P2Y₂ se localiza exclusivamente en la capa más externa del epitelio corneal, siendo esta señal algo mayor en las corneas control que en las tratadas con Ap₄A (1481.93 ± 34.20 UA para el control y 1149.46 ± 28.04 UA para Ap₄A). 36 horas tras la lesión, el marcaje para el receptor P2Y₂ es similar al descrito para las 24 horas (1400.05 ± 19.49 UA para el control y 1347.70 ± 19.95 UA para Ap₄A), siendo la localización de la señal la misma, es decir, la capa más externa del epitelio corneal. Cuando analizamos la señal del receptor en las corneas tratadas con el P2Y₂ siRNA #2 + Ap₄A, encontramos una reducción considerable a las 24 horas de la lesión (189.36 ± 10.73 UA) cuando lo comparamos tanto con las corneas control como con las tratadas con Ap₄A solo. El análisis de la señal para P2Y₂ en las corneas tratadas con P2Y₂ siRNA #2 + Ap₄A a las 36 horas de la lesión, demuestran una recuperación de la señal, siendo esta similar a la de las corneas control (1424.14 ± 14.13 UA) (Figura 38B). En relación con los resultados a las 12 horas tras la lesión, observamos como el marcaje para los tres tratamientos (control, Ap₄A y P2Y₂ siRNA #2 + Ap₄A) es similar al obtenido a las 24 horas (imágenes no mostradas).

Estos resultados indican que en nuestro modelo animal de lesión corneal, el silenciamiento del receptor P2Y₂ es efectivo hasta las 24 horas posteriores a la lesión, detectando una señal para este receptor similar al control 36 horas después de la lesión.

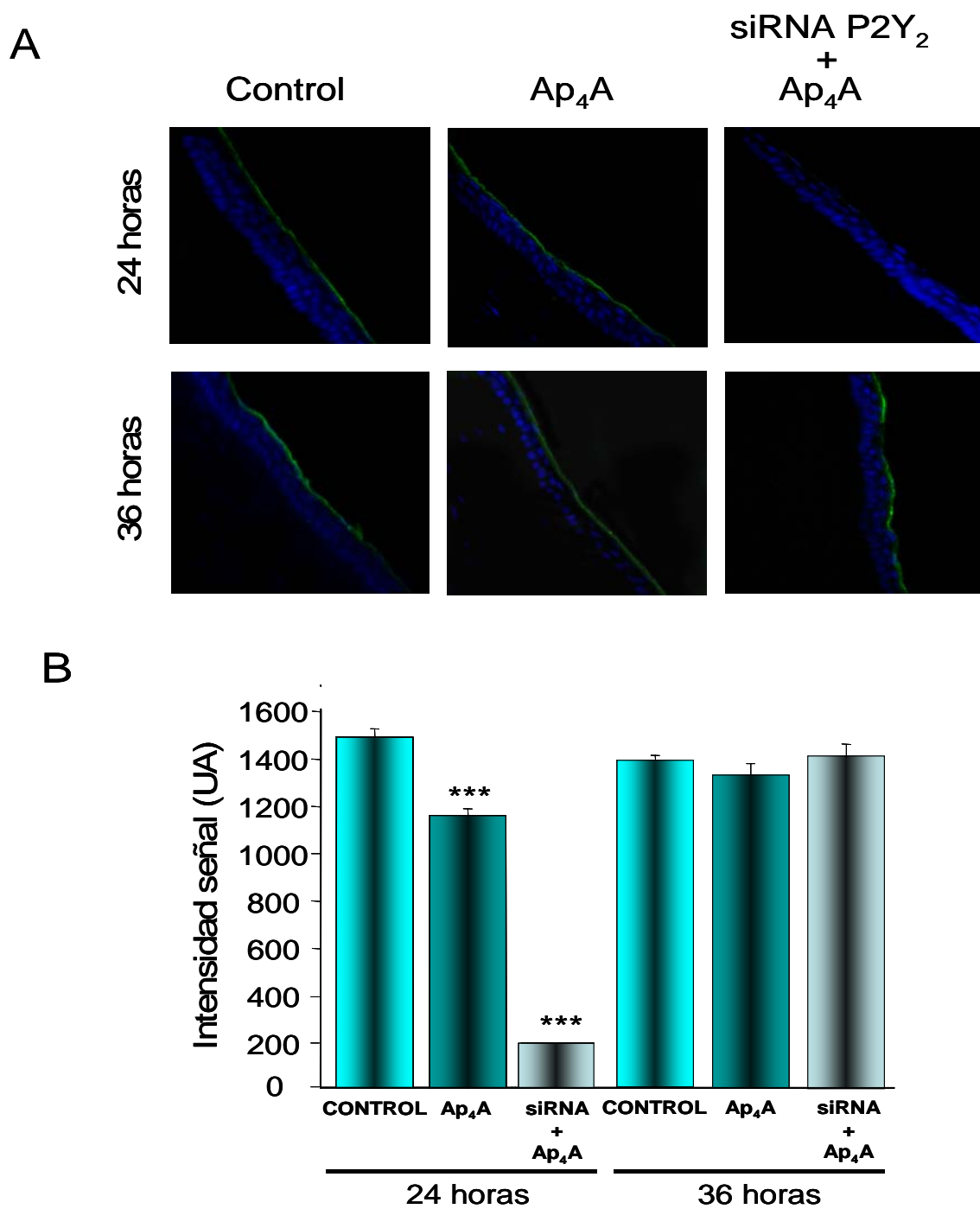


Figura 38: Inmunolocalización del receptor $P2Y_2$ en corneas tratadas con $P2Y_2$ siRNA #2. (A) Inmunolocalización del receptor $P2Y_2$ (en verde) en corneas control, Ap_4A y $P2Y_2$ siRNA #2 + Ap_4A . Imágenes tomadas a 40 aumentos. Núcleos contrastados con Dapi (azul). (B) Cuantificación de la intensidad de señal para el receptor $P2Y_2$ en condiciones control, Ap_4A y $P2Y_2$ siRNA #2 + Ap_4A las 24 y 36 horas posteriores a la lesión (***) $p < 0.001$ vs. control).

4.7.3.2.- Ensayos de migración *in vivo* tras el tratamiento con siRNA para P2Y₂.

Una vez validado el silenciamiento del receptor P2Y₂ mediante el empleo del P2Y₂ siRNA #2 en el periodo de tiempo comprendido hasta las 24 horas posteriores a la lesión (tiempo correspondiente a las fases de latencia y de migración del proceso de reepitelización corneal), queremos correlacionar los resultados obtenidos en los ensayos de migración *in vitro*, con el efecto que el silenciamiento de este receptor tiene en el proceso de migración *in vivo*. Para ello, seguimos el protocolo descrito en la sección de Material y Métodos: tras realizar tres instilaciones de 10 nM en un volumen de 40 µl del P2Y₂ siRNA #2 durante tres días, realizamos la lesión, y transcurrido el tiempo que dura la fase de latencia (10 horas), comenzamos el tratamiento con Ap₄A 100 µM e instilamos la cuarta dosis de siRNA, y tomamos imágenes de la lesión cada dos horas.

La Figura 39A, muestra una serie de imágenes del proceso de migración celular donde podemos apreciar el cierre de la lesión en corneas tratadas con NaCl 0.9 %, Ap₄A y con P2Y₂ siRNA #2 + Ap₄A a las 0, 10, 16 y 22 horas posteriores a la lesión. Como podemos observar, tras el tratamiento con Ap₄A, la migración celular se acelera en comparación con la migración del epitelio corneal tratado con NaCl 0.9 %, mientras que el pre-tratamiento con P2Y₂ siRNA #2 + Ap₄A, produce un retardo considerable en la migración del epitelio corneal lesionado.

Esto también podemos apreciarlo en la Figura 39B, donde encontramos dos gráficas. La gráfica de la izquierda representa la variación del área lesionada con el tiempo, mientras que la derecha representa la velocidad estimada de migración (VEM) para cada uno de los tratamientos implicados. Ap₄A 100 µM aumenta significativamente la VEM (2.44 ± 0.10 %) si lo comparamos con la VEM de las lesiones control (1.55 ± 0.19 %), todo esto acoplado a un descenso en el tiempo estimado de cierre (TER) (de 76 horas para el control a 55 horas para Ap₄A). Por el contrario, el pre-tratamiento con el P2Y₂ siRNA #2 produce un gran retardo en la VEM (1.03 ± 0.08 %) lo que conlleva un incremento en el TER necesario para cerrar la herida hasta las 109 horas.

Todos estos resultados indican la implicación del receptor $P2Y_2$ en la modificación de la migración del epitelio corneal de conejo señalizado por Ap_4A .

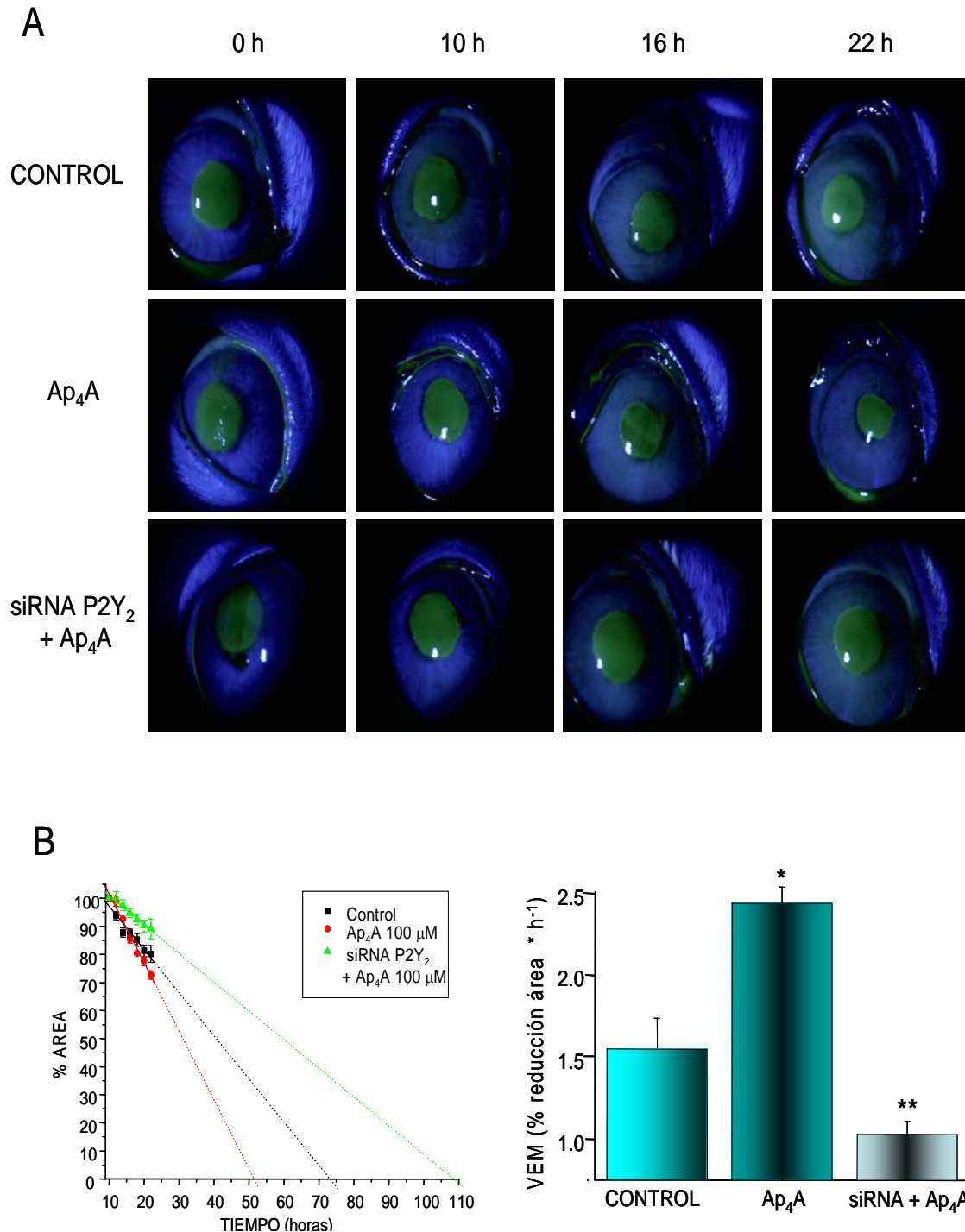


Figura 39: Efecto del silenciamiento del receptor $P2Y_2$ en la migración del epitelio corneal señalizada por Ap_4A . (A) Secuencia de imágenes del proceso de migración celular tomadas a tiempos 0, 10, 16 y 22 horas para corneas control y corneas tratadas con Ap_4A 100 μM y $P2Y_2$ siRNA #2 + Ap_4A 100 μM . (B) Gráficas mostrando la variación del área lesionada frente al tiempo y la velocidad estimada de migración (VEM) en los tres tratamientos (** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ vs. control).

4.8.- ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INTRACELULARES IMPLICADOS.

4.8.1.- Ensayos de Western Blot para las proteínas pERK1/2 y ROCK-I:

Activación de las rutas de las MAPK y del Citoesqueleto de actina.

Para confirmar la activación de las rutas intracelulares estudiadas en los ensayos de migración, pERK1/2 y ROCK-I se estudiaron mediante ensayos de Western Blot. Estos experimentos se realizan en monocapas de células de la línea inmortal SIRC lesionadas e incubadas con Ap₄A o Ap₃A 100 μM solas o pre-tratadas con los antagonistas de los receptores P2Y y los inhibidores de las rutas MAPK y RhoA / ROCK-I como hemos descrito en Material y Métodos.

Lo primero que hicimos fue estudiar la activación de pERK1/2 y ROCK-I a distintos tiempos (0 horas, 2, 5, 10, 15 y 30 minutos, y 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas).

En la Figura 40 encontramos representada la activación de pERK1/2 y de ROCK-I tras la activación con Ap₄A o Ap₃A 100 μM en función del tiempo durante un periodo de cuatro horas. Cuando estudiamos la activación de pERK1/2 en células de epitelio corneal lesionadas y en presencia de Ap₄A o Ap₃A 100 μM, observamos que Ap₄A promueve una activación de pERK1/2 rápida (5 minutos) y sostenida, con un máximo de activación sobre el control ($28.71 \pm 1.48 \%$) a los 30 minutos - 1 hora, tras lo cual la activación de esta proteína comienza a disminuir hasta las 10 horas de ensayo (Figura 40A). En el caso de Ap₃A 100 μM, la activación de pERK1/2 se comporta de forma oscilatoria, con máximos de activación sobre el control a la hora ($13.03 \pm 1.22 \%$) (Figura 40B).

El estudio de la activación de ROCK-I en epitelios lesionados tratados con Ap₄A 100 μM, nos indica que el máximo de activación de esta proteína lo conseguimos a los 15-30 minutos de la estimulación ($10.05 \pm 0.90 \%$) (Figura 40C), mientras que si estudiamos la estimulación de esta proteína en presencia de Ap₃A 100 μM, observamos una mínima estimulación ($3.24 \pm 0.92 \%$) a los 30 minutos de la aplicación del dinucleótido a la monocapa lesionada (Figura 40D).

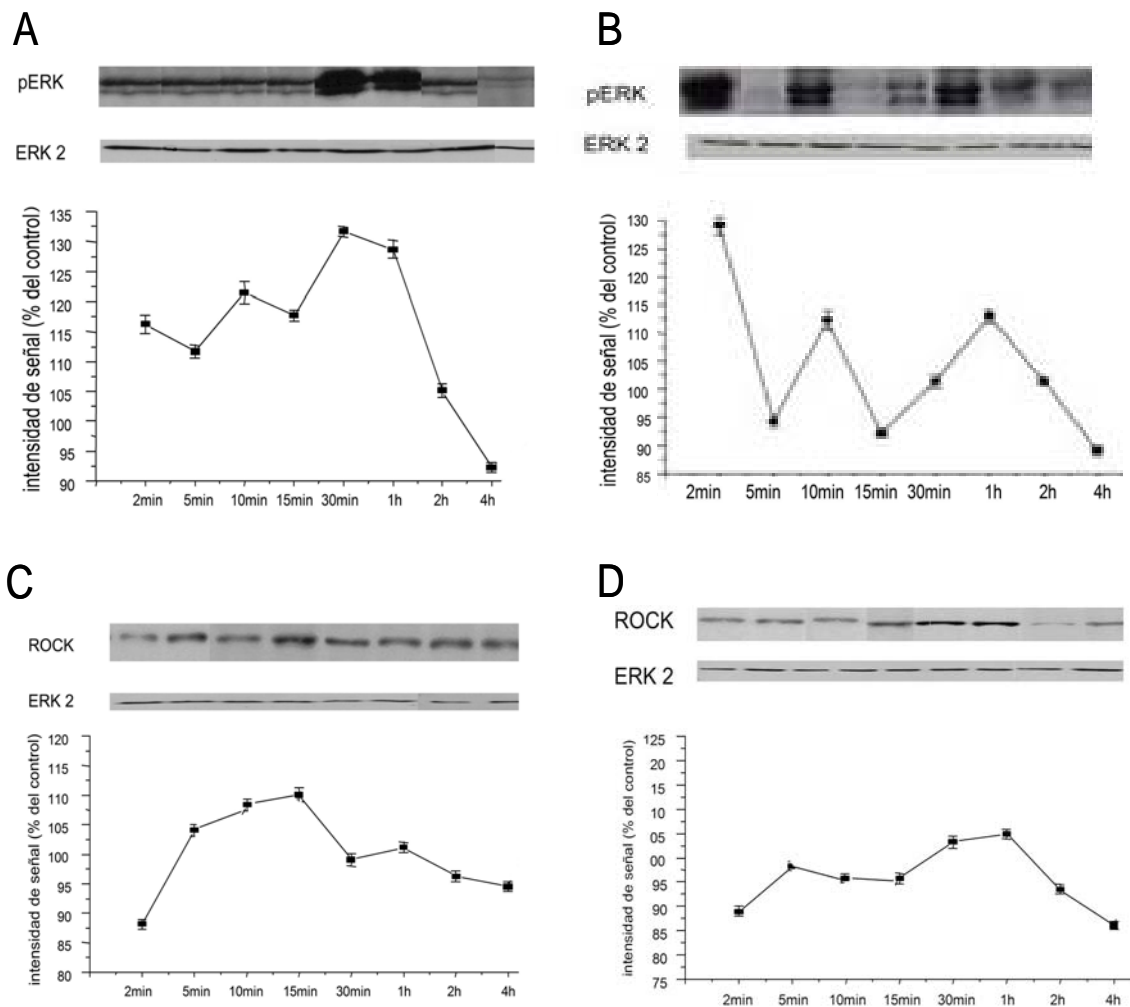


Figura 40: Activación de pERK1/2 y de ROCK-I tras incubación con Ap₄A o Ap₃A 100 μ M durante un periodo de tiempo de cuatro horas. (A) Activación a tiempos de pERK1/2 a tiempos tras incubación con Ap₄A en cultivo celular lesionado. (B) Activación a tiempos de pERK1/2 a tiempos tras incubación con Ap₃A en cultivo celular lesionado. (C) Activación a tiempos de ROCK-I a tiempos tras incubación con Ap₄A en cultivo celular lesionado. (D) Activación a tiempos de ROCK-I a tiempos tras incubación con Ap₃A en cultivo celular lesionado.

Una vez definidas las condiciones de tiempo máximo de activación para pERK1/2 y ROCK-I (1 hora y 30 minutos respectivamente), hemos realizado los ensayos de activación de pERK1/2 y ROCK-I en presencia de Ap₄A o Ap₃A 100 μ M con los diversos antagonistas de los receptores purinérgicos (suramina y RB-2 100 μ M respectivamente) y de los inhibidores de las rutas MAPK (U0126 100 μ M) y RhoA/ROCK-I (100 nM) siguiendo el protocolo descrito en Métodos.

Cuando estudiamos la activación de ERK1/2 en monocapas lesionadas y tratadas con Ap₄A solo, observamos un aumento en la fosforilación ($128.71 \pm 1.48 \%$) cuando lo comparamos con la fosforilación de ERK1/2 en condiciones control ($100 \pm 1.0 \%$). Cuando pre-tratamos las células con suramina, U0126 e Y27632, observamos que se producen cambios en la activación de pERK 1/2, siendo los valores de activación $91.35 \pm 1.18 \%$ para suramina, $74.97 \pm 0.42 \%$ para U0126 y $107.29 \pm 1.33 \%$ para Y27632 (Figura 41A). Cuando realizamos el mismo tipo de ensayos en presencia de los inhibidores de la ruta PLC / PKC, observamos como Estauosporina produce un descenso en la fosforilación de ERK1/2 ($94.46 \pm 1.41\%$), siendo este descenso no significativo, mientras que Bisindolilmaleimida-I y U73122 producen un descenso en pERK1/2 estadísticamente significativo ($87.91 \pm 1.01 \%$ para Bisindolilmaleimida-I y $90.47 \pm 1.28 \%$ para U73122). En el caso de su análogo inactivo U73343, observamos como los valores de fosforilación de ERK1/2 son similares al control ($99.76 \pm 1.49 \%$) (Figura 41B).

Cuando ensayamos el efecto que estos compuestos tienen sobre la activación de ROCK-I, si lo comparamos con la activación provocada por tratamientos con Ap₄A solo ($110.05 \pm 0.90 \%$), observamos que las tres sustancias reducen los valores de activación de ROCK-I, siendo estos de $104.19 \pm 2.89 \%$ para suramina, $93.11 \pm 0.98 \%$ para U0126 y $85.56 \pm 0.19 \%$ para Y27632 (Figura 41C). En cuanto a los resultados de activación de ROCK-I obtenidos con Estauosporina, Bisindolilmaleimida-I y U73122, observamos como en ambos casos, la activación de ROCK-I disminuye de forma significativa ($93.12 \pm 0.89 \%$ para Estauosporina, $94.67 \pm 0.68 \%$ para Bisindolilmaleimida-I y $94.15 \pm 0.89 \%$ para U73122). De nuevo, el análogo inactivo U73343, produce una activación de ROCK-I similar al control ($99.98 \pm 0.13 \%$) (Figura 41D).

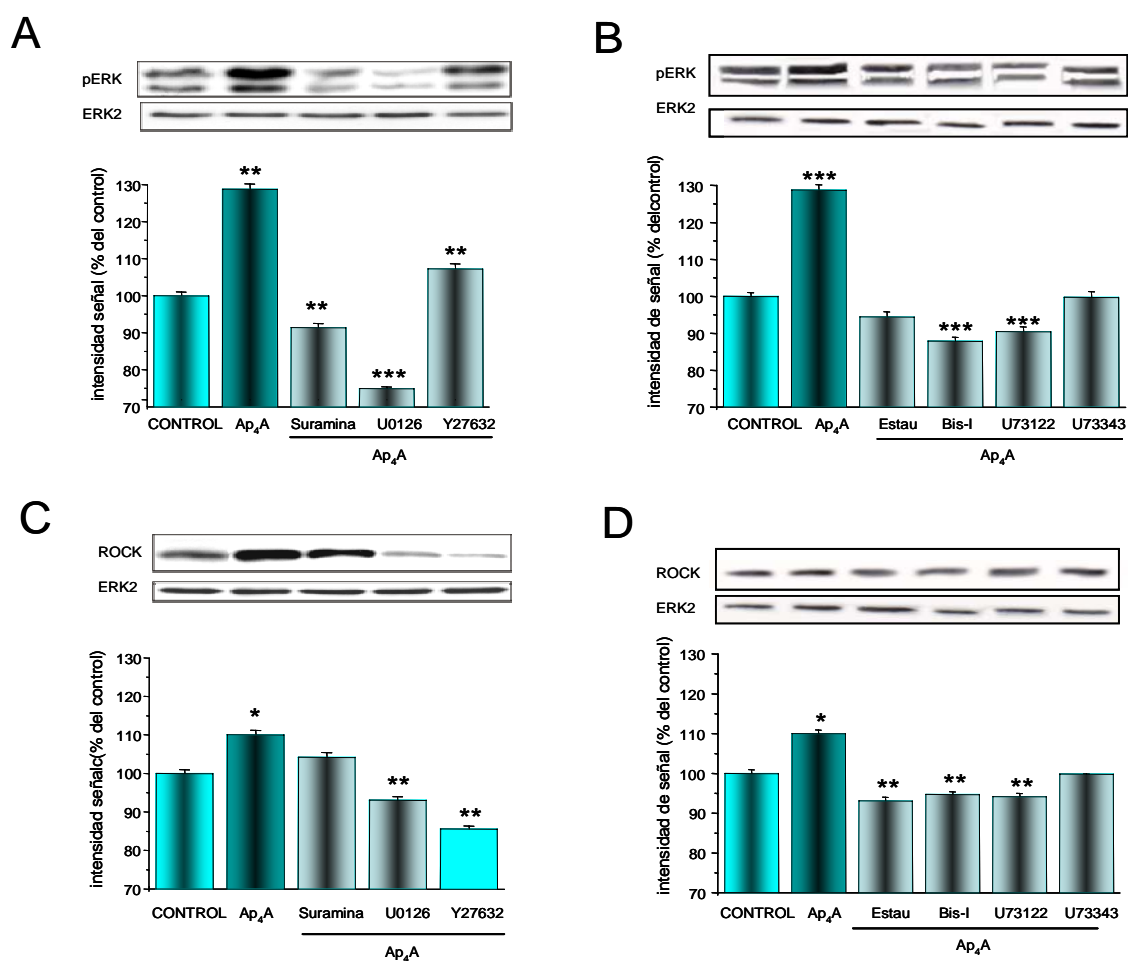


Figura 41: Activación de pERK1/2 y ROCK-I en presencia de Ap₄A con inhibidores. (A) Activación de pERK1/2 en presencia de suramina, U0126 e Y27632 en cultivo celular lesionado. (B) Activación de pERK1/2 tras el pre-tratamiento con los inhibidores de la vía de PLC / PKC en cultivo celular lesionado. (C) Activación de ROCK-I tras incubación con Suramina, U0126 e Y27632 en cultivo celular lesionado. (D) Activación de ROCK-I tras incubación con Estaurosporina, Bisindolilmaleimida-I, U73122 y U73343 en cultivo celular lesionado. (Estau: Estaurosporina, Bis-I: Bisindolilmaleimida-I, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, $p < 0.1$ vs. control).

El mismo tipo de experimentos se ha realizado en presencia de Ap₃A. Este dinucleótido, en ausencia de ningún inhibidor, produce un aumento en la fosforilación de ERK1/2 de 113.03 ± 1.22 %, y los pre-tratamientos con RB-2 y U0126 producen una reducción en la fosforilación de ERK1/2, que dando estos niveles de fosforilación en 84.41 ± 0.58 % para RB-2 y 72.47 ± 0.18 % para U0126. Cuando testamos el efecto que el pre-tratamiento con el inhibidor Y27632 tiene sobre los niveles de fosforilación de ERK1/2 causados por Ap₃A, observamos un aumento en el mismo (122.63 ± 0.39 %) (Figura 42A).

Como vemos en la Figura 42B, es posible apreciar una reducción en la activación de ROCK-I tras los pre-tratamientos con RB-2 y U0126 ($95.97 \pm 3.24 \%$ y $91.20 \pm 0.78 \%$ respectivamente), cuando lo comparamos con los valores de activación de ROCK-I tras el tratamiento con Ap_3A solo ($103.24 \pm 0.92 \%$). Sin embargo, el pre-tratamiento con Y27632 produce un aumento en la activación de ROCK-I ($113.35 \pm 0.33 \%$).

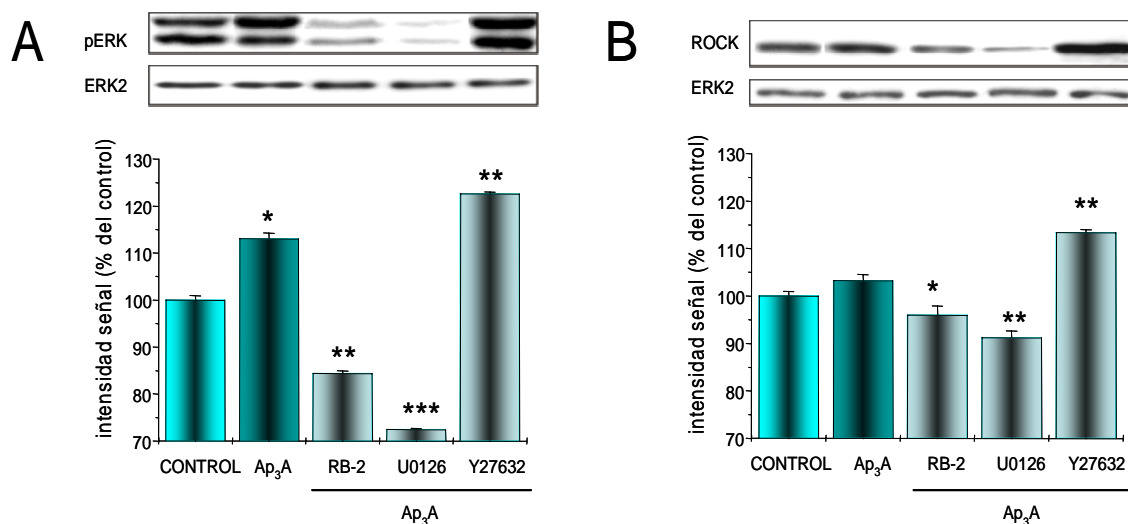


Figura 42: Activación de pERK1/2 y ROCK-I en presencia de Ap_3A 100 μM con antagonistas. (A) Activación de pERK1/2 en presencia de RB-2, U0126 e Y27632 en cultivo celular lesionado. (B) Activación a tiempos de ROCK-I tras incubación con RB-2, U0126 e Y27632 en cultivo celular lesionado (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, $p < 0.1$ vs. control).

Cuando estudiamos la activación tanto de ERK1/2 como de ROCK-I tras tratamiento de las lesiones con los antagonistas e inhibidores anteriores solos, observamos que tanto suramina como RB-2, U0126 e Y27632, producen un descenso estadísticamente significativo en la fosforilación de ERK1/2 ($90.23 \pm 1.0 \%$ para suramina, $88.02 \pm 1.47 \%$ para RB-2, $69.8 \pm 0.16 \%$ para U0126 y $92.31 \pm 0.70 \%$ para Y27632) (Figura 43A). La fosforilación de ERK1/2 también se ve disminuida en presencia de Estaurosporina, Bisindolilmaleimida-I y U73122 ($72.56 \pm 0.87 \%$, 76.16 ± 1.37 y $97.19 \pm 1.36 \%$ respectivamente), siendo estadísticamente significativo este descenso en el caso de Estaurosporina y Bisindolilmaleimida-I. De nuevo, el inhibidor inactivo U73343 tiene una activación de pERK1/2 similar al control ($99.25 \pm 1.49 \%$),

mientras que el agonista PDBU produce un aumento no significativo en la fosforilación de ERK1/2 (104.37 ± 0.52 %) (Figura 43B).

Cuando analizamos la activación de ROCK -I, los antagonistas e inhibidores suramina, RB-2, U0126 e Y27632 producen un efecto similar, todos ellos reducen de forma significativa la activación de esta proteína (88.86 ± 0.86 % para Suramina, 89.73 ± 0.54 % para RB-2, 91.22 ± 1.08 % para U0126 y 85.01 ± 1.28 % para Y27632) (Figura 43C). Estaurosporina, Bisindolilmaleimida-I y U73122 producen también un descenso en la activación de ROCK-I (96.21 ± 0.88 %, 98.71 ± 0.76 % y 91.61 ± 0.54 % respectivamente), siendo U73122 el único que produce un descenso significativo en la activación. En cuanto al agonista PDBU, observamos un aumento significativo en la activación de ROCK-I (107.72 ± 1.09 %) (Figura 43D).

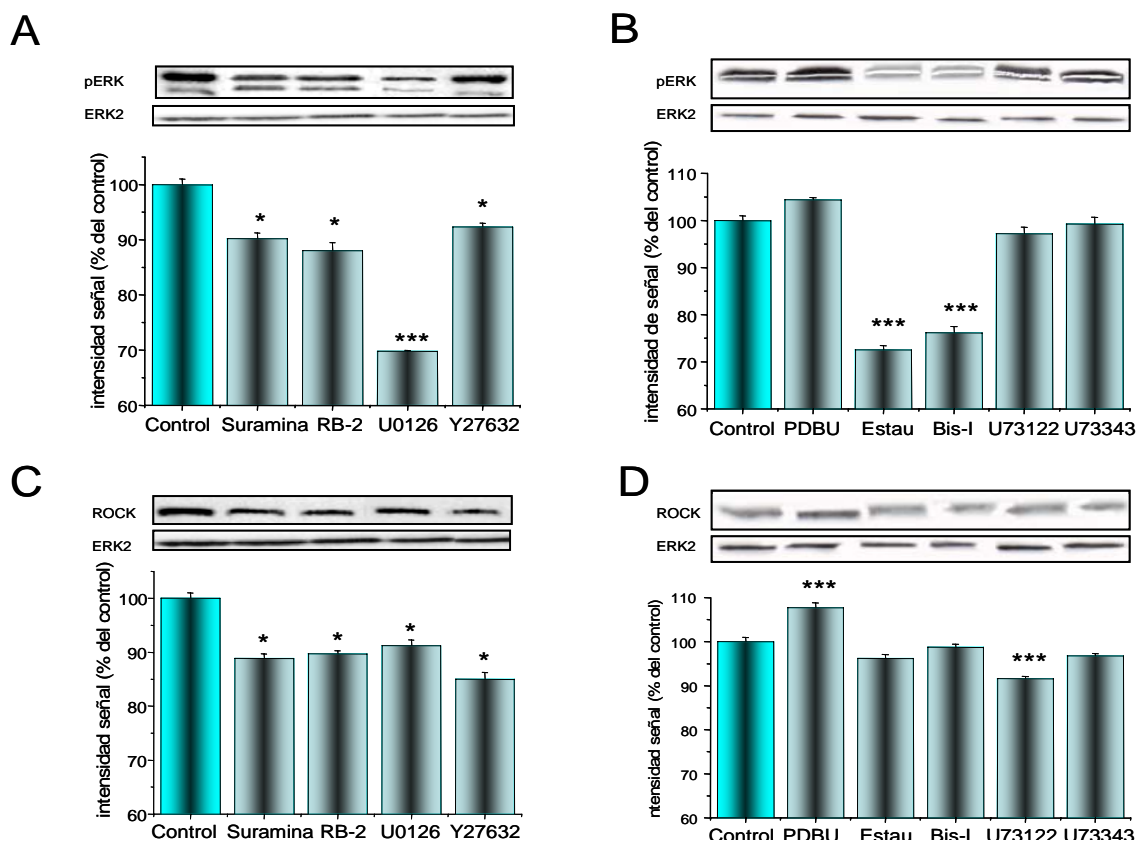


Figura 43: Activación de pERK1/2 y ROCK-I tras tratamiento con los inhibidores en ausencia de agonistas. (A) Activación de pERK1/2 en presencia de suramina, RB-2, U0126 e Y27632. (B) Activación de pERK1/2 tras el pre-tratamiento con los inhibidores de la vía de PLC / PKC. (C) Activación de ROCK-I tras incubación con Suramina, RB-2, U0126 e Y27632. (D) Activación de ROCK-I tras incubación con Estaurosporina, Bisindolilmaleimida-I, U73122 y U73343 en cultivo celular lesionado. (Estau: Estaurosporina, Bis-I: Bisindolilmaleimida-I, *** $p < 0.001$, * $p < 0.1$ vs. control).

La activación de la ruta intracelular de Rho A / ROCK-I se ha confirmado mediante estudios de activación por fosforilación de la quinaasa de la cadena ligera de miosina (MLC2) puesto que esta proteína está por debajo de ROCK-I en la cascada. La Figura 44 muestra la fosforilación de MLC2 tras tratamiento de las lesiones con Ap₄A, Ap₃A, Y27632, Ap₄A/Y27632 y Ap₃A/Y27632. Ap₄A produce un aumento significativo en pMLC2 ($109.16 \pm 0.41\%$) si lo comparamos con la activación control ($100 \pm 1.0\%$), y esta activación es revertida de forma significativa cuando pre-tratamos las lesiones con el inhibidor de ROCK-I, Y27632 ($87.34 \pm 0.84\%$). Por último, tras el tratamiento con Ap₃A no observamos un incremento en la activación de pMLC2 ($101.82 \pm 0.91\%$).

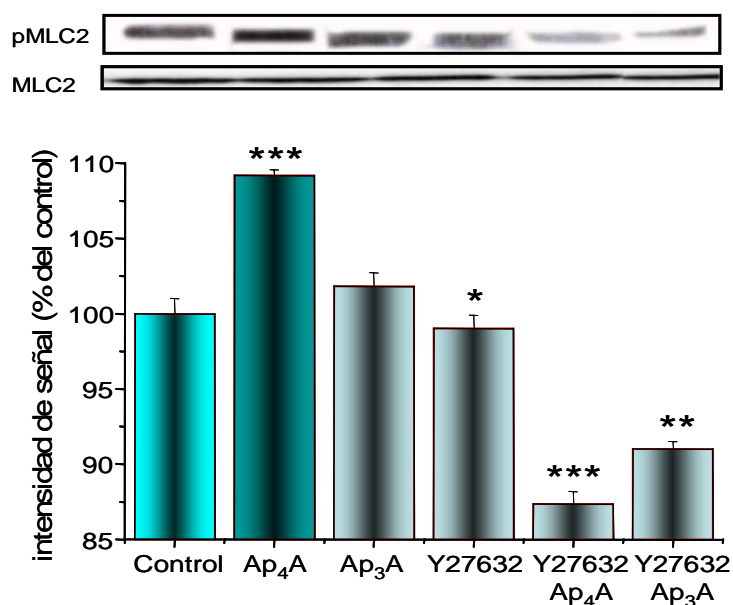


Figura 44: Activación de pMLC2 en presencia de Ap₄A o Ap₃A 100 μ M y en presencia o ausencia de Y27632. (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.1$ vs. control).

4.8.2.- Ensayos de Western Blot para la proteína p38.

Como hemos visto, Ap₃A produce un efecto retardante en la migración del epitelio corneal lesionado. Además, hemos visto que cuando evitamos la activación de la ruta de las MAPK mediante el empleo del inhibidor de la misma, U0126, se produce un efecto acelerador en la velocidad de migración de los cultivos epiteliales lesionados. Para conocer si el efecto de Ap₃A en la migración epitelial es consecuencia de alguna interacción de la vía de las MAPK con alguna otra vía intracelular, hemos estudiado la

posible interacción de la ruta de ERK1/2 con de la ruta de p38. Para ello, hemos tratado las monocapas lesionadas con Ap₃A 100 μM y pre-tratando con los inhibidores de ambas vías (U0126 para ERK1/2 y SB203580 para p38) de la manera descrita en la sección de Material y Métodos y hemos realizado ensayos de Western Blot para estudiar la activación de ambas proteínas en los casos estudiados.

Como podemos observar, la activación de pp38 tras el tratamiento con Ap₃A aumenta transcurrida una hora de la incubación con el dinucleótido ($105.68 \pm 0.76 \%$), siendo el aumento de fosforilación máximo entre las dos y las cuatro horas de incubación (118.25 ± 1.3 y 116.99 ± 1.68 respectivamente) (Figura 45A). Estos resultados se correlacionan con el descenso en la activación de pp38 tras el pre-tratamiento con SB203580 en presencia de Ap₃A, observando como la fosforilación comienza a descender a la hora de la incubación ($95.42 \pm 2.2 \%$) y es máxima a las cuatro horas (62.92 ± 0.79) (Figura 45B). Cuando pre-tratamos con U0126, no observamos ninguna modificación significativa en la activación de p38 (Figura 45C).

Cuando estudiamos la activación de la ruta de ERK1/2 que produce el dinucleótido Ap₃A en presencia del inhibidor de p38, SB203580, observamos un incremento en la fosforilación de ERK1/2 que comienza a los 5 minutos de la incubación ($119.61 \pm 1.12 \%$), siendo máximo a los 15 minutos ($126.38 \pm 0.82 \%$) y es estable hasta las dos horas posteriores, recuperando valores similares al control a las cuatro horas posteriores a la incubación ($107.06 \pm 1.13 \%$). Además, podemos observar que la activación de pERK1/2 tras la pre-incubación con SB203580 es mayor y más sostenida que la que se produce con el tratamiento de las lesiones corneales con Ap₃A solo (Figura 45D).

Todo esto está en consonancia con los resultados de migración celular en cultivo, donde hemos testado el efecto que el inhibidor SB203580 tiene en el retardo de la migración causado por Ap₃A. Como ocurre en el caso de la pre-incubación con el inhibidor de las ERK1/2, U0126, la pre-incubación con SB203580 100 μM produce una aceleración velocidad de migración (VEM) ($2.82 \pm 0.25 \%$) en relación con la VEM de Ap₃A ($1.22 \pm 0.10 \%$), siendo en este caso, la VEM de las monocapas lesionadas y pre-tratadas con SB2903580 menor a la VEM control ($4.23 \pm 0.15 \%$) (Figura 45E).

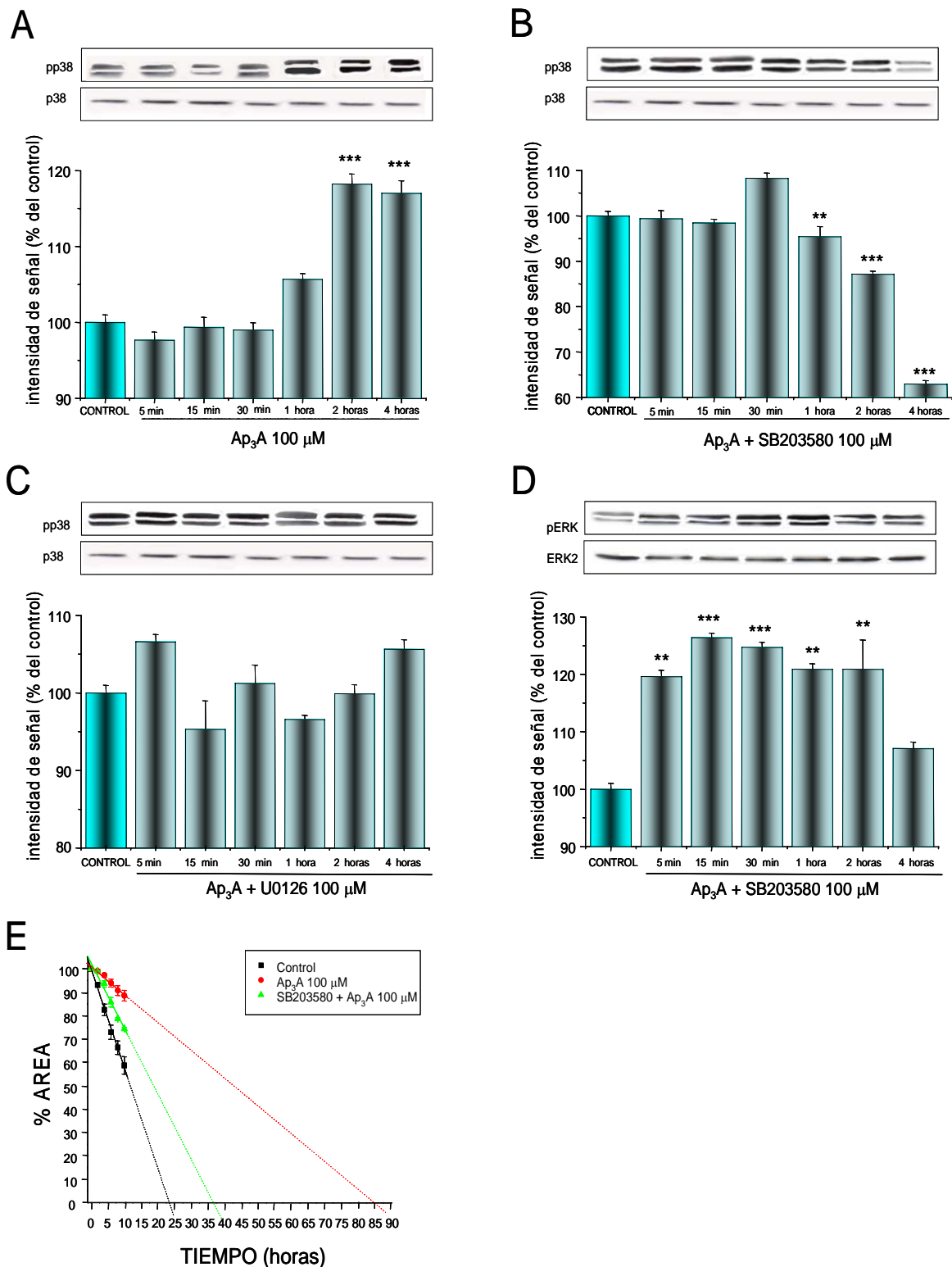


Figura 45: Activación de p38 y pERK1/2 en presencia de Ap₃A e inhibidores. (A) Activación de p38 con el tiempo en presencia de Ap₃A en cultivo celular lesionado. (B) Activación de p38 con el tiempo tras el pre-tratamiento con SB203580 en presencia de Ap₃A. (C) Activación de p38 con el tiempo tras el pre-tratamiento con U0126 en presencia de Ap₃A (D) Activación de pERK1/2 con el tiempo tras el pre-tratamiento con SB203580 en presencia de Ap₃A. (E) Migración celular de lesiones en cultivo de células SIRC tras el pre-tratamiento con SB203580. (***) $p < 0.001$, (**) $p < 0.01$ vs. control).

De algún modo que no conocemos, p38 es capaz de regular de forma negativa a pERK1/2 y evita la aceleración de la migración celular. Por eso, cuando pre-incubamos con el inhibidor de p38 se produce la aceleración en la velocidad de migración celular.

4.9.- INMUNOCITO QUÍMICA PARA pERK Y ROCK. ESTUDIO DE TRASLOCACIÓN AL NÚCLEO.

Hemos encontrado una respuesta inesperada sobre el inhibidor de MAPK (U0126) y su acción en la ruta de ROCK-I, y viceversa, la respuesta del inhibidor de ROCK-I (Y27632) sobre la ruta de pERK. Para poder explicar esta aparente incoherencia en los resultados, hemos investigado si existe alguna conexión entre ambas rutas intracelulares, puesto que hay diversas referencias bibliográficas en las que se indica la existencia de una relación entre ambas rutas de muy diversas maneras (Brunet et al., 1999; Pawlak et al., 2002; Roovers et al., 2003; Bessard et al., 2006).

De esta forma, hemos investigado la distribución celular de pERK1/2 en monocapas tratadas con Ap_4A y $Ap_4A/Y27632$. En condiciones control, localizamos principalmente pERK en el citoplasma celular sin co-localización con el marcador nuclear PicoGreen, lo que nos indica que en condiciones control, pERK no se trasloca al núcleo. Cuando tratamos las células con Ap_4A , vemos que la distribución de pERK1/2 sigue un patrón uniforme, marcando tanto citoplasma como núcleo, lo que viene corroborado por la buena co-localización con el marcador nuclear PicoGreen, lo que nos indica que pERK está siendo en parte traslocado al núcleo como indican varios autores (Brunet et al., 1999). Cuando estudiamos la distribución celular de pERK en células pre-tratadas con Y27632 en presencia de Ap_4A , observamos que el marcaje para pERK1/2 se localiza principalmente en el citoplasma celular, con muy poco marcaje en el núcleo (co-localización con PicoGreen es menor) (Figura 46A). La Figura 46B muestra la cuantificación de la señal para pERK en el citoplasma y en el núcleo de células control y de células tratadas con Ap_4A y $Ap_4A/Y27632$. Como podemos observar, la cantidad de pERK en el citoplasma de las células tratadas con Ap_4A es mayor que la cantidad de pERK en el citoplasma de las células tratadas con $Ap_4A/Y27632$ (1151.91 ± 7.26 y 1046.78 ± 9.97 respectivamente, en unidades arbitrarias (UA) de fluorescencia), siendo la cantidad de pERK en el citoplasma de las

células control la menor de todas (861.64 ± 13.31 UA). Lo mismo ocurre en el caso de la señal en el núcleo: la cantidad de pERK1/2 en los núcleos de las células controles es la menos intensa (3095.42 ± 7.19 UA para Ap₄A, 1871.27 ± 9.35 UA para Ap₄A/Y27632 y 328.56 ± 7.15 para los controles), lo que es consistente con la menor co-localización de PicoGreen y con la menor traslocación de pERK1/2 al núcleo.

El estudio de la localización de la señal de ROCK-I en condiciones control y tras tratamientos con Ap₄A y Ap₄A/U0126 (Figura 46C), observamos que la señal de ROCK-I se encuentra en el citoplasma de los tres tipos de condiciones, sin co-localización con el marcaje de PicoGreen en ninguno de los casos. Las células tratadas con Ap₄A presentan un mayor marcaje para ROCK-I en comparación con los otros tratamientos. El marcaje de ROCK-I para tratamientos de Ap₄A en presencia de U0126 es menos intenso que el marcaje en las células tratadas con Ap₄A. Cuando procedemos a la cuantificación de la señal de ROCK-I en el citoplasma y en el núcleo de las células (Figura 46D), observamos que en el citoplasma de las células tratadas con Ap₄A encontramos una señal más fuerte para ROCK-I (1038.77 ± 15.35 UA) que en el citoplasma de las células tratadas con Ap₄A/U0126 (907.78 ± 10.92 UA), y en las células control, esta señales intermedia (983.86 ± 6.17 UA). Lo mismo ocurre con la señal de ROCK-I en el núcleo celular: en las células tratadas con Ap₄A/U0126 esta señal es menos intensa (860.81 ± 10.01 UA) que en el núcleo de las células tratadas con Ap₄A (1219.52 ± 11.96 UA), siendo los núcleos controles los menos intensos de todos (738.70 ± 3.52 UA).

En el caso de Ap₃A, observamos que la localización de la señal de pERK1/2 tras los tratamientos con Ap₃A y Ap₃A/Y27632, se distribuye siguiendo un patrón uniforme y de una manera similar en ambos casos con una buena co-localización con el marcaje con PicoGreen, lo que significa que se trasloca al núcleo (Figura 46E). En las células control, pERK se localiza principalmente en el citoplasma sin co-localización con la señal de PicoGreen, lo que significa que en situaciones control, pERK no se trasloca al núcleo (Figura 46E). La Figura 46F revela que la cantidad de pERK en el citoplasma de las células tratadas con Ap₃A es muy similar a la cantidad de pERK en el citoplasma de las células tratadas con Ap₃A/Y27632 (988.11 ± 9.43 UA y 1017.00 ± 6.7 UA

respectivamente), mientras que en la situación control, la cantidad de pERK en el citoplasma celular es menor (861.64 ± 13.31 UA). En el núcleo, la presencia de pERK1/2 es significativamente elevada en ambos tratamientos (2062.35 ± 8.83 UA para Ap₃A y 1777.82 ± 5.77 UA para Ap₃A/Y27632) si lo comparamos con el marcaje en el núcleo de las células control (328.56 ± 7.15 UA).

Todos estos resultados han sido confirmados mediante análisis por Western Blot de pERK1/2 en las fracciones citoplasmática y nuclear respectivamente (Figura 47). Comparando las señales en las fracciones citoplasmáticas de las células control (100 ± 1.0 %) y las tratadas con Ap₄A y Ap₄A/Y27632, la señal de pERK en las células tratadas con Ap₄A aumenta de forma significativa (120.25 ± 1.37 %), al igual que en las células tratadas con Ap₄A/Y27632 (108.72 ± 1.59 %). En cuanto a la señal nuclear de pERK, observamos como esta incrementa de forma significativa en relación a las células control (114.90 ± 1.46 % para Ap₄A y 102.90 ± 1.70 % para Ap₄A/Y27632) (Figura 47A). Como se puede observar, el tratamiento con Y27632 produce un fuerte descenso en la traslocación de pERK al núcleo en relación con la señal de pERK en las células tratadas con Ap₄A (100 ± 1.0 %).

En el caso de la señal de ROCK-I, el tratamiento con Ap₄A produce un incremento significativo en la señal en la fracción citoplasmática (108.63 ± 0.61 %) comparando con las células control (100 ± 1.0 %), mientras que el tratamiento con Ap₄A/U0126 no afecta a la activación de ROCK-I (100.68 ± 0.54 %). La señalización nuclear de ROCK-I no se altera en las células tratadas con Ap₄A (101.24 ± 1.40 %), mientras que en las células tratadas con Ap₄A/U0126, la señalización nuclear desciende de forma significativa (88.77 ± 1.18 %) cuando lo comparamos con la situación control (100 ± 1.0 %) (Figura 47B).

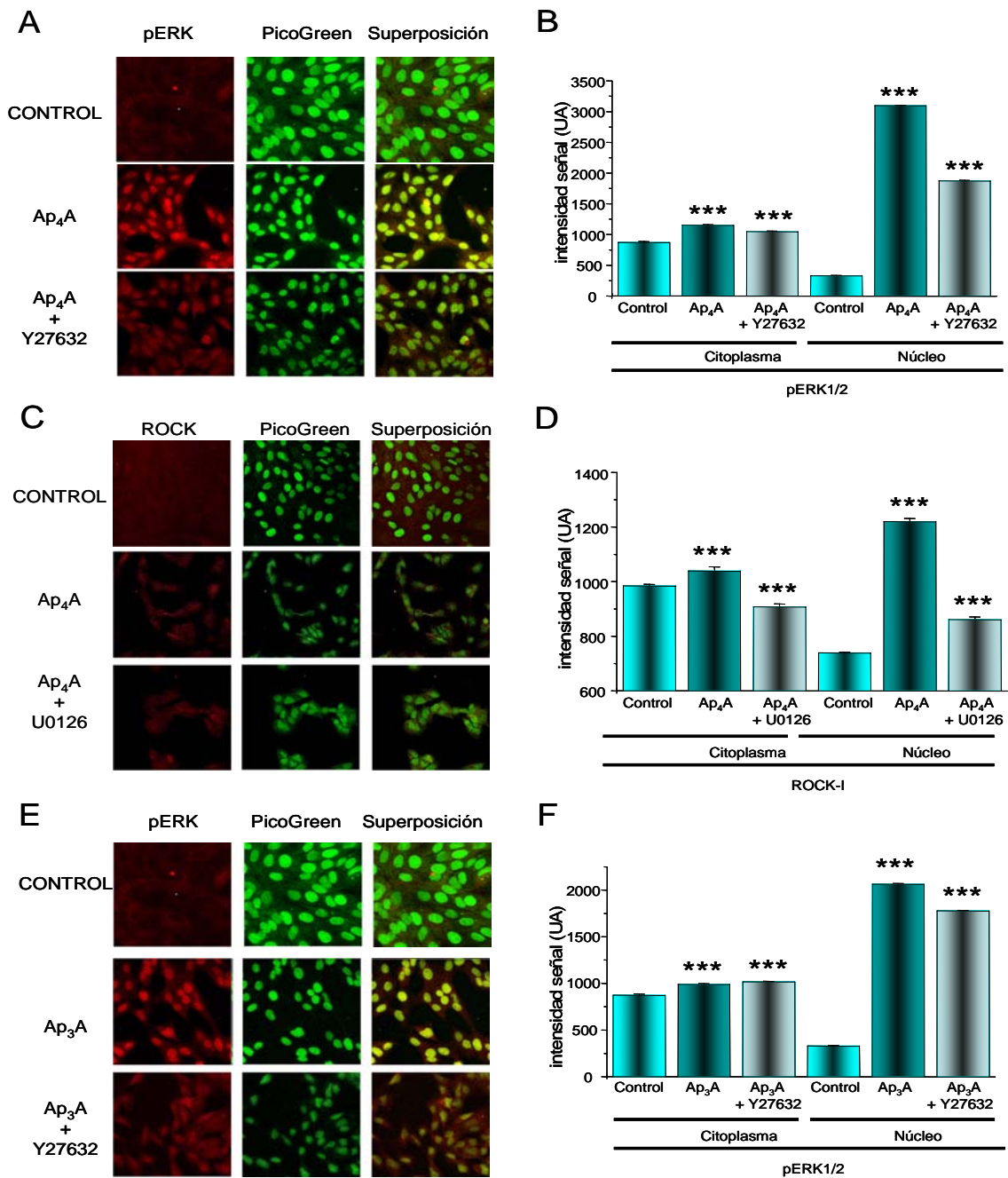


Figura 46: Distribución celular de pERK1/2 y ROCK-I tras tratamientos con Ap₄A y Ap₃A en presencia y ausencia de varios inhibidores. (A) Distribución celular de pERK1/2 (rojo) y co-localización con PicoGreen (verde) en células control y tratadas con Ap₄A e Y27632 + Ap₄A. (B) % de intensidad de la señal para pERK1/2 en el citoplasma y en el núcleo de las células tratadas. (C) Distribución celular de ROCK-I (rojo) y co-localización con PicoGreen (verde) en células control y tratadas con Ap₄A y U0126 + Ap₄A. (D) % de intensidad de la señal para ROCK-I en el citoplasma y en el núcleo de las células tratadas. (E) Distribución celular de pERK1/2 (rojo) y co-localización con PicoGreen (verde) en células control y tratadas con Ap₃A e Y27632 + Ap₃A. (F) % de intensidad de la señal para pERK1/2 en el citoplasma y en el núcleo de las células tratadas. Imágenes a 40 aumentos. (***) $p < 0.0001$ vs. control).

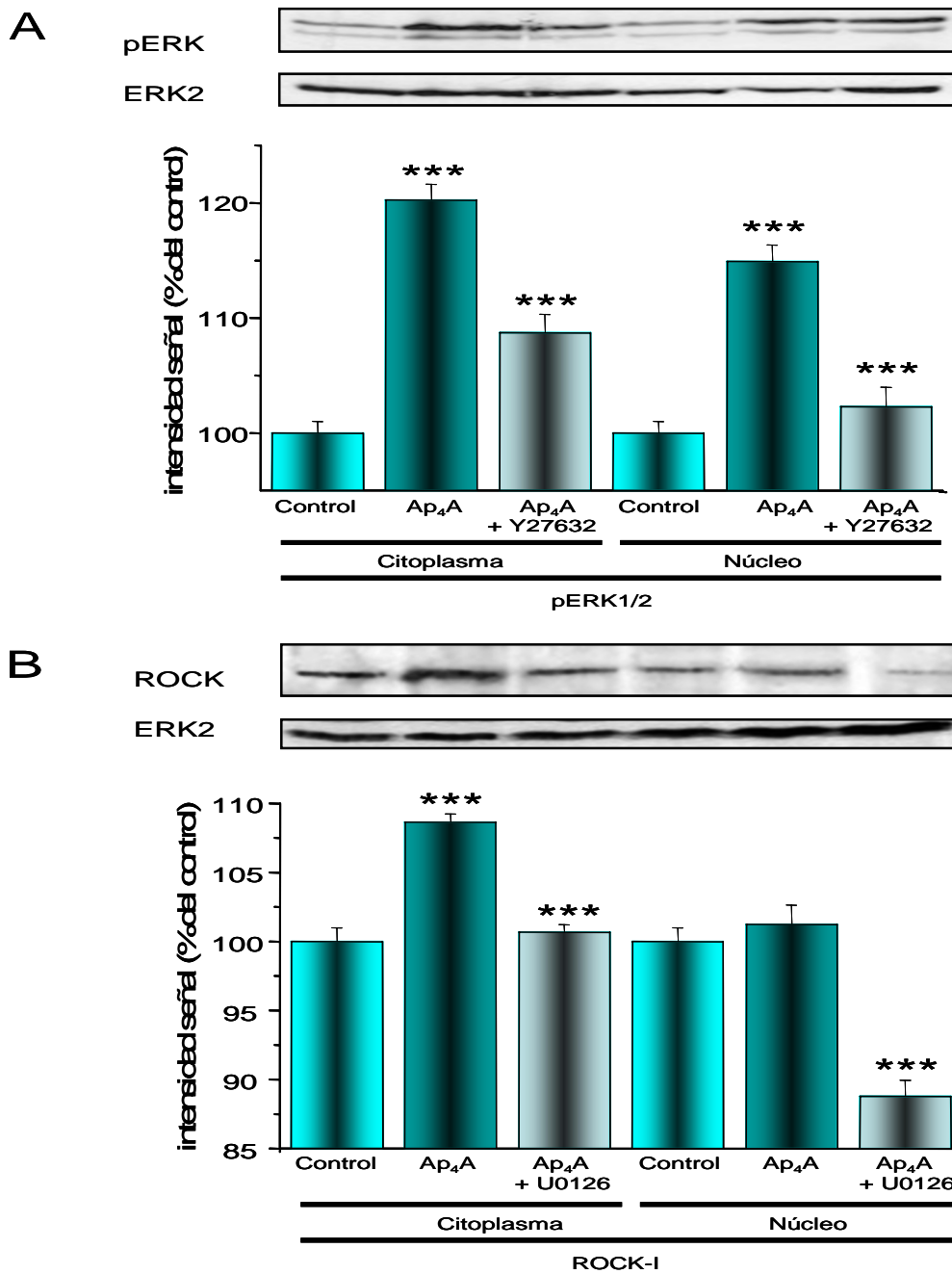


Figura 47: Distribución celular de pERK1/2 y ROCK-I. (A) Análisis por Western-blot de la distribución subcelular de pERK1/2 tras tratamientos con Ap₄A en presencia y ausencia del inhibidor de ROCK-I. (B) Análisis por Western-blot de la distribución subcelular de ROCK-I tras tratamientos con Ap₄A en presencia y ausencia del U0126 (***) $p < 0.0001$ vs. control).

4.10. ENSAYOS CITOESQUELETO: FIBRONECTINA / uPA Y FALOIDINA / VINCULINA.

Para conocer la implicación real del citoesqueleto de actina, en el proceso de migración celular, estudiamos la activación de dos proteínas de matriz extracelular; Fibronectina (glicoproteína que favorece la adhesión de las células a la matriz extracelular y que guía la migración celular) y uPA (proteína de matriz extracelular implicada en la degradación de la misma), y de dos proteínas de citoesqueleto: Faloidina (proteína que se une a la actina de los microfilamentos del citoesqueleto, impidiendo su despolimerización). y Vinculina (proteína de membrana - citoesqueleto ubicada en las placas de las adhesiones focales involucrada en el anclaje de las moléculas de integrina al citoesqueleto de actina), durante el periodo de tiempo comprendido entre la lesión de la monocapa y las 24 horas posteriores, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.9 de Material y Métodos.

Las Figuras 48 y 49 reflejan la activación de Fibronectina y uPA a tiempos 0, 6, 10 y 24 horas de la lesión en lesiones control y tratadas con Ap_4A 100 μM , y en las Figuras 50 y 51 encontramos la activación de Faloidina y Vinculina a los mismos tiempos y con los mismos tratamientos.

Como podemos comprobar, en las lesiones control (Figura 48A) a tiempo 0 horas (nada más realizar la lesión) no encontramos señal para Fibronectina, localizando esta proteína formando una banda justo por detrás del frente de avance de las células a las 6 horas posteriores a la lesión. Transcurridas 10 horas desde la lesión, volvemos a no encontrar señal para esta proteína, volviendo a localizar esta proteína detrás del frente de avance celular a las 24 horas. Es decir, tenemos una activación transitoria y oscilatoria. En el caso de las lesiones tratadas con Ap_4A (Figura 48A) observamos como el patrón de activación de Fibronectina es similar al que acabamos de describir para las lesiones control, siendo sin embargo la intensidad de señal a 6 horas menor que en la lesión control (1132.46 ± 15.08 para Ap_4A y 1482.17 ± 13.00 para el control, en unidades arbitrarias de fluorescencia (UA)), mientras que a las 10 horas, la intensidad de señal para Fibronectina en las lesiones tratadas con Ap_4A es mayor que en las

lesiones control (485.52 ± 13.39 UA para Ap₄A y 424.97 ± 16.69 UA para el control) (Figura 49A).

En el caso de la activación de uPA, observamos que en las lesiones control (Figura 48B) la activación de esta proteína comienza nada más realizada la lesión, y localizando la misma en el frente de la lesión, pero no formando una banda homogénea sino centrada en alguna célula del borde de la lesión. Esta señal aumenta en intensidad a las 6 horas de la lesión manteniendo la localización, y posteriormente desciende a niveles similares al control en las 10 y las 24 horas posteriores a la lesión. En el caso de la activación de uPA en las lesiones tratadas con Ap₄A (Figura 48B), nada más realizar la lesión (0 horas) no encontramos señal para esta proteína, observando un notable incremento en esta a partir de las 6 horas de la lesión, y manteniendo la misma hasta las 24 horas posteriores a la lesión. En este caso la señal para uPA se localiza también en el borde de la lesión, pero más homogéneamente distribuida si lo comparamos con la localización de esta proteína en las lesiones control. Cuando cuantificamos la intensidad de la señal para uPA en todos los casos (Figura 49B) observamos como salvo a 0 horas donde la señal en las lesiones control es superior a la señal en las lesiones tratadas (0 ± 0 UA para Ap₄A y 559.34 ± 10.46 UA para el control), la señal para uPA es mayor en las lesiones tratadas con Ap₄A (1734.94 ± 36.56 UA para Ap₄A y 986.95 ± 14.45 UA para el control a las 6 horas; 1903.89 ± 40.66 UA para Ap₄A y 541.53 ± 10.12 UA para el control a las 10 horas; y 1739.64 ± 20.78 UA para Ap₄A y 489.47 ± 21.07 UA para el control a las 24 horas) (Figura 49B).

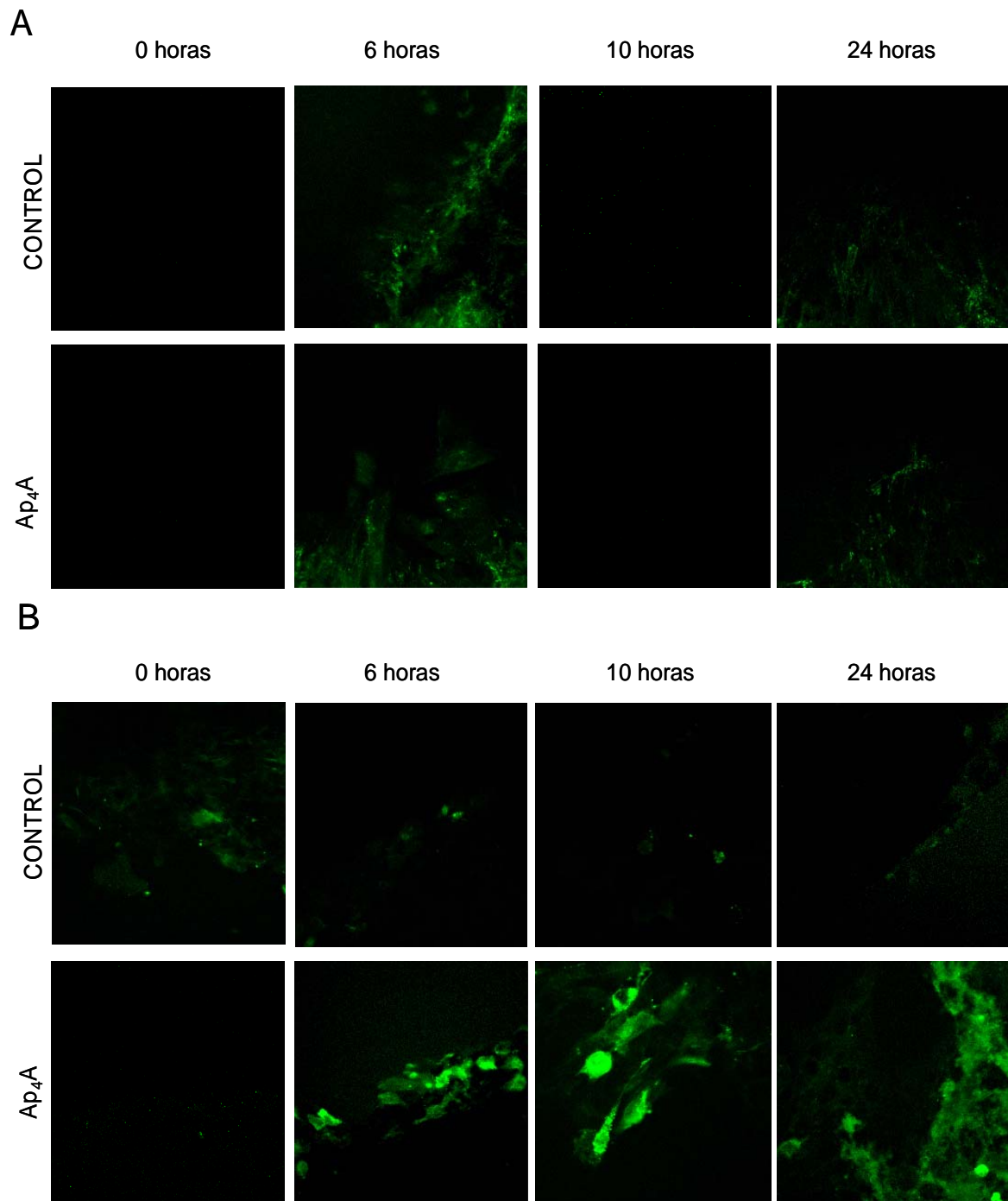


Figura 48: *Inmunolocalización de Fibronectina y uPA y células lesionadas. (A) Señal para Fibronectina (verde) en células lesionadas control y tratadas con Ap₄A 100 μ M a tiempos 0, 6, 10 y 24 horas posteriores a la lesión. (B) Señal para uPA (verde) en células lesionadas control y tratadas con Ap₄A 100 μ M a tiempos 0, 6, 10 y 24 horas posteriores a la lesión. Imágenes tomadas a 40 aumentos.*

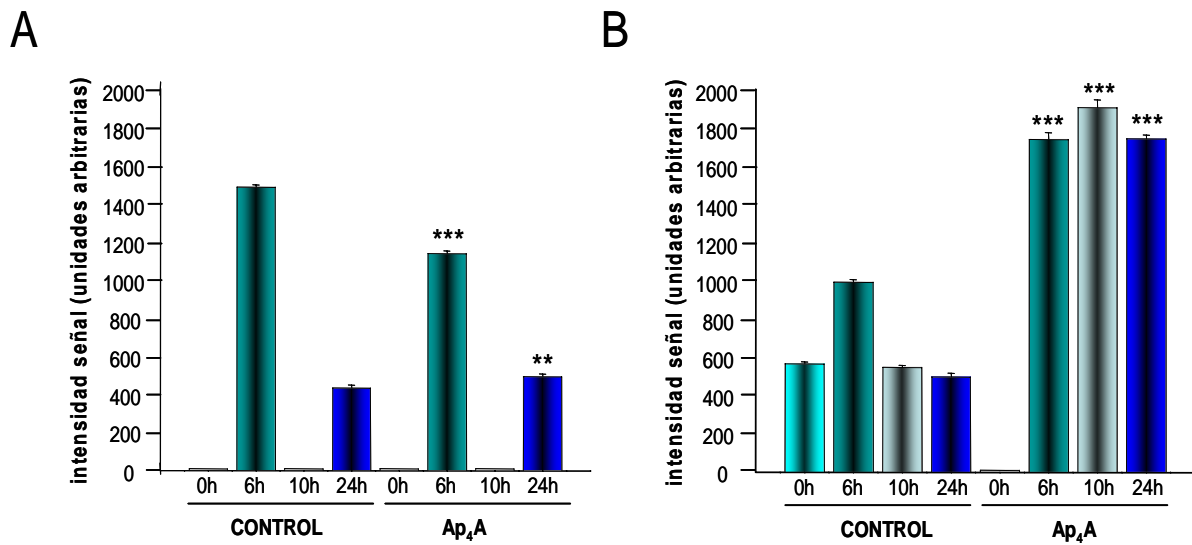


Figura 49: Cuantificación de la señal para Fibronectina y uPA tras lesión. (A) Cuantificación para Fibronectina en células lesionadas control y tratadas con Ap₄A 100 μ M a tiempos 0, 6, 10 y 24 horas posteriores a la lesión. (B) Cuantificación para uPA en células lesionadas control y tratadas con Ap₄A 100 μ M a tiempos 0, 6, 10 y 24 horas posteriores a la lesión (***) $p < 0.001$ y ** $p < 0.01$ vs. control).

Cuando estudiamos el comportamiento de la activación de las proteínas Faloidina y Vinculina en lesiones control y en lesiones tratadas con Ap₄A, observamos lo siguiente:

En las lesiones control (Figura 50A), localizamos la expresión de Faloidina nada más realizada la lesión, y la distribución de la misma es homogénea a lo largo del citoplasma siguiendo las fibras de actina de las células del borde de la lesión. A las 6 horas posteriores a la lesión, la señal para esta proteína sigue estando presente en la misma localización pero con mayor intensidad, disminuyendo la misma a las 10 horas de la lesión, aunque manteniendo la localización. Por último, a las 24 horas posteriores a la lesión la intensidad de la señal para Faloidina y la localización de la misma son iguales a las encontradas a las 6 horas. Es decir, encontramos una activación oscilatoria de la señal. Cuando analizamos la señal para Faloidina en las lesiones tratadas con Ap₄A (Figura 50A), observamos como nada más realizar la lesión, encontramos señal para esta proteína a lo largo del citoplasma de las células epiteliales del borde de la lesión, siguiendo un patrón similar al descrito para las lesiones control a las 0 horas. Transcurridas 6 horas de la lesión, localizamos esta proteína en las mismas células aunque con intensidad menor, recuperando la intensidad de señal 10 horas después de la

lesión y manteniendo la misma a las 24 horas. Cuando comparamos la intensidad de señal para Faloidina entre las lesiones control y las tratadas con Ap_4A (Figura 51A), observamos como a 0 y 10 horas la intensidad de señal es menor en el control que en las células tratadas (1883.51 ± 22.22 UA para el control y 2099.78 ± 19.14 UA para Ap_4A a 0h; 993.91 ± 9.59 para el control y 2318.75 ± 18.96 para Ap_4A a las 10h), encontrando que a las 6 y a las 24 horas de realizada lesión ocurre lo contrario (2389.33 ± 21.64 UA para el control y 1668.21 ± 15.53 UA para Ap_4A a las 6 horas; y 2410.06 ± 22.24 UA para el control y 2311.28 ± 20.10 UA para Ap_4A a las 24h) (Figura 51A).

Cuando examinamos la señal para Vinculina en las lesiones control (Figura 50B), encontramos que a 0 horas, la señal para esta proteína es bastante intensa, localizando la misma en la membrana y en el citoesqueleto de las células del borde de la lesión. A las 6 horas de la misma, localizamos esta proteína de nuevo en la zona de la membrana celular de las células del borde de la lesión, siendo la intensidad de la señal menor que a las 0 horas, repitiéndose el patrón de localización a las 10 y a las 24 horas de la lesión, periodos de tiempo en los cuales la señal vuelve a aumentar de intensidad, aunque no recuperamos los niveles de intensidad encontrados en las células nada más realizar la lesión. Cuando analizamos la señal para esta proteína en las lesiones tratadas con Ap_4A (Figura 50B), observamos como nada más realizada la lesión, encontramos una señal elevada para Vinculina localizada de nuevo a lo largo de la membrana celular de las células que se encuentran en el borde de la lesión. Esta señal para Vinculina aumenta a las 6 horas de realizada la lesión, encontrando el máximo nivel de señalización transcurridas 10 horas desde la lesión de la monocapa. Por último, a las 24 horas de la lesión, encontramos señal para esta proteína en niveles similares a los que encontramos a las 6 horas de generada la lesión. Cuando comparamos los niveles de Vinculina en las lesiones control y en las tratadas con Ap_4A (Figura 51B), a los diversos tiempos desde la lesión, encontramos que a 0 horas, la cantidad de Vinculina en las lesiones control es mayor que en las lesiones tratadas (2475.89 ± 34.29 UA para el control y 2091.93 ± 19.18 UA para Ap_4A), siendo esta señal mayor para Ap_4A en el resto de horas estudiadas (1291.44 ± 12.79 UA para el control y 2268.06 ± 31.76 UA para Ap_4A a las 6 horas; 1609.39 ± 22.23 UA para el control y 2730.49 ± 33.28 UA

para Ap_4A a las 10 horas; y 1735.45 ± 23.55 UA para el control y 2163.89 ± 30.20 UA para Ap_4A a las 24 horas) (Figura 51B).

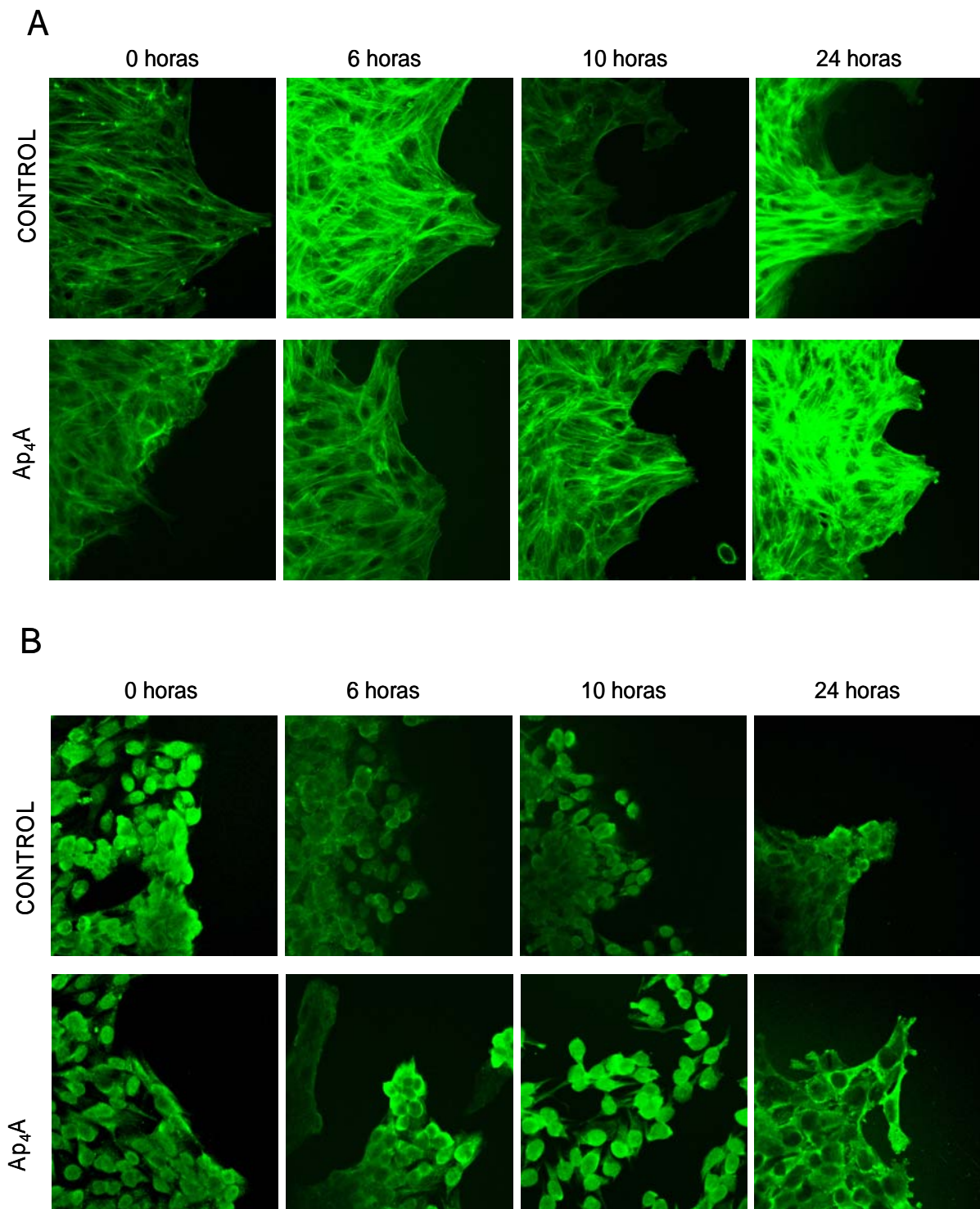


Figura 50: Immunolocalización de Faloidina y Vinculina y células lesionadas. (A) Señal para Faloidina (verde) en células lesionadas control y tratadas con Ap_4A $100 \mu M$ a tiempos 0, 6, 10 y 24 horas posteriores a la lesión. (B) Señal para Vinculina (verde) en células lesionadas control y tratadas con Ap_4A $100 \mu M$ a tiempos 0, 6, 10 y 24 horas posteriores a la lesión. Imágenes tomadas a 40 aumentos.

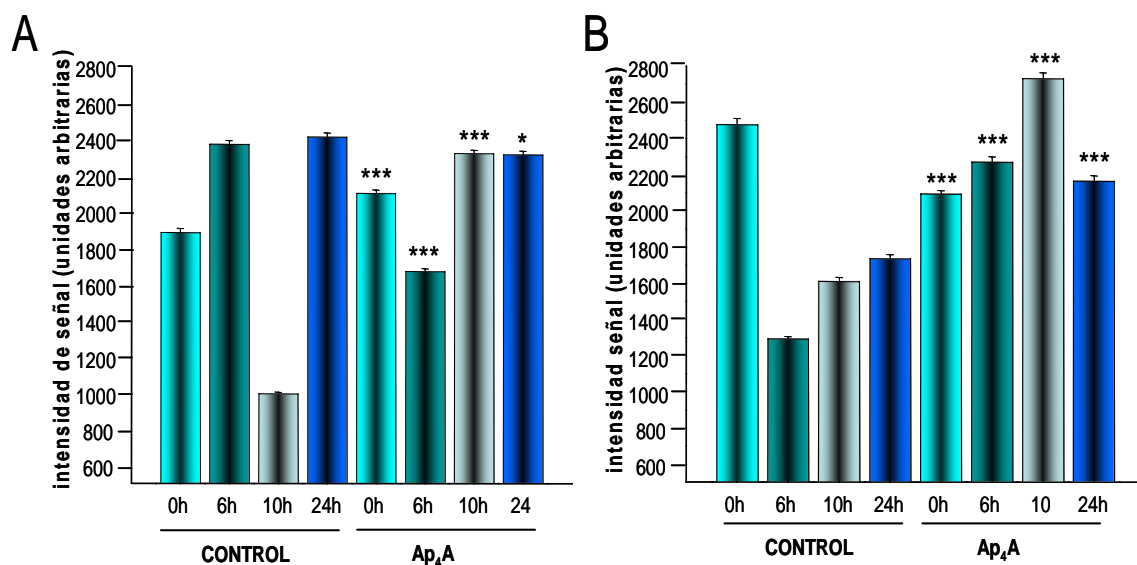


Figura 51: Cuantificación de la señal para Faloidina y Vinculina tras lesión. (A) Cuantificación para Faloidina en células lesionadas control y tratadas con Ap₄A 100 μM a tiempos 0, 6, 10 y 24 horas posteriores a la lesión. (B) Cuantificación para Vinculina en células lesionadas control y tratadas con Ap₄A 100 μM a tiempos 0, 6, 10 y 24 horas posteriores a la lesión (***) $p < 0.001$ y * $p < 0.05$ vs. control).

4.11.- EFECTO DE LOS DINUCLEÓTIDOS EN LA ETAPA DE DIVISIÓN CELULAR.

4.11.1.- Estudio de la proliferación del epitelio corneal *in vitro*.

4.11.1.1.- Efecto de Ap₄A en la proliferación celular.

Para conocer la implicación de Ap₄A en la etapa de división celular del proceso de cicatrización corneal, estudiamos en cultivo de células SIRC la proliferación celular tras los tratamientos descritos en la sección de Material y Métodos, es decir, el tratamiento con Ap₄A y los pre-tratamientos con los diversos antagonistas e inhibidores de las rutas intracelulares para discriminar la posible vía intracelular de actuación.

La Figura 52 refleja la proliferación celular en tanto por ciento con respecto al control transcurridas 24 y 36 horas desde el inicio de las incubaciones. A las 24 horas (Figura 52A), observamos como la proliferación con Ap₄A aumenta (114.59 ± 1.28 %) en comparación con la proliferación control (100 ± 3.83 %), viendo como el pre-

tratamiento con los ocho inhibidores, produce un descenso considerable de la proliferación, entre un 30 y un 70 % aproximadamente en todos los casos (Tabla 22), siendo Estaurosporina el antagonista que produce un mayor descenso en la proliferación (Tabla 22). Los resultados de proliferación que obtenemos tras el pre-tratamiento con U73343, análogo inactivo de U73122, son similares a los valores control.

Cuando estudiamos la proliferación de las células SIRC a las 36 horas del comienzo de los tratamientos con Ap₄A e inhibidores (Figura 52B), observamos que en comparación con la proliferación control ($100 \pm 1.39\%$) Ap₄A produce un incremento en la proliferación mayor que el producido a las 24 horas ($124.27 \pm 3.58\%$). De nuevo, el pre-tratamiento con todos los inhibidores produce un descenso notable en la proliferación celular, estando este comprendido entre un 20 y un 60 % aproximadamente (Tabla 22), y siendo Estaurosporina y Bisindolilmaleimida-I los inhibidores que más detienen la proliferación celular. De nuevo, los valores de proliferación celular para U73343 son similares al control (Tabla 22).

Al producir Ap₄A un incremento en la proliferación dependiente con el tiempo y al ser este incremento revertido con el empleo de los diversos inhibidores empleados, podemos identificar la ruta de activación de la proliferación como la siguiente: Ap₄A activa el receptor P2Y₂ y vía PLC y PKC se activa la ruta de RhoA/ROCK-I. Además, se produce la transactivación de receptores Tirosin Quinasa y la consecuente activación de las MAPK.

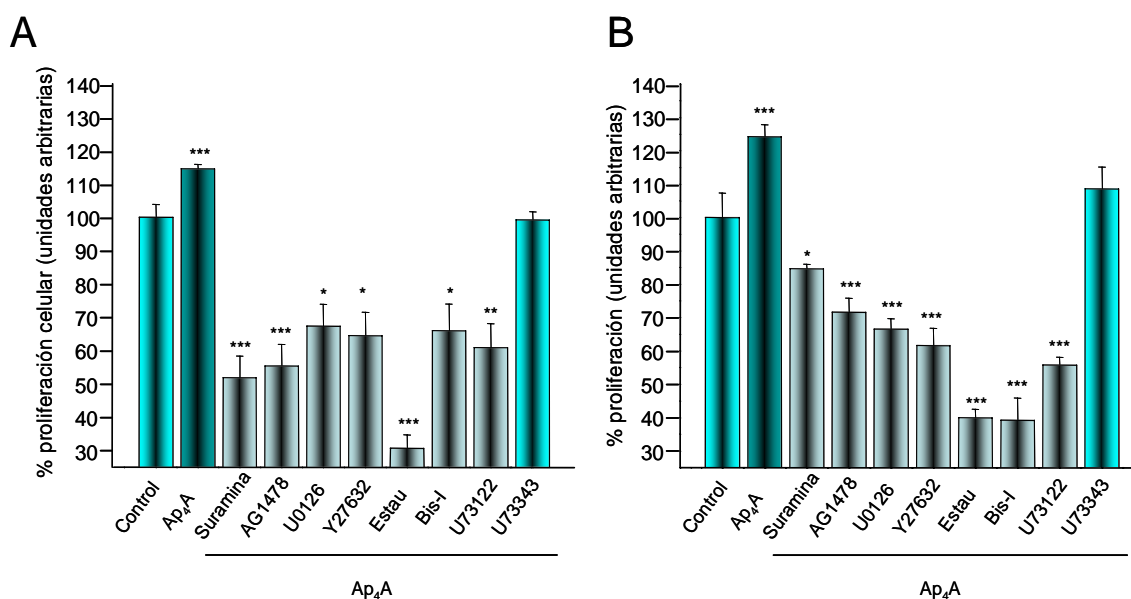


Figura 52: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con Ap_4A y diversos inhibidores a las 24 y 36 horas. (A) Proliferación de las células SIRC a las 24 horas tras tratamiento con Ap_4A y los inhibidores. (B) Proliferación de las células SIRC a las 36 horas tras tratamiento con Ap_4A y los inhibidores (Estau: Estaurosporina, Bis-I: Bisindolilmaleimida-I, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.5$ vs. control).

TRATAMIENTO	PROLIFERACIÓN 24 HORAS (%)	PROLIFERACIÓN 36 HORAS (%)
CONTROL	100 ± 3.83 %	100 ± 3.83 %
Ap_4A 100 μM	114.59 ± 1.28 % ***	124.27 ± 3.58 % ***
Suramina 100 μM + Ap_4A 100 μM	51.91 ± 6.46 % ***	80.92 ± 1.28 % *
AG1478 100 μM + Ap_4A 100 μM	55.39 ± 6.46 % ***	71.58 ± 4.20 % ***
U0126 100 μM + Ap_4A 100 μM	67.29 ± 6.58 % *	66.51 ± 3.20 % ***
Y27632 100 μM + Ap_4A 100 μM	64.48 ± 7.03 % *	61.63 ± 5.18 % ***
Estaurosporina 1 μM + Ap_4A 100 μM	30.74 ± 3.93 % ***	39.97 ± 2.50 % ***
Bisindolilmaleimida-I 10 μM + Ap_4A 100 μM	65.96 ± 8.03 % *	39.18 ± 6.50 % ***
U73122 3 μM + Ap_4A 100 μM	60.96 ± 7.19 % **	55.74 ± 2.35 % ***
U73343 3 μM + Ap_4A 100 μM	99.23 ± 2.43 %	108.57 ± 6.50 %

Tabla 22: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con Ap_4A y diversos inhibidores a las 24 y 36 horas (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.5$ vs. control).

4.11.1.2.- Efecto de Ap₃A en la proliferación celular.

También hemos querido conocer el papel de Ap₃A en la etapa de división celular del proceso de cicatrización corneal. Para ello, hemos realizado el ensayo de proliferación en células SIRC siguiendo el protocolo descrito en la sección de Material y Métodos, es decir, el tratamiento con Ap₃A y los pre-tratamientos con U0126 (inhibidor de la ruta ERK1/2) y SB203580 (inhibidor de la ruta p38).

En la Figura 53 encontramos la proliferación celular (en tanto por ciento con respecto al control) tras los tratamientos con Ap₃A y el pre-tratamiento con los inhibidores a tiempos 24 y 36 horas desde el inicio de las incubaciones. A las 24 horas (Figura 53A) observamos como el tratamiento con Ap₃A produce un pequeño pero significativo incremento en la proliferación celular cuando lo comparamos con las células control ($100 \pm 1.39\%$ para el control y $109.38 \pm 1.47\%$ para Ap₃A), incremento que se revierte de forma considerable cuando pre-tratamos con ambos inhibidores (Tabla 23).

De nuevo, a las 36 horas, encontramos que el tratamiento con Ap₃A produce un incremento en la proliferación de las células SIRC, siendo este aumento en la proliferación mayor que el en el control a las 24 horas ($100 \pm 1.23\%$ para el control y $123.26 \pm 1.93\%$ para Ap₃A), revertiendo este incremento con los pre-tratamientos con los dos inhibidores (Figura 53B y Tabla 23).

Como en el caso de Ap₄A, el incremento de la proliferación tras el tratamiento de las células del epitelio corneal con Ap₃A es dependiente del tiempo, y el pre-tratamiento con los antagonistas nos indica que la proliferación activada por Ap₃A es vía las dos rutas de las MAPK, ERK1/2 y p38.

Como podemos observar, tanto Ap₄A como Ap₃A 100 μ M solos en ausencia de cualquier inhibidor, producen un efecto similar en la etapa de proliferación celular, ya que ambos producen un incremento pequeño pero significativo en la misma, llegando a alcanzar un 25 % aproximadamente más de proliferación a las 36 horas, siendo la ruta común de actuación la vía de las MAPK.

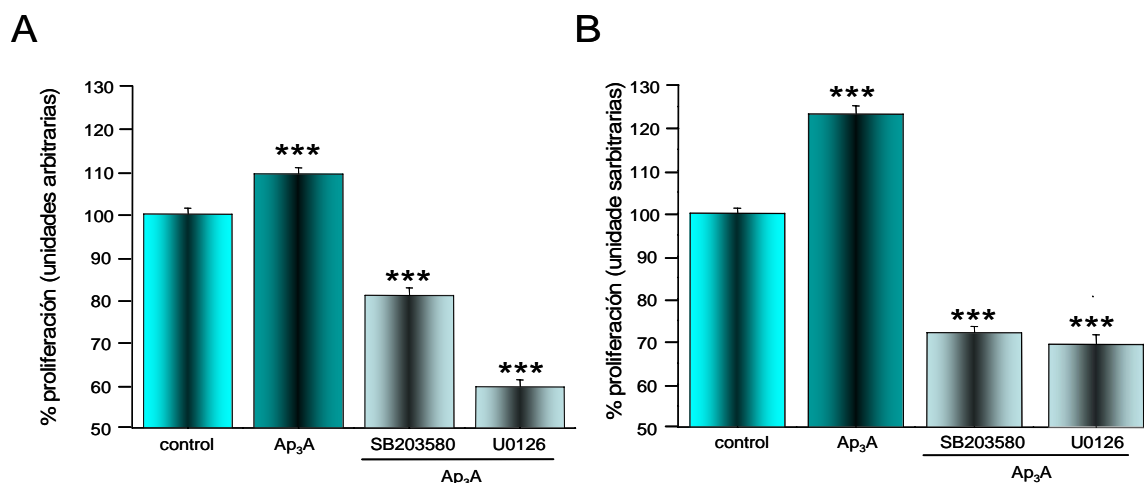


Figura 53: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con Ap_3A y diversos inhibidores a las 24 y 36 horas. (A) Proliferación de las células SIRC a las 24 horas tras tratamiento con Ap_3A y los inhibidores. (B) Proliferación de las células SIRC a las 36 horas tras tratamiento con Ap_3A y los inhibidores (***) $p < 0.001$ vs. control).

TRATAMIENTO	PROLIFERACIÓN 24 HORAS (%)	PROLIFERACIÓN 36 HORAS (%)
CONTROL	100 ± 1.39 %	100 ± 1.23 %
Ap_3A 100 μM	109.38 ± 1.47 % ***	123.26 ± 1.93 % ***
U0126 100 μM + Ap_3A 100 μM	59.63 ± 1.66 % ***	31.11 ± 2.25 % ***
SB203580 100 μM + Ap_3A 100 μM	81.04 ± 1.70 % ***	32.39 ± 1.42 % ***

Tabla 23: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con Ap_3A y diversos inhibidores a las 24 y 36 horas (***) $p < 0.001$ vs. control).

4.11.1.3.- Efecto de la combinación de Ap_4A y Ap_3A en la proliferación celular.

Una vez conocido el efecto que Ap_4A y Ap_3A 100 μM tienen en la proliferación del epitelio corneal, estudiamos la posible interacción entre ambos dinucleótidos y el efecto que ello conlleva en el proceso de proliferación celular. Para ello, pre-incubamos las células con una concentración fija (100 μM) de uno de los dinucleótidos, y a continuación incubamos con concentraciones crecientes del dinucleótido contrario, tal y como hemos descrito en la sección de Material y Métodos.

Como podemos apreciar a las 24 horas (Figura 54A), cuando tratamos las células con Ap_4A 100 μM solo, observamos el incremento en la proliferación descrito en el apartado 4.11.1.1 ($114.59 \pm 1.28 \%$). Cuando mantenemos esta concentración de Ap_4A fija y tratamos con concentraciones crecientes de Ap_3A , observamos un incremento en la proliferación con respecto al control y a Ap_4A solo, siendo este incremento dependiente de la dosis de Ap_3A , y máximo a dosis 10 μM y 100 μM (Tabla 24). La Figura 54B refleja los resultados de los mismos tratamientos a las 36 horas. En este caso, se produce un incremento en relación con la proliferación control y con la proliferación de Ap_4A 100 μM siendo este incremento máximo cuando tratamos con Ap_3A 0.1 μM (Tabla 24).

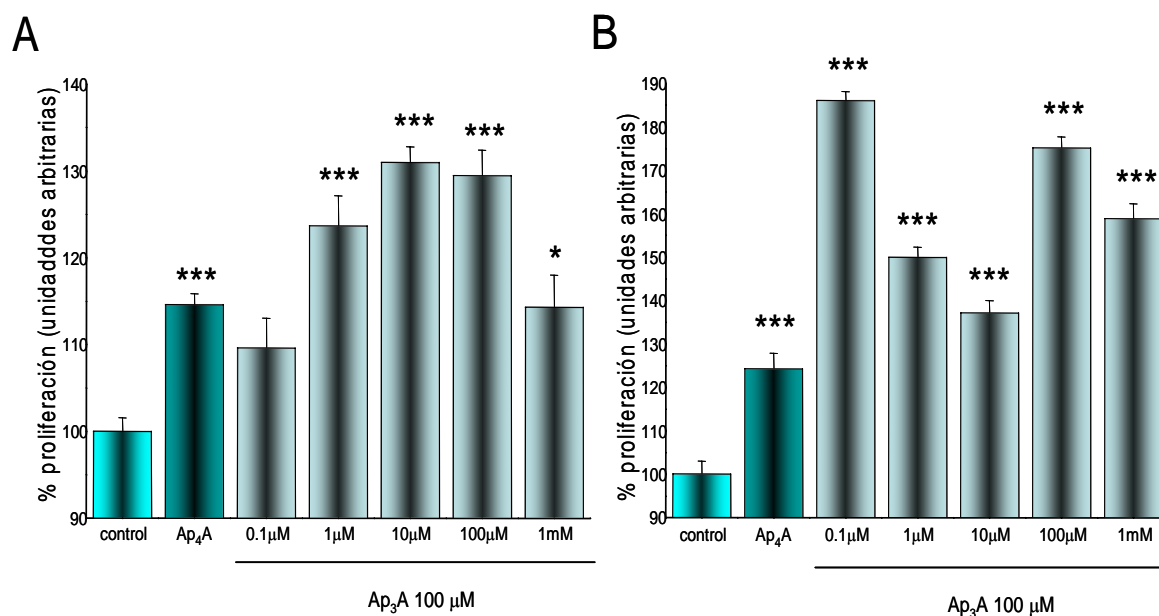


Figura 54: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con concentraciones crecientes de Ap_3A en presencia de Ap_4A 100 μM a las 24 y 36 horas. (A) Proliferación de las células SIRC a las 24 horas tras tratamiento con Ap_4A 100 μM y concentraciones crecientes de Ap_3A (0.1 μM a 1 mM). (B) Proliferación de las células SIRC a las 36 horas tras tratamiento con Ap_4A 100 μM y concentraciones crecientes de Ap_3A . (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ vs. control).

TRATAMIENTO	PROLIFERACIÓN 24 HORAS (%)	PROLIFERACIÓN 36 HORAS (%)
CONTROL	100 ± 1.60 %	100 ± 2.08 %
Ap ₄ A 100 μM	114.59 ± 1.28 % ***	124.27 ± 3.58 % ***
Ap ₄ A 100 μM + Ap ₃ A 0.1 μM	109.60 ± 3.42 %	186.05 ± 2.08 % ***
Ap ₄ A 100 μM + Ap ₃ A 1 μM	123.68 ± 3.45 % ***	149.90 ± 2.40 % ***
Ap ₄ A 100 μM + Ap ₃ A 10 μM	130.95 ± 1.83 % ***	137.15 ± 2.82 % ***
Ap ₄ A 100 μM + Ap ₃ A 100 μM	129.47 ± 2.92 % ***	175.12 ± 2.52 % ***
Ap ₄ A 100 μM + Ap ₃ A 1 mM	114.29 ± 3.68 % *	158.86 ± 3.39 % ***

Tabla 24: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con Ap₄A 100 μM y concentraciones crecientes de Ap₃A. a las 24 y 36 horas de iniciados los tratamientos (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ vs. control).

Cuando realizamos el mismo tipo de ensayo pero con Ap₃A 100 μM a concentración fija y variando la concentración de Ap₄A, encontramos lo siguiente: a las 24 horas del inicio de los tratamientos (Figura 55A) observamos como se produce un incremento en la proliferación cuando lo comparamos con el control y con Ap₃A 100 μM solo (109.38 ± 1.47 %), siendo este incremento mayor cuando tratamos con concentraciones pequeñas de Ap₄A (Ap₄A 0.1 μM, Ap₄A 1 μM y para Ap₄A 10 μM) (Tabla 25). A las 36 horas (Figura 55B) encontramos como se produce un incremento mayor en la proliferación, siendo esta mayor cuando tratamos las células con Ap₄A 10 μM (Tabla 25).

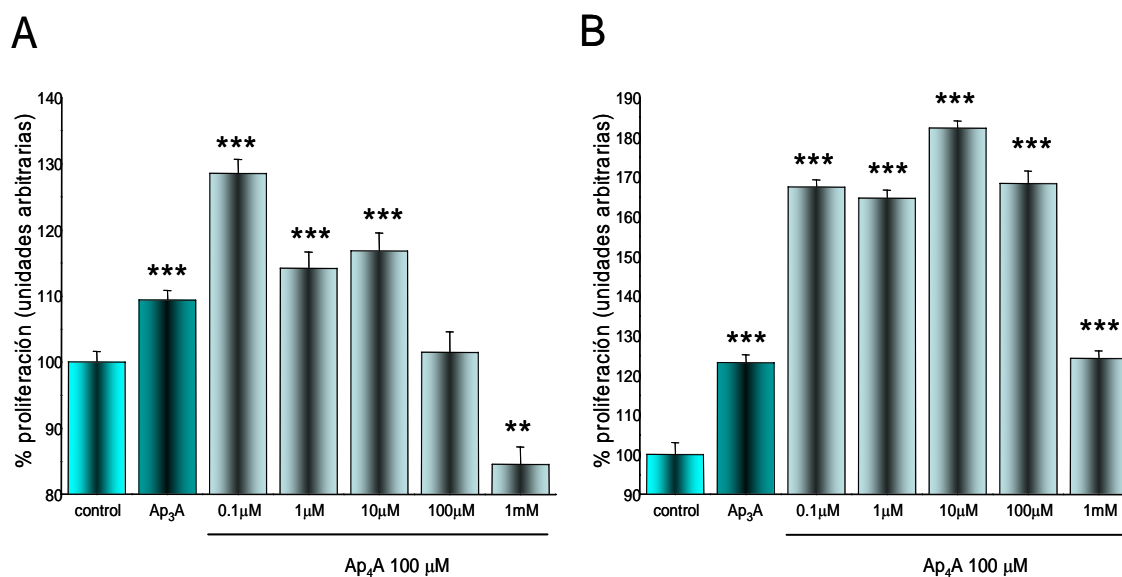


Figura 55: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con concentraciones crecientes de Ap₄A en presencia de Ap₃A 100 μM respectivamente a las 24 y 36 horas. (A) Proliferación de las células SIRC a las 24 horas tras tratamiento con Ap₃A 100 μM y concentraciones crecientes de Ap₄A (0.1 μM a 1 mM). (B) Proliferación de las células SIRC a las 36 horas tras tratamiento con Ap₃A 100 μM y concentraciones crecientes de Ap₄A (0.1 μM a 1 mM). (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$ vs. control).

TRATAMIENTO	PROLIFERACIÓN 24 HORAS (%)	PROLIFERACIÓN 36 HORAS (%)
CONTROL	100 ± 1.60 %	100 ± 2.08 %
Ap ₃ A 100 μM	109.38 ± 1.47 %	123.26 ± 1.93 %
Ap ₃ A 100 μM + Ap ₄ A 0.1 μM	128.52 ± 2.19 % ***	167.50 ± 1.78 % ***
Ap ₃ A 100 μM + Ap ₄ A 1 μM	114.19 ± 2.47 % ***	164.59 ± 2.10 % ***
Ap ₃ A 100 μM + Ap ₄ A 10 μM	116.84 ± 2.70 % ***	182.26 ± 1.87 % ***
Ap ₃ A 100 μM + Ap ₄ A 100 μM	101.49 ± 3.08 %	168.35 ± 3.19 % ***
Ap ₃ A 100 μM + Ap ₄ A 1 mM	84.54 ± 2.62 % **	124.20 ± 1.96 % ***

Tabla 25: Proliferación celular de las células SIRC tras la estimulación con Ap₃A 100 μM y concentraciones crecientes de Ap₄A a las 24 y 36 horas de iniciados los tratamientos (***) $p < 0.001$ y ** $p < 0.01$ vs. control).

Como podemos apreciar, cuando pre-tratamos las células con uno de los dinucleótidos antes del tratamiento con el otro dinucleótido se produce en ambos casos un incremento en la proliferación celular mayor que cuando tratamos las células con uno de los dinucleótidos solo. Sin embargo, en base a los resultados podríamos definir que es Ap₃A el principal efector en la proliferación celular de las células del epitelio corneal tras una lesión.

4.11.2.- Estudio de proliferación del epitelio corneal mediada por Ap₄A y Ap₃A *in vivo*. RT-PCR cuantitativa para CCNE1 y CDK2.

Una vez conocido el efecto que la aplicación de los dinucleótidos tiene en la proliferación del epitelio corneal *in vitro*, estudiamos el efecto que la instilación de los mismos tiene en la tercera etapa del proceso de cicatrización corneal, es decir, en la etapa de proliferación celular, y la vía por la que esto sucede.

Para ello tratamos las corneas con el siRNA #2 para el receptor P2Y₂ y posteriormente tratamos las lesiones con Ap₄A o Ap₃A como hemos mencionado en la sección de Material y Métodos, y estudiamos la expresión del ARNm para el sistema CCNE1 / CDK2 (complejo de Ciclina y Quinas dependiente de Ciclina implicados en el paso de la fase G₁ a S del ciclo celular), en muestras obtenidas a las 24 y 36 horas de la lesión del epitelio corneal mediante citología de impresión.

Cuando estudiamos la expresión de CCNE1 y CDK2 tras el tratamiento con Ap₄A observamos como a las 24 horas la expresión para CCNE1 aumenta de forma significativa en relación al control, produciéndose un descenso también significativo a las 36 horas de la lesión. Cuando estudiamos la expresión del ARNm para CDK2 con los dos tratamientos, encontramos que Ap₄A produce un descenso significativo en la expresión de CDK2 tanto a las 24 como a las 36 horas (Figura 56A y Tabla 26).

El pre-tratamiento con el siRNA #2 produce un descenso significativo en la expresión del ARNm para CCNE1 a las 24 horas con respecto al control, encontrando un gran incremento en la expresión de la misma a las 36 horas, y siendo este incremento en la expresión de CCNE1 mayor que cuando tratamos las lesiones con Ap₄A solo. En

el caso de la expresión de CDK2 observamos como el pre-tratamiento con el siRNA #2 revierte la expresión a niveles control transcurridas 24 y 36 horas de la lesión del epitelio corneal (Figura 56B y Tabla 26).

Cuando analizamos las diferencias de expresión a las 24 y 36 horas entre el tratamiento con Ap_4A y el tratamiento con siRNA para $P2Y_2$ + Ap_4A , observamos como estas son significativas ($p < 0.1$ y $p < 0.01$ respectivamente) para CCNE1 y que no existen diferencias significativas para CDK2 en ninguno de los dos periodos de tiempo.

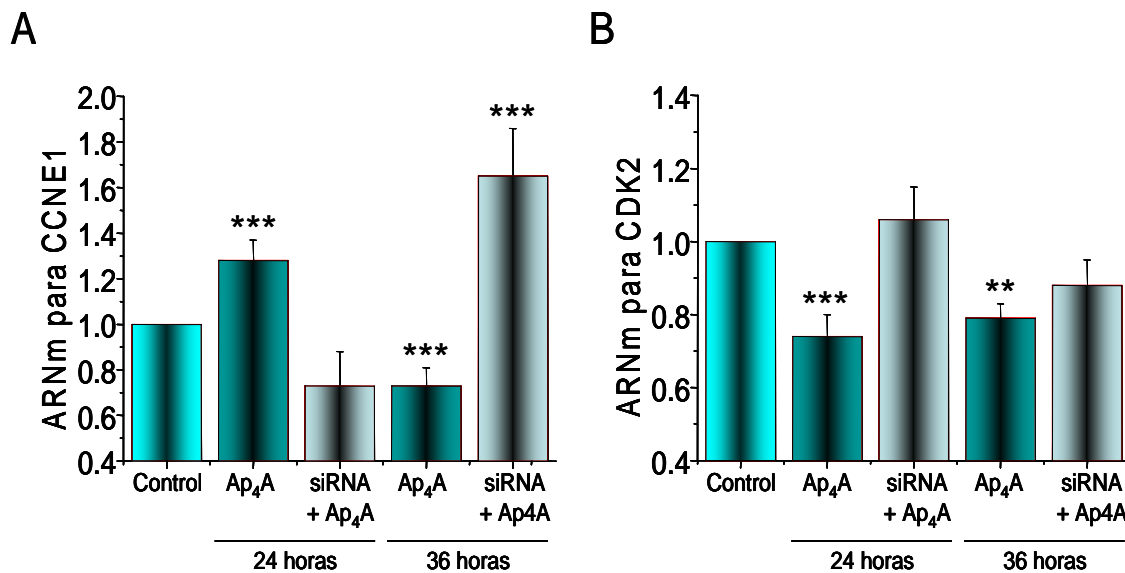


Figura 56: Cuantificación por RT-PCRq de los niveles de ARNm para CCNE1 y CDK2 tras el tratamiento con siRNA para $P2Y_2$. (A) Cuantificación de la expresión del ARNm para CCNE1 en muestras control y tratadas con Ap_4A y siRNA + Ap_4A a las 24 y 36 horas de la lesión en relación al control. (B) Cuantificación de la expresión del ARNm para CDK2 en muestras control y tratadas con Ap_4A y siRNA + Ap_4A a las 24 y 36 horas de la lesión en relación al control. Los valores relativos de expresión vienen expresados en tanto por uno en relación a las corneas control no tratadas (1 ± 0 de expresión) (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs. control).

TRATAMIENTO	ARNm para CCNE1	ARNm para CDK2
CONTROL	1 ± 0	1 ± 0
Ap ₄ A 100 μM 24 horas	1.28 ± 0.09 ***	0.74 ± 0.06 ***
Ap ₄ A 100 μM 36 horas	0.73 ± 0.08 ***	0.79 ± 0.04 **
siRNA P2Y ₂ + Ap ₄ A 100 μM 24 horas	0.73 ± 0.15	1.06 ± 0.09
siRNA P2Y ₂ + Ap ₄ A 100 μM 36 horas	1.65 ± 0.21 ***	0.88 ± 0.07

Tabla 26: Cuantificación del ARNm para CCNE1 Y CDK2 a las 24 y 36 horas de la lesión del epitelio corneal. Lesiones tratadas con Ap₄A 100 μM en presencia y en ausencia del siRNA #2 para P2Y₂ (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs. control).

Por tanto, estos resultados parecen indicar que Ap₄A vía el receptor P2Y₂ está involucrado en el proceso de proliferación celular, sobretodo en el inicio de este (a las 24 horas de producida la lesión), pero la inducción de proliferación en presencia de siRNA para el receptor P2Y₂ y la potenciación de la misma a las 36 horas posteriores a la lesión cuando el efecto silenciador ha concluido, nos indica la presencia de otro receptor purinérgico implicado en el proceso.

Hasta el momento teníamos la hipótesis de que era Ap₃A vía el receptor P2Y₆ el encargado en dar la señal para el inicio de la proliferación cuando Ap₄A había terminado de activar la migración. Para comprobar si esto es cierto, realizamos el mismo estudio de CCNE1 y CDK2 en lesiones epiteliales *in vivo* tratadas con Ap₃A y pre-tratando con el siRNA #2 para P2Y₂, siguiendo el mismo procedimiento que para el tratamiento con Ap₄A.

Cuando estudiamos la expresión de CCNE1 y CDK2 tras el tratamiento con Ap₃A observamos como a las 24 horas de la lesión la expresión tanto para CCNE1 como para CDK2 aumenta de forma significativa en relación al control, produciéndose un incremento mayor en la expresión de ambas proteínas a las 36 horas posteriores a la lesión, cuando lo comparamos con la expresión de CCNE1 y CDK2 en la condición control (Figura 57 A y 57B, Tabla 27).

El pre-tratamiento con el siRNA #2 produce un descenso en la expresión del ARNm para CCNE1 a las 24 horas, en relación con la condición control, mientras que a las 36 horas posteriores a la lesión los niveles de mRNA para esta proteína permanecen elevados aunque por debajo de los valores para Ap₃A solo, mientras que la expresión para CDK2 a las 24 horas permanece elevada y en valores similares a los encontrados para el tratamiento con el dinucleótido solo, disminuyendo estos valores a las 36 horas de la lesión hasta valores similares al control en ausencia de cualquier tratamiento (Figura 57A y 57B, Tabla 27).

Cuando analizamos las diferencias de expresión a las 24 y 36 horas entre el tratamiento con Ap₃A y el tratamiento con siRNA para P2Y₂ + Ap₃A, observamos como estas son significativas ($p < 0.01$ y $p < 0.1$ respectivamente) para CCNE1 y, solo es significativa la diferencia de expresión para CDK2 a las 36 horas de la lesión ($p < 0.001$).

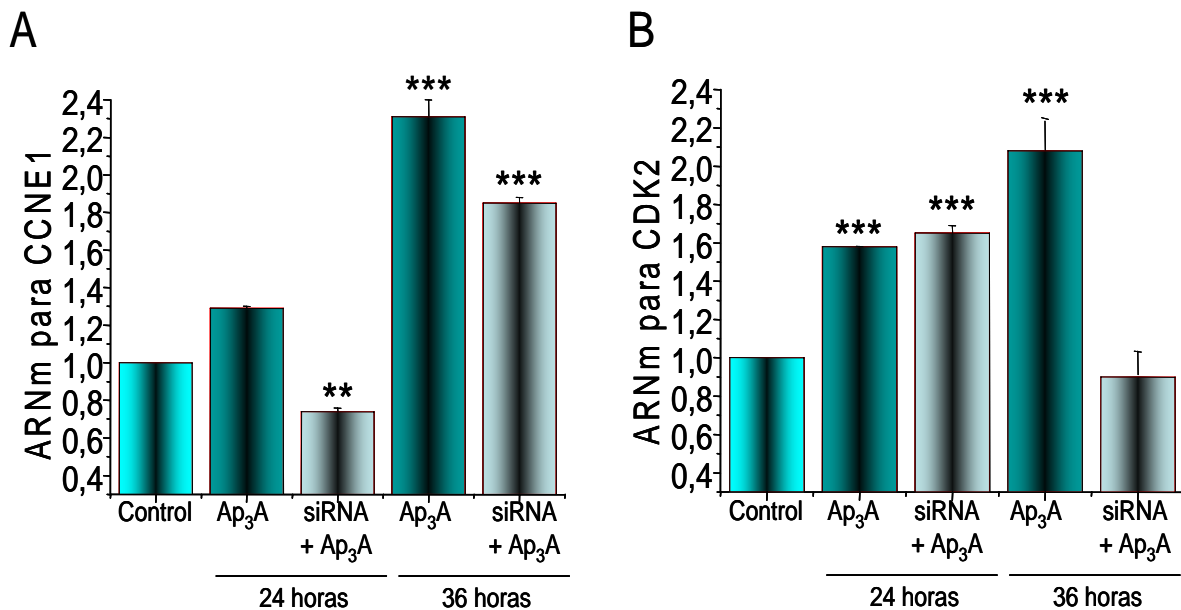


Figura 57: Cuantificación por RT-PCRq de los niveles de ARNm para CCNE1 y CDK2 tras el tratamiento con siRNA para P2Y₂. (A) Cuantificación de la expresión del ARNm para CCNE1 en muestras control y tratadas con Ap₃A y siRNA + Ap₃A a las 24 y 36 horas de la lesión en relación al control. (B) Cuantificación de la expresión del ARNm para CDK2 en muestras control y tratadas con Ap₃A y siRNA + Ap₃A a las 24 y 36 horas de la lesión en relación al control. Los valores relativos de expresión vienen expresados en tanto por uno en relación a las corneas control no tratadas (1 ± 0 de expresión) (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ vs. control).

TRATAMIENTO	ARNm para CCNE1	ARNm para CDK2
CONTROL	1 ± 0	1 ± 0
Ap ₃ A 100 μM 24 horas	1.29 ± 0,03	1.58 ± 0.007***
Ap ₃ A 100 μM 36 horas	2.31 ± 0.19 ***	2.08 ± 0.12 ***
siRNA P2Y ₂ + Ap ₃ A 100 μM 24 horas	0,75 ± 0.03 **	1.65 ± 0.07 ***
siRNA P2Y ₂ + Ap ₃ A 100 μM 36 horas	1.85 ± 0.07 ***	0.91 ± 0.10

Tabla 27: Cuantificación del ARNm para CCNE1 Y CDK2 a las 24 y 36 horas de la lesión del epitelio corneal. Lesiones tratadas con Ap₃A 100 μM en presencia y en ausencia del siRNA #2 para P2Y₂ (*** p < 0.001, **p < 0.01 vs. control).

Estos resultados indican que Ap₃A está involucrado en el proceso de proliferación celular, siendo más importante su papel en la proliferación a las 36 horas de generarse la lesión, aunque el pre-tratamiento con el siRNA para el receptor P2Y₂ disminuye la proliferación provocada por este dinucleótido, siendo este descenso máximo a las 36 horas posteriores a la lesión cuando el efecto silenciador del siRNA ha desaparecido. Esto nos indica que Ap₃A puede estar realizando su efecto proliferativo vía los receptores purinérgicos P2Y₂ y P2Y₆.

En conclusión, todo esto parece indicar que tanto el receptor P2Y₂ como el receptor P2Y₆ estarían involucrados en el proceso de proliferación celular.

Discusión

5.- DISCUSIÓN

5.1.- EFECTO DE LOS DINUCLEÓTIDOS EN EL PROCESO DE MIGRACIÓN DEL EPITELIO CORNEAL. RECEPTORES PURINÉRGICOS IMPLICADOS.

El ojo es el órgano responsable de la detección de luz y está especializado en la fotorrecepción, es decir, en la transmisión de la energía lumínica detectada hacia las células nerviosas especializadas de la retina, que generan potenciales de acción, que transmitidos por el nervio óptico, llegan al cerebro donde la señal es procesada y la imagen generada.

Para que la luz detectada llegue sin alteraciones a la retina, es necesario que los medios oculares y por consiguiente la cornea (zona más superficial del ojo) mantenga su transparencia. Esta transparencia se mantiene gracias a la regularidad y organización del epitelio subyacente, a la avascularidad y a la buena hidratación del estroma.

Cuando la cornea sufre una alteración, por ejemplo, una lesión epitelial debida a la entrada de un cuerpo extraño, las propiedades refractivas de esta se ven modificadas y por tanto la capacidad de transmisión de la señal lumínica a los conos y bastones de la retina. Es por ello imprescindible una rápida regeneración del epitelio normal, no solo para mantener las propiedades ópticas de la cornea, sino también para evitar la invasión de bacterias u otros microorganismos en partes internas del ojo.

Uno de los procesos fisiológicamente relevantes regulados por los nucleótidos es la producción de lágrima. Tanto los nucleótidos como los dinucleótidos de adenina son componentes naturales de este fluido y pueden ser liberados al medio extracelular por rotura de las células o transportados junto a ATP (Crooke et al., 2008). Además es interesante tener en cuenta que los nucleótidos presentes en la lágrima son de gran interés, debido a la presencia de receptores purinérgicos tanto en la cornea como en la conjuntiva (Guzmán-Aranguez et al., 2007).

Esto nos ha llevado a estudiar el papel que estas sustancias pueden desempeñar en el epitelio corneal, y más concretamente la función que realizan cuando se lesiona este.

En trabajos preliminares realizados en conejos vivos (Pintor et al., 2004a), donde el epitelio corneal se lesiona con n-heptanol, la presencia de nucleótidos en la lágrima sugiere un papel importante de estos en el proceso de re-epitelización corneal, ya que la instilación tópica de ciertos nucleótidos y dinucleótidos (UTP y Ap₄A) reducía el tiempo de re-epitelización corneal cuando se comparaba con lesiones control. Si los dinucleótidos son capaces de inducir secreción lagrimal (Pintor et al., 2002b), ¿Pueden facilitar la re-epitelización de forma directa o existen otros componentes en la lágrima y son estos últimos los responsables de la aceleración de la re-epitelización? El problema de trabajar con animales vivos plantea limitaciones como son la imposibilidad de estudiar en profundidad los mecanismos moleculares que subyacen en el proceso de re-epitelización corneal. Es por ello, que en este trabajo hemos pasado a un modelo de cultivo celular de epitelio corneal de conejo.

Cuando generamos lesiones en las monocapas de células del epitelio corneal, y aplicamos los distintos nucleótidos y dinucleótidos, estos se comportan de manera diferente según la cadena de fosfatos que une las dos moléculas de adenosina. Como ocurre *in vivo*, Ap₄A, ATP y UTP tienen la capacidad de acelerar la velocidad de re-epitelización, mientras que Ap₃A, Ap₅A y UDP realizan el efecto opuesto, es decir, producen un retardo en el proceso de cicatrización. Además, otros nucleótidos, tales como ADP o Up₄U no modifican el proceso de re-epitelización cuando los comparamos con un control.

Este hecho ya aclara una de las dudas, los nucleótidos re-epitelizan directamente y no mediante la estimulación de la secreción lagrimal ni con la aparición de EGF (Tripathi et al., 1990).

Para conocer que receptores purinérgicos son los implicados en esta diversidad de respuestas, realizamos ensayos de migración celular pre-tratando las células con los antagonistas conocidos (Suramina, PPADS y RB-2). En base a los estudios

farmacológicos (perfil de aceleración: $Ap_4A > UTP > ATP$, y perfil de retardo: $Ap_5A > Ap_3A \cong UDP$), y conociendo que Suramina es el antagonista más efectivo para revertir el efecto de aceleración de la migración provocado por Ap_4A , y que tanto PPADS como RB-2 potencian el efecto retardante de la migración de Ap_3A , puede estar justificada la activación de diferentes subtipos de receptores P2Y (Mediero et al., 2006). Está claro que la farmacología de los receptores P2 es bastante complicada debido a la ausencia de antagonistas selectivos para cada subtipo de receptor, y es por ello que la idea de que subtipo de receptor está implicado en uno u otro proceso viene dada mediante el comportamiento de los diferentes agonistas. Sin embargo, debemos tener en cuenta que la existencia de receptores P2 metabotrópicos en el proceso de re-epitelización corneal ya ha sido descrito anteriormente por otros grupos (Yang et al., 2004; Klepeis et al., 2004; Weinger et al., 2005). La presencia de los receptores P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₁₁ en la superficie de las células epiteliales corneales, está claro desde un punto de vista farmacológico. Sin embargo, existe controversia sobre la presencia de receptores P2Y₁ o P2Y₆ aunque, el ensayo de UDP junto con la el ensayo de la actividad hexoquinasa, sugieren la presencia del receptor P2Y₆ en este tipo de células (Yang et al., 2004). En este mismo periodo de tiempo se llevaron a cabo estudios de inmunolocalización de receptores P2Y en el ojo de rata (Pintor et al., 2004c), revelando la presencia de receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ en el epitelio corneal. Además, se ha localizado el receptor P2Y₂ en el epitelio corneal tanto en conejo como en mono (Cowlen et al., 2003).

El perfil farmacológico descrito para los compuestos que aceleran la velocidad de migración (Ap_4A , ATP y UTP), se ajusta bastante bien al descrito por Lazarowski et al., (1995) cuando en estudios realizados en células de astrocitoma humano (1321N1) transfectadas con el receptor P2Y₂, observa que Ap_4A es capaz de activar a este receptor de forma muy similar a como lo hacen ATP y UTP. Además, si observamos los comportamientos dosis-respuesta obtenidos para los tres compuestos, vemos como tanto Ap_4A como UTP tienen un comportamiento sigmoide mientras que ATP tiene un comportamiento en forma de campana. Este comportamiento obtenido para ATP se corresponde íntegramente con el comportamiento observado por Klepeis et al., (2004) tanto en células de epitelio corneal de conejo como en células de una línea inmortal humana (HCE-T), donde la exposición a bajas concentraciones de ATP producen el

máximo incremento en la movilidad celular, concluyendo estos autores que en la aceleración del proceso de migración celular están involucrados receptores de tipo P2Y₂ y P2Y₄ (Weinger et al., 2005), siendo el receptor P2Y₂ el involucrado principalmente en el efecto de ATP. Patel et al., (2001) también confirman que Ap₄A es el agonista dinucleotídico más efectivo en la activación del receptor P2Y₂ en distintos sistemas (oocitos de *X.laevis* y astrocitos entre otros), y evidencian el efecto selectivo por este receptor ya que tratamientos con toxina pertúsica (evita la unión de las proteínas G a los receptores de membrana) no afectan a la respuesta de Ap₄A.

Un perfil P2Y₂ similar ha sido previamente descrito para los procesos de re-epitelización corneal y secreción lagrimal, pero la limitación del trabajo con animales vivos no había permitido obtener conclusiones relacionadas con aquellos compuestos con la capacidad de frenar la migración celular (Pintor et al., 2004a).

Con el empleo de células epiteliales corneales en cultivo, ha sido posible detectar algunos dinucleótidos que producen un retraso en el proceso de migración celular (Ap₃A, Ap₅A y UDP). Este resultado, junto con el estudio con mononucleótidos ha sido fundamental para generar un perfil de los compuestos que reducen la velocidad de re-epitelización corneal. Este perfil es el siguiente: Ap₅A > Ap₃A \cong UDP, y sugiere la presencia de un receptor purinérgico P2Y₆. Este perfil se corresponde con el descrito por Patel et al., (2001), donde demostraron que en estudios realizados con diadenosina polifosfatos y el receptor P2Y₆ expresado de forma heteróloga en células 1321N1, tanto Ap₃A como Ap₅A son agonistas de este subtipo de receptor P2Y, aunque la concentración requerida para la estimulación del receptor sea mayor que la necesaria para su mejor agonista, el UDP. Recientemente, el diseño de nuevas moléculas de dinucleósido polifosfatos en las cuales se unen dos unidades de uridina con un número variable de fosfatos (Up_nU), ha demostrado que alguno de ellos son efectivos en parte en la activación del receptor P2Y₆ (Pendergast et al., 2001). En trabajos previos (Communi et al., 1996; Nicholas et al., 1996b) se demostraba que el agonista efectivo para el receptor era P2Y₆ era el nucleótido UDP, y que ni UTP ni los dinucleótidos de adenina eran capaces de activar este receptor. Nosotros hemos demostrado que tanto Ap₃A como Ap₅A son capaces de activar este receptor en el epitelio corneal de conejo

lesionado, con una potencia similar a la de UDP, lo que contradice la idea de que el receptor P2Y₆ sea un receptor de tipo pirimidinoceptor sensible a UTP y UDP.

Por lo tanto, farmacológicamente podemos definir dos perfiles de activación de receptores en las células del epitelio corneal de conejo en cultivo tras la incubación del mismo con los dinucleótidos, una activación del receptor P2Y₂ causante de la aceleración de la migración del epitelio, y un receptor P2Y₆ implicado en el proceso opuesto. Lo que había que comprobar, una vez definido esto, era si los efectos observados eran debidos a los propios dinucleótidos ensayados, o si por el contrario eran causados por algún producto de degradación de los mismos. Estos dinucleótidos de adenina se degradan mediante ectonucleotidasas en una cascada de diversos pasos catabólicos cuyos productos son los distintos adenosina 5' fosfatos y el AMP (Miras-Portugal et al., 1999; Zimmerman, 2000; Rotllan et al., 2002) en cuyo último término dan lugar a la molécula de adenosina. Todos los productos derivados del catabolismo de los dinucleótidos (por ejemplo ATP, ADP y adenosina) son fisiológicamente activos, por eso era de especial interés conocer si existía degradación de estos dinucleótidos tras el proceso de incubación de los cultivos lesionados. En este trabajo hemos estudiado esta degradación analizando los sobrenadantes celulares mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). El estudio mediante HPLC es una técnica extremadamente útil para determinar la especificidad de sustrato y los productos de reacción de las ectoenzimas para los dinucleótidos. La lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm permite detectar todos los dinucleótidos de adenina así como sus productos de degradación, siendo los protocolos de HPLC en fase reversa con par iónico (el que nosotros empleamos) uno de los métodos más ampliamente empleados para el estudio de degradación de estos compuestos en distintos tipos celulares (Ogilvie et al., 1989; Rodríguez-Pascual et al., 1992; Pintor et al., 1992a; Picher y Boucher, 2000). En base a nuestros resultados de HPLC, nosotros no observamos ningún tipo de hidrólisis de los dinucleótidos testados (Ap₄A y Ap₃A) (Figura 22), con lo cual estamos seguros de que los efectos de aceleración y retardo de la migración epitelial observados *in vitro* son a causa del efecto directo de de los dinucleótidos y no de alguno de sus productos de hidrólisis.

Este efecto dual de los diadenosina polifosfatos (activación del receptor P2Y₂ vía Ap₄A y activación del receptor P2Y₆ vía Ap₃A y Ap₅A) puede tener implicaciones fisiológicas en el tejido intacto. El proceso de re-epitelización corneal se lleva a cabo principalmente en tres fases: fase de latencia (fase 1) (entre las 4 y 6 horas posteriores a la lesión y donde se produce una reorganización de la célula para dar lugar a la siguiente fase del proceso), fase de migración (fase 2) (dura hasta las 24 y 36 horas del inicio de la lesión y en ella se produce el desplazamiento de las células del margen de la lesión para cubrir el hueco dejado) y fase de división celular (fase 3) (puede llevar hasta varios meses, ya que las células madre del limbo esclero-corneal comienzan a dividirse y desplazarse, y la proliferación de las células epiteliales dura hasta que el grosor del epitelio normal se ha recuperado) (Steele et al., 1999; Suzuki et al., 2003). En el epitelio corneal en corneas intactas, los receptores que facilitarían la migración celular (fase 2 del proceso de re-epitelización) serían los receptores P2Y₂ (Pintor et al., 2004a). Es necesario tener en consideración que en el modelo celular que empleamos, la fase de latencia (fase 1) está reducida. Esta reducción es porque las células no requieren realizar los mecanismos celulares que se producen en esta fase cuando se trata de corneas intactas. En la cornea *in vivo* los leucocitos polimorfonucleares eliminan las células necróticas del margen de la lesión, mientras que las anclajes en hemidesmosomas entre la membrana basal y las células basales desaparece (Steele et al., 1999; Suzuki et al., 2003). Todos estos fenómenos no ocurren en cultivo puesto que solo tenemos una monocapa de células epiteliales. Por el contrario, la activación de los receptores P2Y₆ puede que sea crítica para detener la fase de migración y dar inicio a la fase de división celular (mitosis, fase 3). Lo que si es cierto, es que no tenemos ninguna evidencia sobre el papel del receptor P2Y₆ que confirme este hecho, pero no sería descabellado pensar en los receptores P2Y₂ y P2Y₆ como en “interruptores” que controlarían la fase 2 y 3 del proceso de re-epitelización corneal.

Si tanto Ap₄A como Ap₅A se encuentran juntos de forma natural en la lágrima de conejo (Pintor et al., 2002a), ¿Cómo podríamos explicar la hipótesis de la actuación de los receptores P2Y₂ y P2Y₆ como interruptores para controlar las fases 2 y 3 del proceso de cicatrización celular? Considerando que Ap₄A acelera la migración y que Ap₅A lo opuesto, si estas acciones se llevan a cabo conjuntamente, no observaríamos ningún efecto aparente en la cicatrización de lesiones corneales *in vivo*. Sin embargo, un

estudio detallado de la concentración de ambos dinucleótidos en la lágrima de conejo, indican que la concentración de Ap₄A es cinco veces mayor que la de Ap₅A (3 μM para Ap₄A y 0.6 μM para Ap₅A). Teniendo en cuenta estos valores y los resultados de los ensayos de concentración-respuesta, el efecto predominante es el llevado a cabo por Ap₄A.

Otro punto interesante relacionado con el previo, es conocer si los valores de ambos dinucleótidos varían tras una lesión corneal. Experimentos *in vivo* realizados en nuestro laboratorio han demostrado que los niveles de Ap₄A y de Ap₅A se reducen de forma significativa tras la lesión y que se recuperan a las 10 horas (Figura 23 para Ap₄A y resultado no mostrado para Ap₅A). Bajo condiciones experimentales, aunque las concentraciones de Ap₄A y de Ap₅A se reducen, mantienen la proporción entre las respectivas concentraciones que se producen en la lágrima en condiciones normales (3 μM para Ap₄A y 0.6 μM para Ap₅A, ratio 5:1). Además, estos niveles permanecen bajos durante la fase de latencia y aumentan en el periodo de migración, hasta las 32 horas post-lesión aproximadamente, manteniendo la proporción 5:1 para Ap₄A:Ap₅A, lo que sugiere que los dinucleótidos están implicados en esta fase de migración, y siendo prevalente Ap₄A. Por eso el efecto global que observamos tras una lesión del epitelio corneal es el incremento en la velocidad de migración.

Como ya hemos mencionado, no existen antagonistas efectivos para demostrar la participación de los distintos subtipos de receptores purinérgicos P2 en los procesos celulares (von Kugelgen, 2006). Esto nos lleva a tener que identificar los mismos mediante el empleo de agonistas, lo cual, muy frecuentemente, nos conlleva resultados contradictorios cuando estudiamos aparentemente el mismo receptor en distintos tejidos (Burnstock, 2006). En nuestro caso, experimentos previos establecían que la aplicación de Ap₄A a una lesión corneal tanto *in vivo* como *in vitro*, producía un aumento en la velocidad de migración (Pintor et al., 2004a; Mediero et al., 2006). En estos momentos solo se podía sugerir la presencia y participación del receptor P2Y₂ debido a los perfiles farmacológicos.

Es por ello que decidimos abordar el proceso acelerador de la migración de Ap₄A / P2Y₂ mediante la tecnología del ARN de interferencia (RNAi). El

silenciamiento de la expresión de genes, con el descubrimiento de los siRNA (ARN interferente de pequeño tamaño), se ha convertido en un abordaje muy atractivo para entender el papel de las proteínas en la bioquímica y en la fisiología de los tejidos (Wadhwa et al., 2004), sin la necesidad de diseñar animales transgénicos y ha permitido tratar diversas patologías (Watanabe et al., 2007; Dore-Savard et al., 2008; Zhao et al., 2008). El ojo es un tejido relativamente aislado por lo que se convierte en una diana excelente para la terapia génica (Bumcrot et al., 2006; Campochiaro, 2006; Mediero et al., 2009). Los siRNA han sido empleados en modelos animales de forma satisfactoria donde la inyección de los mismos en el vitreo difunde de forma rápida hacia el resto de estructuras oculares y es detectado durante al menos cinco días (Shen et al., 2006). Esto permite un silenciamiento de un gen a nivel local con muy pequeñas posibilidades de silenciar el mismo gen fuera del ojo, reduciendo por tanto los efectos remotos en otros tejidos.

Se diseñaron dos secuencias de siRNAs a partir de la secuencia de ADNc clonada por parte de la Dra. Almudena Crooke para el receptor P2Y₂ de conejo. La eficiencia de transfección y el silenciamiento del gen se confirmó en la línea celular SIRC. P2Y₂ siRNA # 2 producía un claro descenso en la producción de proteína como se observaba en los estudios de inmunocitoquímica realizados. Además, tanto la secuencia P2Y₂ siRNA # 1 como la secuencia P2Y₂ siRNA # 2 producían una reducción en la velocidad de migración del epitelio lesionado y tratado con Ap₄A. Estos resultados confirman el efecto específico sobre la diana de los siRNA para el receptor P2Y₂ elegidos. Tenemos que tener en cuenta que de estos dos siRNA elegimos el P2Y₂ siRNA # 2 para los estudios *in vivo* debido a su mayor capacidad de reducción de la migración. Para conseguir un silenciamiento efectivo con un siRNA en modelos de experimentación *in vivo*, es crítico el diseño específico de los mismos y además la elección de la ruta de aplicación. De entre las rutas oculares de administración, hemos elegido la administración tópica, porque nuestro tejido diana (cornea), es el más externo y no necesitamos una técnica invasiva para que el siRNA acceda a ella. Debido a las características protectoras de la cornea, realizamos diversas instilaciones consecutivas, y no fuimos capaces de observar ninguna anomalía en la misma como consecuencia de estas administraciones seriadas.

La eficiencia del silenciamiento del receptor P2Y₂ se ha confirmado en animales vivos mediante el empleo de RT-PCR cuantitativa (RT-PCRq) e inmunocitoquímica. Además, la reducción en ARNm y proteína descarta la posibilidad de actuación de un mecanismo relacionado con miRNA (microRNA) (Jackson y Linsley, 2004; Behlke, 2006).

Nuestros resultados también nos indican que tras una lesión del epitelio corneal, el tratamiento de las mismas con Ap₄A, encontramos un marcaje para el receptor P2Y₂ algo inferior que en las lesiones control. Como ocurre para otros agonistas (por ejemplo la insulina o cualquier otra hormona) (McArdle et al., 1999; Borgland, 2001; Spampinato et al., 2007), cuando Ap₄A se une a su receptor P2Y₂ en la superficie celular, el complejo Ap₄A-P2Y₂ es endocitado y atacado por las enzimas lisosomales intracelulares. La internalización de las moléculas de Ap₄A-P2Y₂ mantiene una ruta de degradación del dinucleótido así como una regulación del número de los sitios de unión disponibles en la membrana celular. El ratio de síntesis de nuevos receptores dentro del retículo endoplasmático y la inclusión en la membrana plasmática no mantiene el ritmo de degradación, y con el tiempo, esta pérdida de receptores P2Y₂ reduce las células diana sensibles a la elevada concentración de Ap₄A.

Como ya sabemos, el proceso de cicatrización corneal *in vivo* se produce en tres etapas: fase de latencia (hasta las 10 horas posteriores a la lesión), fase de migración (hasta las 24 – 36 horas posteriores a la lesión) y fase de proliferación o de división celular (dura de semanas a meses) (Steele, 1999). Como solo nos hemos centrado en el estudio del efecto del siRNA para el receptor P2Y₂ en a en la fase de migración, solo nos interesan los eventos que se producen hasta las 36 horas posteriores a la lesión, periodo de tiempo en el cual nuestro siRNA es efectivo.

Otros autores han empleado la tecnología del siRNA para silenciar la expresión del receptor P2Y₂ para conocer el papel bioquímico de este receptor. Por ejemplo Arthur et al., (2005) han descrito la participación de P2Y₂ como receptor morfogénico capaz de potenciar la señalización neurotrófica en el desarrollo neuronal. Y no solo se ha empleado la estrategia silenciadora de los siRNA para silenciar el receptor P2Y₂, sino que también se ha utilizado para silenciando dianas de la cascada, estudiar la

implicación de este subtipo de receptor purinérgico en esa cascada. Taboubi et al., (2007) han estudiado como la activación del receptor P2Y₂ está acoplada de forma negativa a la movilidad de los queratinocitos mediante el silenciamiento de la proteína G α (q/11). Estos autores observaron que la activación del receptor purinérgico mediante ATP en los queratinocitos tiene un efecto antimigratorio, revelando que en los queratinocitos humanos el papel que le receptor P2Y₂ ejecuta en la migración es el opuesto al efecto que nosotros hemos visto en la migración del epitelio corneal de conejo tanto *in vivo* como *in vitro*. En el epitelio de la glándula salival, el silenciamiento de la expresión del receptor de EGF evita la sobrerregulación de VCAM-1 cuando P2Y₂ es activado por UTP, lo que sugiere la participación de P2Y₂ en la expresión de VACM-1 y en la unión a linfocitos, una de las vías relevantes en la inflamación asociada con el Síndrome de Sjögren (Baker et al., 2008). Además de estos estudios, el silenciamiento del receptor P2Y₂ se ha empleado para demostrar los cambios en el ARNm de este receptor tras los tratamientos con agonistas del receptor P2X₇ (D'Alimonte et al., 2007). En otros casos, el silenciamiento de receptores P2Y ha sido una herramienta eficaz para demostrar la hetero-oligomerización de P2Y₁ y P2Y₁₁ necesaria para la internalización de P2Y₁₁ (Ecke et al., 2008), y para demostrar el papel del receptor P2Y₁₀ como receptor dual de fosfolípidos (Murakami et al., 2008).

La demostración de la presencia y de la participación del receptor P2Y₂ en el proceso de cicatrización corneal permitirá desarrollar compuestos para el tratamiento de las lesiones corneales y incluso para la reparación corneal tras los tratamientos con cirugía refractiva. Esta claro que compuestos estables y selectivos son necesarios para producir un proceso de cicatrización corneal sostenido y positivo. Esto es incluso más relevante si tenemos en cuenta la presencia de enzimas que degradan los nucleótidos en la superficie ocular y la presencia de receptores P2 con la capacidad de frenar el proceso de re-epitelización corneal (Jumblatt y Jumblatt, 1998). En este contexto, ya hemos demostrado que tras la incubación de las células con Ap₄A (e incluso en presencia de Suramina), el análisis por HPLC de este en el sobrenadante, no revela indicios de hidrólisis, y la presencia de este en concentración cinco veces superior a la de Ap₅A (uno de los dinucleótidos que frenan la migración), nos reflejan en último grado, que la activación directa del receptor P2Y₂ por el dinucleótido Ap₄A, es el candidato idóneo como tratamiento farmacológico de las lesiones corneales.

En resumen, los diadenosina polifosfatos realizan un papel dual en las células del epitelio corneal. Por un lado, Ap₄A es capaz de acelerar la velocidad de migración, mientras que Ap₃A y Ap₅A frenan dicho proceso. Se necesita realizar más trabajo para comprender el entrecruzamiento entre estas dos acciones descritas. El clonaje y posterior diseño del siRNA para el receptor P2Y₂ ha permitido demostrar la implicación de este receptor en un proceso tan importante como la cicatrización corneal. Esto demuestra que el empleo de siRNA para silenciar proteínas es una herramienta interesante en el caso de los receptores donde no existen antagonistas selectivos para probar su participación en los procesos bioquímicos y fisiológicos.

5.2.- IMPLICACIÓN DE LAS RUTAS INTRACELULARES DE MAPK Y DEL CITOESQUELETO DE ACTINA EN LA ACELERACIÓN DE LA MIGRACIÓN VÍA Ap₄A / P2Y₂.

En relación a los sistemas de segundos mensajeros implicados en la transducción de la señal tras la activación de estos receptores purinérgicos, parece claro que tanto la movilización de Ca²⁺ intracelular (Suzuki et al., 2003; Klepeis et al., 2004; Weinger et al., 2005) como la activación de la cascada de las MAPQuinasas (Yang et al., 2004) son las involucradas. Por otro lado, está clara la participación del citoesqueleto de actina en el movimiento celular (Ridley, 2003). Según los ensayos realizados por Weinger et al., en 2005, los receptores implicados en la migración del epitelio corneal están implicados los receptores P2Y₂ y P2Y₄, activando las rutas intracelulares mencionadas. Estos resultados concuerdan con el efecto de Ap₄A, UTP y ATP descrito, que indica la activación de un receptor del subtipo P2Y₂. Por tanto, nos decidimos estudiar la activación de estas rutas intracelulares en nuestro modelo de migración del epitelio corneal.

Para poder llevar a cabo estos ensayos, necesitábamos un volumen celular que con los cultivos primarios de epitelio corneal no éramos capaces de obtener. Por eso decidimos saltar a una línea establecida de epitelio corneal de conejo (SIRC).

Lo primero fue comprobar si realmente esta línea se comportaba de la misma manera que las células epiteliales obtenidas de la córnea de un animal vivo. El

comportamiento de la migración tras los tratamientos con Ap₄A y Ap₃A, tanto en presencia como en ausencia de los diversos antagonistas testados, en las células de la línea establecida y en los cultivos primarios es prácticamente igual (ver Resultados), lo que nos permitió realizar todos los experimentos subsecuentes en la línea SIRC de epitelio corneal, estando seguros de que el comportamiento va a ser extrapolable al del epitelio corneal en cultivo primario.

Comenzamos estudiando la participación de las rutas de MAPK ERK1/2 y del citoesqueleto de actina RhoA / ROCK-I en la aceleración de la migración activado por Ap₄A, para posteriormente corroborar la participación de estas proteínas estudiando los niveles de las mismas tratadas con antagonistas e inhibidores para receptores P2, ERK1/2 y ROCK-I. De las dos isoformas de ROCK existentes, hemos estudiado la activación de ROCK-I porque SundarRaj et al., en 1998 observaron la presencia de esta isoforma en el epitelio corneal y vieron que la marcada presencia en la transición limbo-epitelio indicaba el papel fundamental de ROCK-I en diversas funciones epiteliales.

A nivel de migración, los resultados presentados muestran que el bloqueo de las dos rutas intracelulares (ERK1/2 y ROCK-I) con sus correspondientes inhibidores, reduce de forma significativa la habilidad de Ap₄A de incrementar la velocidad de migración.

La regulación del citoesqueleto de actina se lleva a cabo mediante la activación de la familia de las GTPasas Rho, constituida por tres miembros: cdc42, Rac y Rho, todas ellas selectivamente activadas por factores de crecimiento y neurotransmisores (Ridley, 2001). Cada uno de los miembros de esta familia, regula el citoesqueleto de actina de una manera distinta, siendo la formación de filopodios debida a cdc42, la síntesis de lamelipodios vía Rac1 y la formación de fibras de estrés y de adhesiones focales vía RhoA, siendo todos ellos muy importantes en la cicatrizaciones de lesiones (Desai et al., 2004), aunque parece ser esta ruta de RhoA / ROCK-I la que controla mayoritariamente el proceso, ya que el tratamiento con Y27632 produce una rápida desorganización de los haces de fibras marginales (Omelchenko et al., 2003). En las células en migración tanto cdc42 como Rac1 se sitúan en el frente de las células dirigiendo la dirección de la migración, mientras que RhoA se distribuye en el citosol

teniendo un papel clave en el recambio de las adhesiones de las células a la matriz extracelular y en la reorganización de los microtúbulos entre ellos (Watanabe et al., 2005). Por ello, es razonable pensar que el incremento en la velocidad de migración inducido por Ap₄A vía el receptor P2Y₂ esté unido a la activación de la ruta intracelular de RhoA / ROCK-I, puesto que se ha demostrado que esta vía intracelular esta unida a los cambios de contractilidad celular producidos por el citoesqueleto de actina (Sander et al., 1999). La confirmación de este dato ha sido llevada a cabo mediante el empleo de compuestos que inhiben la vía de señalización tales como PAO (inhibidor de RhoA al unirse a la región de intercambio de nucleótidos), Y27632 (inhibidor a nivel de ROCK-I) ML7 (inhibidor de la MLCK) y (-)-Blebbistatina (inhibe la miosina 2), lo que evita de forma significativa el efecto pro-migratorio de Ap₄A, siendo tan relevante el proceso inhibido que se conduce incluso a la muerte celular, como es el caso de PAO y ML7. Cuando se estimulan las células con Ap₄A en presencia de un agonista de la ruta (Profilina) nos deja un incremento en la velocidad de migración inferior al encontrado cuando tratamos las células del epitelio corneal con Ap₄A solo. Esto es debido probablemente a que cuando incubamos las células con esta proteína, ocupamos los sitios de unión en la ruta de RhoA / ROCK-I, y por eso el tratamiento posterior con Ap₄A no es capaz de acelerar la migración en el mismo nivel que el tratamiento de Ap₄A solo, porque los sitios a los que debe unirse ya están ocupados por PTD4-PfnI. Además, parece claro que las rutas de activación del citoesqueleto de actina vía cdc42 y Rac1 también estarían implicadas, puesto que no se abole totalmente la migración cuando inhibimos la ruta RhoA / ROCK-I, pero esta última sería la ruta principal.

No solo hemos confirmado la implicación de estas proteínas en la migración de epitelio corneal lesionado en base a estudios farmacológicos, sino que el estudio (por Western Blot) de la activación de ROCK-I ha confirmado la implicación de esta vía intracelular. Cuando tratamos las células con Ap₄A se produce un incremento en la fosforilación de ROCK-I el cual es revertido cuando pre-tratamos con suramina para bloquear el receptor P2Y₂, confirmando por tanto la participación de esta ruta en la activación de la migración celular vía Ap₄A / P2Y₂. Además, la activación de RhoA / ROCK-I por Ap₄A / P2Y₂ se confirma con el estudio de fosforilación de MLC-2, sustrato de ROCK-I.

Este no es el único caso en el cual los receptores purinérgicos están acoplados a la activación de RhoA / ROCK-I en la cornea. En el endotelio corneal bovino, se ha visto que la activación del receptor P2Y₂ vía ATP, para mantener la integridad de la barrera endotelial, produce la defosforilación de MLC tanto en células en reposo como en células activadas por trombina, produciendo la regulación negativa del eje ROCK-MLCP (Satpathy et al., 2005), resultados opuestos a lo observado por Somlyo y Somlyo en 2003, donde la activación de P2Y₂ vía ATP produce la fosforilación de MLC vía rutas sensibles a Ca²⁺ y a la activación de PKC. Harvey et al., en 2004 han demostrado que durante el proceso de cicatrización de lesiones del estroma corneal humano, tanto citoquinas endógenas como factores de crecimiento modulan la señalización de RhoA / ROCK-I, fundamental para la adquisición del fenotipo de miofibroblasto, y como ROCK orquesta de forma recíproca la síntesis de mediadores celulares (por ejemplo TGFβ-2, PDGF-D, etc) y la respuesta celular a FGF, HGF y ET.

En otros sistemas, se ha visto que tanto ATP, UTP como UDP son capaces de traslocar RhoA a la membrana de miocitos aórticos (de forma similar a como lo hacen otros agonistas acoplados a proteínas G como norepinefrina y trombina), produciendo la activación de esta y la formación de filamentos de actina organizados (Sauzeau et al., 2000), por la activación de receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆. Por otro lado, se ha estudiado la expresión de receptores P2 en las células madre hematopoyéticas humanas, encontrando que ATP y UTP juegan un papel pivotante en la regulación de este tipo celular y del resto de células del sistema inmune, siendo UTP capaz de favorecer la migración celular gracias a la activación de la cascada de Rho GTPasas (Rossi et al., 2007). Además, la activación de receptores P2Y aceleran la permeabilidad del endotelio vascular viendo que esto es debido a la fosforilación de MLC (Tanaka et al., 2005).

Los receptores P2Y están acoplados de manera habitual a la vía de la PKC / PLC. Diversos trabajos han identificado la participación de la cascada intracelular de señalización de PKC / PLC en la migración celular en diversos tipos celulares, así como en la progresión de tumores (Ando et al., 1993; Itoh et al., 2001; Koivunen et al., 2004), así como acoplados a la activación de ROCK (Street et al., 2006). Por ello hemos estudiado la implicación de PKC / PLC tanto en el proceso de migración como en la activación de ROCK-I cuando tratamos las lesiones con Ap₄A. En el proceso de

migración hemos encontrado un notable descenso en la misma cuando pre-tratamos con inhibidores de PKC y PLC, datos que confirman los resultados de un trabajo previo realizado *in vivo* (Pintor et al., 2004a) donde se demostró que la migración en las lesiones corneales producidas en corneas de conejo era bloqueada por Estaurosporina, un inhibidor de PKC. El estudio de la activación de ROCK-I, nos confirma la participación de PKC / PLC ya que al tratar las células lesionadas con los inhibidores de estas proteínas se produce un significativo descenso en la activación del citoesqueleto de actina, lo que sugiere que el receptor P2Y₂ puede activar la ruta clásica de activación de PLC y PKC, y esto estaría conectado con la activación de RhoA / ROCK-I.

Además, los receptores P2Y₂ presentes en las células del epitelio corneal pueden activar la cascada de las MAP Quinasas como hemos demostrado tanto a nivel de migración, donde hemos visto que el pre-tratamiento con U0126 abole el efecto acelerador de Ap₄A, como a nivel de expresión de la proteína pERK1/2, donde la tirfostina AG1478 o el inhibidor de MEK U0126, evitan la fosforilación de ERK1/2 (Ahmad et al., 2004; Delicado et al., 2005), lo que implicaría que la activación de los receptores P2Y₂ estaría relacionada con la activación de la ruta intracelular de ERK1/2 vía la transactivación de un receptor tirosin quinasa tales como los receptores para EGF (Pintor et al., 2004; Yang et al., 2004).

Estos resultados vienen abalados por lo descrito por Weinger et al., en 2005, que han observado que el tratamiento con nucleótidos extracelulares (ATP y UTP) activa receptores P2 que inducen respuestas iniciales que se producen al poco de causarse la lesión en el epitelio corneal, y también activan respuestas a largo plazo, activando entre otras la vía de ERK1/2. Estos mismos autores (Klepeis et al., 2004) han estudiado la transactivación con el receptor EGFR, viendo como el tratamiento con tirfostinas inhibe el efecto pro-migratorio de ATP en las células epiteliales (lo que confirma nuestra hipótesis de activación de rutas intracelulares vía P2Y₂). Otros trabajos corroboran la activación de ERK1/2 en el proceso de migración celular en la cornea activada por otros agonistas. Se ha visto que en la diabetes, la migración del epitelio corneal está alterada, y que el tratamiento con insulina de lesiones del epitelio corneal humano en cultivo producen una aceleración del proceso migratorio debido a la activación de ERK1/2 (Shanley et al., 2004). Además, se ha visto que tanto NGF como la Sustancia P, PAF,

KGF y HGF están positiva o negativamente implicados en la modificación la migración del epitelio corneal todo ello con la activación de MAPK en varios tejidos (Bazan et al., 1997; Nakamura et al., 1998; You et al., 2001).

En cuanto a la activación de la vía ERK1/2 por los receptores purinérgicos, se ha demostrado que la activación por P2Y₂ en la supervivencia celular tras hiperoxia (Ahmad et al., 2004), en células de riñón embrionarias humanas (HEK-293) (Gao et al., 1999), así como en el papel antiapoptótico de esta vía en neuronas activadas por ATP γ S, ATP o UTP (Arthur et al., 2006). También se ha visto la activación de ERK1/2 mediante otros subtipos de receptores purinérgicos. Por ejemplo, la salida de ATP por lesión mecánica en astrocitos, produce la señalización de ERK1/2 (Neary et al., 2003) vía P2X₂ y P2Y₁. P2Y₁ se ha visto también implicado en la activación de ERK1/2 en la activación como co-neurotransmisor de ATP en la unión neuromuscular (May et al., 2006). Por último, ATP produce la activación de P2Y₂ y P2Y₄ en las células cromafines adrenales, y en respuesta a esta activación se produce la activación de ERK1/2 (Luke y Hexum, 2008).

Es importante tener en cuenta que ambas cascadas intracelulares (RhoA / ROCK-I y ERK1/2) parecen estar activadas de forma simultánea, aunque la activación de ROCK-I se produce 30 minutos antes que la activación de ERK1/2, y de modo inesperado, los inhibidores de una de las cascadas modifica la actividad de la otra: Y27632 reduce de forma significativa la fosforilación de ERK1/2 producida por Ap₄A, mientras que U0126 reduce la fosforilación de ROCK-I, cuando las células lesionadas son tratadas con Ap₄A. Un hecho interesante es que cuando realizamos ensayos de migración en presencia de U0126, la velocidad de migración se reduce por debajo de los valores basales, y cuando analizamos los niveles de expresión de ROCK-I, estos son también inferiores a los niveles control. Esto, junto con que la activación de ROCK-I se produce antes en el tiempo, sugiere que la ruta principal responsable de la migración celular en el epitelio corneal es la cascada en la cual RhoA / ROCK-I está implicada. Por otro lado, no podemos descartar la participación de ERK1/2 en el proceso de migración, pero parece plausible que la cascada de las MAPK está más involucrada en los procesos relacionados con los efectos a largo plazo de ERK1/2 ya que esta es traslocada al núcleo celular. Además, la relación entre pERK1/2 y ROCK-I es tan

estrecha que Y27632 es capaz de dificultar la traslocación de p-ERK1/2 al núcleo. El significado bioquímico de la conexión entre ambas vías es una cuestión que debemos elucidar, y han sido descritas una serie de hipótesis, todas diferentes y contradictorias, en relación con la posible conexión entre pERK1/2 y ROCK-I (Brunet et al., 1999; Pawlak et al., 2002; Roovers et al., 2003; Bessard et al., 2006), donde se indica que ambas rutas son independientes, que una activación crónica de MEK induce una regulación negativa de ROCK-I o que Y27632 bloquea la activación sostenida de ERK1/2, dependiendo del sistema celular estudiado. En base a nuestros resultados, nosotros hemos elucidado que en el entrecruzamiento encontrado entre ambas rutas cuando tratamos las células del epitelio corneal lesionadas con Ap₄A, ROCK-I está localizado por encima de ERK1/2 y que lo regula. Esto explicaría el descenso en la fosforilación de ERK1/2 cuando las células lesionadas son pre-tratadas con los inhibidores de PKC / PLC (Figura 58).

Por el momento podemos sugerir lo siguiente: el proceso de cicatrización corneal es un proceso dividido en tres etapas; fase de latencia (hasta las 10 horas del inicio de la lesión), fase de migración (24 a 36 horas) y etapa de proliferación (desde las 36 horas hasta días) (Steele, 1999). Esto último implica la activación de diversos procesos en los cuales de traslocación de pERK al núcleo es obligatoria. Se ha demostrado que la inhibición de ERK1/2 reduce la síntesis de ADN y arresta las células durante la fase de mitosis (Willard et al., 2001), ya que la activación ERK es necesaria para la transición G2/M (Wang et al., 2007), por lo que no es extraño el pensar que la activación del receptor P2Y₂ por Ap₄A produce la activación de ERK1/2 para preparar las células epiteliales para la fase de mitosis.

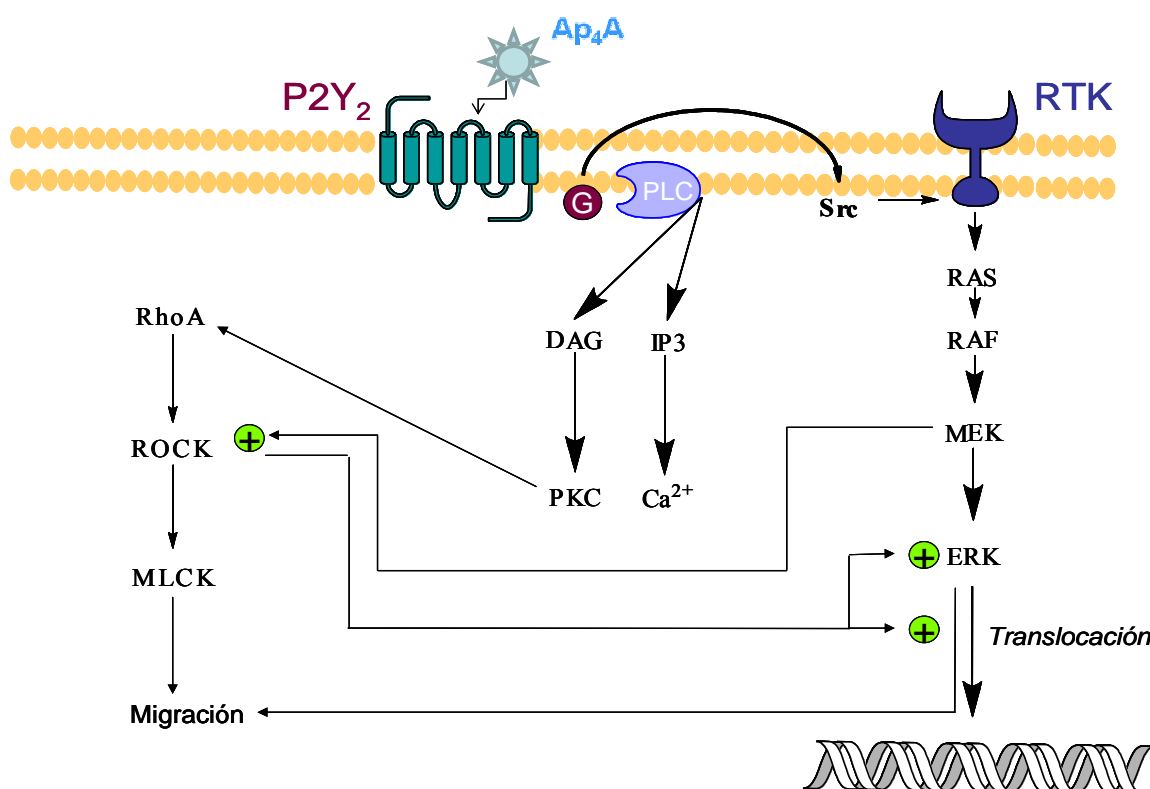


Figura 56: Cross-talk entre las cascadas intracelulares de MAPK y RhoA / ROCK-I tras la activación de los receptores P2Y₂ vía Ap₄A.

Finalmente, podemos concluir que Ap₄A vía la activación del receptor P2Y₂, es capaz de activar tanto la cascada de las MAPK como la cascada de RhoA / ROCK-I, y ambas son necesarias para el proceso de migración, estando la vía de ERK1/2 también involucrada en procesos a largo plazo.

5.3.- IMPLICACIÓN DE LAS RUTAS INTRACELULARES DE MAPK EN EL RETARDO DE LA MIGRACIÓN VÍA Ap₃A / P2Y₆.

Hasta el momento, este es el primer trabajo en el que se describe que la activación con un agonista produce un retraso en el proceso de migración del epitelio corneal tras una lesión. Es por ello importante conocer cual es el mecanismo molecular por el que esto sucede, ya que cuando se produce una lesión *in vivo*, lo que interesa es que regenere lo antes posible.

Como ya hemos mencionado, la activación de las células del epitelio corneal lesionadas con Ap₃A y Ap₅A (junto a UDP) producen un retraso en la migración epitelial, presumiblemente mediante la activación del receptor P2Y₆ y siendo este efecto revertido por la acción de los antagonistas, como hemos definido previamente.

Como en el caso de Ap₄A, estudiamos las rutas intracelulares implicadas en el proceso de retardo de la migración provocado por Ap₃A. De nuevo estudiamos la posible implicación del citoesqueleto de actina, junto con la posible activación de dos de las rutas de MAPK, ERK1/2 y p38. Los resultados en este aspecto han sido bastante contradictorios.

En primer lugar, en relación con el citoesqueleto de actina, observamos que los distintos inhibidores tienen efectos opuestos en la migración del epitelio. Cuando preincubamos las células con el inhibidor de ROCK-I, Y27632, observamos un incremento ligero (aunque de forma significativa) en la migración, mientras que la inhibición de la MLC2 potencia el efecto retardante. Además, la inhibición de la migración vía (-)-Blebbistatina y la activación de la misma con PTD4-PfnI, ambos previos a Ap₃A, parecen indicar que esta ruta no estaría implicada en el retraso de la migración celular producido por Ap₃A. En este sentido, la confirmación del comportamiento contradictorio aparece cuando investigamos la activación de ROCK-I. Y27632 produce un aumento en la fosforilación de ROCK-I, resultado consistente con los estudios de migración. Estos aspectos contradictorios sugieren la participación de otros mecanismos que de momento no conocemos.

Cuando estudiamos el efecto que el inhibidor de MEK, U0126, tiene en la migración de Ap₃A, observamos como este se revierte y se produce una aceleración en la migración, proceso que no se ve afectado con el pre-tratamiento con AG1478 (en presencia de este, se produce un mayor descenso en la migración), lo que sugiere la implicación de la vía de ERK1/2 en el efecto de Ap₃A, pero con un mecanismo diferente al descrito para Ap₄A. Esta implicación se confirma al estudiar la activación de ERK1/2 mediante Western Blot.

La activación de ERK1/2 mediante la señalización mediada por P2Y₆ en el epitelio corneal viene abalado por el trabajo de Yang et al., en 2004, donde observaron como ADP y UDP activan el receptor P2Y₆ y que su administración en lesiones de epitelio producen la activación de ERK1/2. Sin embargo, en este trabajo no indican qué efecto tiene esta activación en el proceso de migración.

Además en otros sistemas celulares, también se ha confirmado la activación de ERK1/2 vía el receptor P2Y₆. Marcel et al., en 2007 han demostrado que la activación de P2Y₆ produce la activación de ERK1/2 entre otras rutas intracelulares regulan la salida de la quimiocina CCL20 en monocitos. En condrocitos, los nucleótidos liberados como respuesta a un estímulo mecánico, y la activación de P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆, transmite señales vía Ca²⁺ y la fosforilación de ERK1/2 (Kudirka et al., 2007). Esta fosforilación de ERK1/2 está implicada también en el papel citoprotector que P2Y₆ tiene en las células C2C12 de músculo esquelético de ratón (Hamedova et al., 2008), así como en la liberación de citoquinas (como por ejemplo la citoquina CXCL8) en las células del epitelio intestinal que se produce cuando el receptor P2Y₆ es activado por UDP (Grbic et al., 2008).

¿Cómo puede ser que la activación de ERK1/2 vía Ap₃A tenga un efecto opuesto a la activación de la misma vía por parte de Ap₄A en el proceso de migración del epitelio corneal? Como hemos mencionado, la activación del P2Y₂ vía Ap₄A, produce la traslocación de los receptores de Tirosin Quinasas mientras que Ap₃A no produce esta traslocación. Por tanto el mecanismo por el cual Ap₃A produce la activación de las ERK1/2 es distinto a la descrita para Ap₄A, y debe estar regulado de forma negativa por otra vía intracelular.

Un estudio llevado a cabo por Sharma et al., en 2003 en células de epitelio corneal lesionadas, tanto de conejo como humanas, reflejan la participación de la ruta de MAPK p38 en la migración y proliferación de estas células tras la activación de las mismas con KGH o HGF, así como la relación existente entre ERK1/2 y p38 (la inhibición de una de las rutas conlleva la activación de la otra en ambos sentidos), siendo p38 una proteína fundamental en la activación del proceso de migración, y activándose por tanto para lograr una cobertura de la lesión más rápida.

Como la activación de p38 en el epitelio corneal lesionado está también respaldada por los trabajos de Saika et al., (2004) y de Nakamura et al., (2005), donde se sugiere la activación de esta proteína en respuesta a diversos agonistas para favorecer la migración del epitelio. Por consiguiente, nos decidimos por estudiar la posible relación existente entre las rutas de ERK1/2 y p38 en nuestro sistema celular cuando este es activado por el agonista Ap₃A, y la implicación real de esta cascada en la migración.

Cuando estudiamos el proceso de migración en presencia del inhibidor de p38 SB203580, encontramos que al igual que ocurre cuando pre-tratamos con U0126, el retardo de la migración se revierte. Los estudios de activación de proteína por Western Blot demuestran que Ap₃A producen una activación en p38 siendo máxima a las 2-4 horas de la lesión, activación retardada en relación a la fosforilación de ERK1/2. Además, cuando estudiamos la interrelación entre ambas rutas, observamos como la inhibición de ERK no afecta a la fosforilación de p38, pero si ocurre a la inversa, que la inhibición de p38 produce una mayor y más sostenida fosforilación en ERK1/2. Todo esto puede significar lo siguiente:

Cuando tenemos un epitelio lesionado y activamos la señalización por Ap₃A, este dinucleótido se va a unir preferentemente al receptor P2Y₆. Esta unión activa las rutas de ERK1/2 y p38, activando primeramente la fosforilación de ERK1/2 para intentar migrar rápidamente y cubrir la zona lesionada. Sin embargo, se produce la fosforilación de p38, que aunque más tarde en el tiempo sería a la larga predominante y se trasmite la señal de regulación negativa de la migración al núcleo (Figura 59).

Además, es posible que Ap₃A también se una de forma secundaria al receptor P2Y₂, y la inhibición de p38 favorezca la activación de ERK1/2 vía este receptor y la transactivación de los receptores Tirocin Quinasa y por eso se produzca la aceleración de la migración (Figura 59).

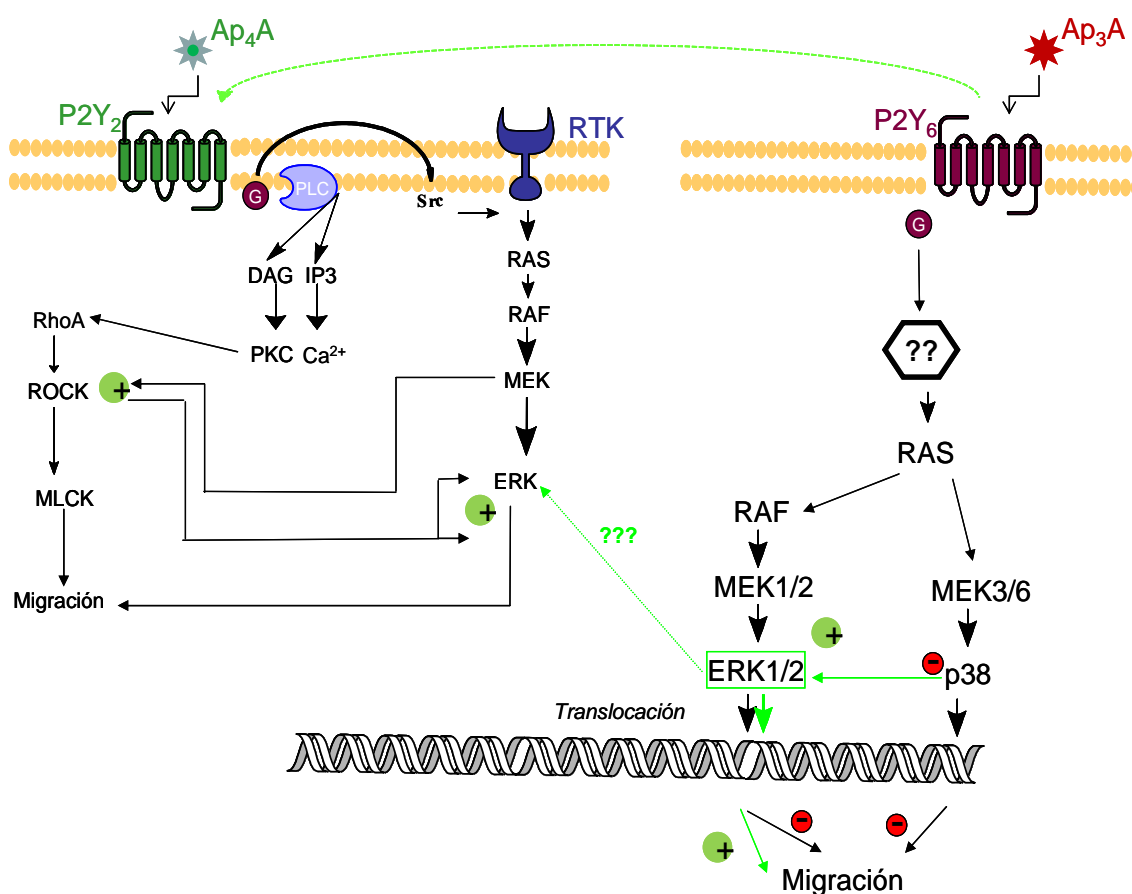


Figura 59: Cascadas intracelulares activadas por P2Y₆ vía Ap₃A.

Por último, tenemos que tener en cuenta que *in vivo* Ap₄A y Ap₃A están conviviendo en las células del epitelio corneal y desarrollando sus acciones sobre las mismas de forma coordinada y actuando sobre las mismas proteínas. Como ya hemos mencionado, la concentración de Ap₄A presente en la lágrima es cinco veces superior a la concentración de Ap₃A, lo que explicaría que en la migración el efecto predominante se el de aceleración del proceso.

De todas formas se necesitan realizar más experimentos para elucidar las señales que activarían p38 y ERK1/2 tras la señalización de Ap₃A / P2Y₆ para que se produzca el retardo en la migración. Por ejemplo se podría estudiar si la señalización vía Ap₃A / P2Y₆ conlleva una activación de PI3K, de PKC o de alguna otra Proteína Quinasa que conduzcan a la activación de p38 y ERK1/2, como han descrito algunos autores tanto en el epitelio corneal (Nakamura et al., 2005), como en otros sistemas celulares (Kim et al., 2003).

5.4.- IMPLICACIÓN DEL CI TOESQUELETO DE ACTINA EN EL PROCESO DE MIGRACIÓN CELULAR.

La motilidad de las células del epitelio es fundamental en la iniciación de la cicatrización corneal tras una lesión. Varios autores (Fujikawa et al., 1981; Nishida et al., 1982) han demostrado que Fibronectina, una glicoproteína extracelular de adhesión, aparece en la superficie de las células epiteliales lesionadas, permitiendo a las mismas la migración sobre la matriz provisional que genera. Esto produce la sobre-expresión de Integrinas, y el sistema Fibronectina-Integrina juega un papel central en la migración.

En el caso de uPA (Uroquinasa Activadora de Plasminógeno), se ha demostrado la presencia de esta proteína de matriz extracelular en el margen del epitelio lesionado, lo que induce la migración del mismo (Watanabe et al., 2003).

Nuestros resultados para estas dos proteínas están en consonancia con lo descrito por estos autores. En el caso de las lesiones control, comenzamos sin señal para ambas proteínas puesto que nada más realizar la lesión el mecanismo de síntesis – degradación de matriz extracelular no está activado puesto que las células están al 100 % de confluencia. Transcurridas 6 horas de la lesión, observamos como tenemos señal para las dos proteínas posiblemente debido a que la maquinaria está empezando a funcionar y estamos sintetizando y degradando matriz extracelular a la vez, siendo el proceso de síntesis algo mayoritario al de degradación, lo que nos indicaría un anclaje de las células y un menor movimiento de las mismas. Sin embargo, a las 10 horas de la lesión, observamos como solo encontramos señal para uPA, lo que significa que estamos degradando la matriz extracelular facilitando por tanto el movimiento celular. De nuevo a las 24 horas tenemos señal para ambas proteínas porque el mecanismo de síntesis – degradación está trabajando a la vez. Cuando tratamos las lesiones con Ap₄A, observamos como nada más realizar la lesión comenzamos sin señal para ambas proteínas puesto el mecanismo de síntesis – degradación de matriz extracelular no está activado puesto que las células están al 100 % de confluencia. Sin embargo a partir de las 6 horas, se produce la activación de ambas proteínas, siendo mayoritaria la activación de uPA, lo que nos indicaría que el mecanismo mayoritario sería el de

degradación de la matriz extracelular para favorecer el movimiento de las células y así cubrir más rápidamente al área lesionada.

¿Y por qué se favorece la migración epitelial tras el tratamiento de las lesiones con Ap₄A? Se ha visto que Fibronectina produce la fosforilación, y por tanto la activación, de FAK (Quinasa de Adhesión Focal) y de Paxilina, proteínas que producen cambios característicos en la forma celular, en la reorganización del citoesqueleto de actina y en las adhesiones focales que son moduladas por proteínas de la familia de Rho, aunque también se ha visto la activación de las otras dos familias, Cdc42 y Rac1 (Kimura et al., 2006 y 2007), lo que resulta en el incremento de la migración celular.

Cuando estudiamos la activación de Faloidina, proteína que se une a los filamentos actina formados o en formación e impide su despolimerización, y de Vinculina, proteína de membrana-citoesqueleto localizada en las placas de adhesión focal que ancla las moléculas de integrina al citoesqueleto de actina y cuya pérdida conlleva a la no formación de las adhesiones focales junto con la inhibición de la síntesis de los lamelipodios y a una mala polimerización de actina, observamos como el marcaje para Faloidina tanto en las lesiones control como en las tratadas con Ap₄A, nos está demostrando la polimerización de actina, es decir, la activación del citoesqueleto para permitir el movimiento celular. La variación en los niveles de la señal para esta proteína nos refleja la distinta síntesis de los filamentos de actina reflejo de la capacidad de movimiento de la célula. Además, en el caso de las lesiones tratadas con el dinucleótido, los niveles más o menos constantes de señal (salvo a las 6 horas que desciende un poco) nos indicaría la activación constante del citoesqueleto de actina para permitir el movimiento celular. Lo mismo ocurre con la señal para Vinculina: esta proteína está en grandes cantidades en el momento de realizar la lesión debido a la gran cantidad de contactos focales que hay entre las células ya que estas están en confluencia, disminuyendo la señal con el paso de las horas, lo que nos indica un menor número de contactos focales. En el caso de las lesiones control, la disminución de la señal para Vinculina refleja la inhibición de la síntesis de lamelipodios y por la tanto la velocidad de migración celular es menor, mientras que en el caso de las lesiones tratadas con Ap₄A, la activación más o menos constante de Vinculina: lo que nos

indicaría una síntesis de continuo de lamelipodios que reflejan la alta capacidad de migración de las células.

Nuestra localización de estas proteínas en el borde de la lesión adyacente a la membrana es consistente con la localización de estas proteínas por otros autores (Zieske et al., 1989). Durante el proceso de migración, Vinculina se localiza a la largo de de la membrana entre las células y difunde por las mismas, lo que representa el reservorio de esta proteína necesario para la formación de las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular (Zieske et al., 1989).

5.5.- ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL PROCESO DE CICATRIZACIÓN CORNEAL VÍA Ap_4A / $P2Y_2$.

La etapa de proliferación o de división celular, última etapa del proceso de cicatrización corneal, es un proceso clave en la regeneración final de la cornea, ya que es fundamental que se recupere el espesor corneal normal tras una lesión para así evitar daños secundarios y una correcta transmisión de la señal visual a la retina. Por ello es fundamental el intentar activar la proliferación de las células madre limbales hacia la zona lesionada.

Debido a la importancia de la etapa, ha sido ampliamente estudiada y, en el caso de la activación de lesiones corneales por EGF, se conocen las señales intracelulares que se desencadenan (Lu et al., 2001).

La acción de los di- y mononucleótidos de adenina en el proceso de proliferación celular comenzó a estudiarse a mediados de los años 80s, cuando se observó que Ap_4A era capaz de estimular la síntesis de ADN (Bambara et al., 1985), intentando elucidar posteriormente los receptores purinérgicos implicados en la activación de la proliferación en diversos sistemas celulares (Jankowski et al., 2001; Schäfer et al., 2003; Muscella et al., 2004; White et al., 2005).

Nuestros resultados de migración con Ap_4A y Ap_3A nos han llevado a la hipótesis de los receptores $P2Y_2$ / $P2Y_6$ como “interruptores” para finalizar la fase de

migración y comenzar la fase de proliferación celular (ver apartado 5.1 de esta discusión). Es por ello que decidimos completar este trabajo de investigación intentando elucidar esta hipótesis.

Como podemos apreciar en nuestros resultados, cuando incubamos las células del epitelio corneal con Ap₄A o Ap₃A *in vitro*, conseguimos una tasa de proliferación mayor que en el estado control y similar con ambos dinucleótidos tanto a las 24 como a las 36 horas del inicio del tratamiento con estos agonistas. Además, los ensayos con los diversos inhibidores de las rutas intracelulares nos definen la participación de PLC / PKC, ERK1/2 y RhoA / ROCK-I en el incremento de proliferación mediado por Ap₄A, y la participación de las cascadas de ERK1/2 y p38 en la proliferación desencadenada por Ap₃A.

Estos resultados coinciden con lo descrito por Bobbert et al., (2008) para células del músculo liso vascular (VSMCs), donde observó como Ap₃A y Ap₄A (pero no Ap₅A y Ap₆A) inducían un incremento en la síntesis de ADN, a la vez que se producía un aumento en la fosforilación de ERK1/2, efecto que era abolido con el empleo de inhibidores para PLC / PKC y para receptores Tirosina Quinasa. Además, la participación de la ruta de RhoA / ROCK-I ha sido estudiada por otros autores (Chen et al., 2008).

Cuando tratamos las células con ambos dinucleótidos, se produce un incremento en la proliferación con respecto al aumento producido por cada uno de los dinucleótidos por separado. El máximo de proliferación se consigue cuando en presencia de Ap₄A 100 µM tratamos las células con 0.1 µM de Ap₃A, tasa de proliferación que es equivalente a la obtenida cuando en presencia de Ap₃A 100 µM tratamos las células con 10 µM de Ap₄A. Es decir, que la capacidad de Ap₃A para potenciar la proliferación *in vitro* es mayor que la que tiene Ap₄A, lo que parece indicar que *in vitro* es Ap₃A el implicado principalmente en este proceso celular.

En función a estos resultados *in vitro*, podemos definir que la activación de Ap₄A / P2Y₂ tiene un papel importante en el inicio de la proliferación del epitelio

corneal lesionado, pero el incremento que se produce en este proceso viene definido por la activación de receptor P2Y₆, como ya hemos mencionado.

Este efecto potenciado en la proliferación y la activación del receptor P2Y₆ está en consonancia con el trabajo realizado por Muscella et al., en 2004, donde observan como UDP produce un aumento en la proliferación que es dosis y tiempo dependiente, y que la acción coordinada de UDP y ATP γ S produce una proliferación más potente, lo que implicaría la activación preferente de un receptor P2Y₆ iniciando rutas intracelulares diferentes a las que activaría el receptor P2Y₂.

Para comprobar si son ciertas las conclusiones obtenidas después del trabajo *in vitro*, desarrollamos un estudio *in vivo*, Para demostrar si Ap₄A y su receptor purinérgico P2Y₂ tienen un papel clave en la proliferación, hemos estudiado el papel de ambos en lesiones en corneas de animales *in vivo*. Este estudio de proliferación se lleva a cabo mediante el estudio de expresión de la Ciclina CCNE1 y la Quinasa asociada CDK2, que van a formar un complejo que desencadena el paso G₁/S en el ciclo celular.

Los resultados *in vivo* nos demuestran que, en comparación con la expresión de CCNE1 y CDK2 en las lesiones control, la expresión del ARNm para CCNE1 aumenta en presencia de Ap₄A a las 24 horas de la lesión, descendiendo con el pre-tratamiento con el siRNA para P2Y₂, lo que nos indica la participación de este sistema de agonista / receptor en el inicio del proceso proliferativo. Sin embargo, a las 36 horas del inicio de la lesión, observamos como el pre-tratamiento con el siRNA para el receptor P2Y₂ produce un gran incremento en la expresión de CCNE1. Esto puede ser debido a que como a las 36 horas el efecto silenciador del siRNA ha finalizado, estamos potenciando la activación del receptor. Sin embargo, este gran incremento en la expresión de ARNm para CCNE1 a las 36 horas, lo que es equivalente a un incremento en la proliferación, por encima de los valores de expresión para el dinucleótido solo, también nos indica la participación de otro subtipo de receptor purinérgico, que en función de los estudios farmacológicos de afinidad de este dinucleótido por los receptores purinérgicos, podrían ser los receptores P2Y₁ y la mayoría de los receptores P2X (Guzman-Aranguez et al., 2007), así como el receptor P2Y₄ presente en el epitelio corneal.

En cuanto a la expresión de CDK2, en todos los casos encontramos una disminución de la expresión en relación a la expresión en una lesión control, revertiendo a valores similares al control en presencia del siRNA para P2Y₂, lo que nos indicaría que el tratamiento con Ap₄A en presencia o en ausencia del pre-tratamiento con el siRNA no produciría una activación en la expresión del ARNm para CDK2. Si CCNE1 forma un complejo con CDK2 para el paso G₁/S, ¿Cómo encontramos un aumento en la expresión del ARNm para CCNE1 y no para CDK2? Es posible que al encontrar un aumento de CCNE1 estemos estudiando una etapa preparatoria, es decir, el incremento de expresión del ARNm para CCNE1 debe traducirse en un aumento de la proteína (que puede retrasarse hasta 24 horas según la proteína) y es esta proteína la que regula a CDK2.

Los resultados de proliferación activados por Ap₄A *in vitro* e *in vivo* parecen entonces opuestos, ya que *in vitro*, Ap₄A produce un incremento en la proliferación tanto a las 24 como a las 36 horas. Sin embargo, no tenemos que olvidar que en los ensayos realizados *in vitro* todas las células están arrestadas en la misma fase del ciclo celular (Go) mediante la incubación de las mismas en medio sin suero, y por tanto todas entran en el ciclo celular a la vez y en la misma etapa, mientras que *in vivo* el conjunto de las células epiteliales son asincrónicas, estando cada una en una etapa del ciclo celular característica y nosotros solo estamos estudiando el paso G₁/S. Además, aunque se ha visto que la concentración de Ap₄A en la lágrima de conejo está aumentada en el periodo de tiempo que comprende esta fase de migración celular, y se conoce que los niveles de Ap₄A oscilan a lo largo del ciclo celular y de la proliferación en diversos sistemas celulares (Rapaport y Zamecnik, 1976; Weinmann-Dorsch et al., 1984; Andersson y Lewan, 1988; Bobbert et al., 2008), no está clara la participación de este dinucleótido como cebador en la proliferación en los sistemas *in vivo* (Bambara et al., 1985).

Todo esto nos indica que el receptor P2Y₂ está implicado en la proliferación *in vivo*, principalmente en el inicio de la misma, es decir, a las 24 horas posteriores a la lesión cuando la migración celular está finalizando, y por tanto, no sería el receptor fundamental en el proceso, porque cuando lo silenciamos, la expresión del ARNm para

CCNE1 aumenta, lo que nos indica la actuación de otro receptor, que en nuestro caso sería el receptor P2Y₆.

Esta activación del receptor P2Y₆ se ha comprobado realizando estudios de expresión de CCNE1 y CDK2 tratando lesiones *in vivo* con Ap₃A en presencia o en ausencia del siRNA para P2Y₂. El tratamiento de las lesiones corneales con Ap₃A produce un incremento en los valores de ARNm para CCNE1 Y CDK2 tanto a las 24 como a las 36 horas posteriores a la lesión, siendo este incremento mayor a las 36 horas. El pre-tratamiento con el siRNA para el receptor P2Y₂ produce un descenso en la expresión de CCNE1 a las 24 y a las 36 horas, permaneciendo los niveles para CDK2 constantes a las 24 horas y descendiendo a las 36. Estos resultados implican una mayor capacidad proliferativa de Ap₃A cuando lo comparamos con Ap₄A, indicando el silenciamiento del receptor P2Y₂ que a las 24 horas es este receptor fundamental para comenzar el proceso proliferativo. El descenso en la proliferación causada por Ap₃A en presencia del siRNA a las 36 horas, periodo de tiempo en el cual el siRNA ha dejado de ejercer su efecto, podría reflejar que la expresión del receptor P2Y₂ está impidiendo que otro receptor, en nuestro caso P2Y₆, ejerza su acción en la proliferación

La hipótesis de actuación de P2Y₆ viene abalada por lo descrito por Huo et al., en 2002, donde las células VSMCs transfectadas con el receptor P2Y₆ exhibían una tasa alta de proliferación debida a UDP, y que cuando se transfecta con P2Y₂ y P2Y₄, la proliferación de UDP disminuía. En nuestro caso, el silenciamiento del receptor P2Y₂ ejercería una acción similar, es decir, al no expresarlo, facilitamos la actuación del receptor P2Y₆. Además, como en la lágrima *in vivo* encontramos Ap₅A, este activaría el receptor P2Y₆ y potenciaría la acción de este en la proliferación.

Estos resultados parecen indicar que tanto Ap₄A como Ap₃A son capaces de activar la proliferación celular, siendo Ap₃A el más potente, y que cuando tenemos el receptor P2Y₂ silenciado (24 horas post-lesión, inicio de la etapa de proliferación), la tasa de proliferación debida a ambos dinucleótidos está disminuida, lo que revela que el receptor P2Y₂ es importante en este momento de iniciación de proceso proliferativo. Sin embargo, a las 36 horas de la generación de la lesión, cuando ya no tenemos el receptor silenciado porque el efecto del siRNA ha finalizado, observamos un aumento en los

valores de CCNE1 y CDK2, que relacionaríamos con un incremento en la proliferación celular, y debido probablemente a la acción coordinada de los receptores P2Y₂ y P2Y₆.

Sin embargo, no podemos descartar la participación de otro receptor, por ejemplo el receptor purinérgico P2Y₄ (Coutinho-Silva et al., 2005), o como ya hemos mencionado, los receptores P2Y₁ (Bobbert et al., 2008) e incluso los diferentes subtipos de receptores P2X, entre los que destacamos al receptor P2X₇, receptor implicado en la proliferación en el epitelio intestinal humano (Coutinho-Silva et al., 2005).

Por tanto podemos concluir que los niveles elevados de Ap₄A en la lágrima que encontramos a lo largo de las etapas de migración y proliferación desencadenarían una activación de la ruta de ERK1/2 temprana que estaría implicada en la iniciación de la proliferación, pero que no la desencadenaría en fases tardías (Muscella et al., 2004), sino que sería la activación del receptor P2Y₆ vía Ap₃A junto a la activación de la ruta de p38 la que guiaría el proceso global de la proliferación.

Conclusiones

6.- CONCLUSIONES.

En esta tesis se ha estudiado el papel que los dinucleótidos de adenina tienen en el proceso de re-epitelización corneal cuando reproduce una lesión en el mismo. De la presente investigación se desprenden las siguientes conclusiones:

1.- Implicación de los mono y dinucleótidos en la fase de migración celular del proceso de reepitelización corneal:

1) Ap_4A , ATP y UTP poseen la capacidad de acelerar la migración celular produciendo un aumento en la velocidad estimada de migración (VEM) y un descenso en el tiempo estimado de reepitelización (TER) cuando lo comparamos con las lesiones control.

2) Ap_3A , Ap_5A y UDP producen el efecto opuesto, es decir, tienen la capacidad de frenar la migración, originando un descenso en la VEM con el consecuente aumento en el TER cuando lo comparamos con las lesiones control.

3) Up_4U y ADP no alteran la migración celular si lo comparamos con la migración en las lesiones control.

4) Las acciones de los dinucleótidos en el proceso de migración son debidas al efecto de los dinucleótidos de adenina y no a sus productos de degradación.

2.- Estudio de los receptores P2Y implicados en las modificaciones del ratio de migración causadas por los dinucleótidos de adenina:

1) Los ensayos farmacológicos nos sugieren, en base al perfil farmacológico, la existencia de dos receptores purinérgicos diferentes en las células del epitelio corneal implicados en la migración celular: un receptor $P2Y_2$ implicado en la aceleración de la migración, y un receptor $P2Y_6$ que sería el responsable del retardo de la misma.

2) Los ensayos de silenciamiento del receptor P2Y₂, confirman la participación de este receptor en la aceleración de la migración del epitelio corneal activado por el dinucleótido Ap₄A.

3.- Estudio de los segundos mensajeros acoplados a los receptores P2Y en el proceso de migración celular:

1) Ap₄A vía la activación del receptor P2Y₂, es capaz de activar tanto la cascada de las MAPK como la cascada de RhoA / ROCK-I, tras la activación de las proteínas PLC / PKC, y ambas son necesarias para el proceso de migración, estando la vía de ERK1/2 también involucrada en procesos a largo plazo.

2) Ap₃A se va a unir preferentemente al receptor P2Y₆, y va a activar, por un mecanismo que no conocemos, las rutas de ERK1/2 y p38, siendo la fosforilación de p38 la señal mayoritaria y la responsable de transmitir la señal de regulación negativa de la migración al núcleo

4.- Estudio de la implicación en la etapa de proliferación celular

1) Los niveles elevados de Ap₄A en la lágrima que encontramos a lo largo de las etapas de migración y proliferación desencadenarían una activación de la ruta de ERK1/2 temprana que estaría implicada en la iniciación de la proliferación.

2) Es la activación del receptor P2Y₆ vía Ap₃A junto a la activación de la ruta de p38 la que guiaría el proceso global de la proliferación.

Referencias

7.- REFERENCIAS.

Aguilar JS, Reyes R, Asensio AC, Oaknin S, Rotllan P, Miledi R. Ectoenzymatic breakdown of diadenosine polyphosphates by *Xenopus laevis* oocytes. *Eur J Biochem.* 2001;268:1289–1297.

Ahmad S, Ahmad A, Ghosh M, Leslie CC, White CW. Extracellular ATP-mediated signaling for survival in hyperoxia-induced oxidative stress. *J Biol Chem.* 2004;279:16317-16325.

Alvarado-Castillo C, Lozano-Zarain P, Mateo J, Harden TK, Boyer JL. A fusion protein of the human P2Y1 receptor and NTPDase1 exhibits functional activities of the native receptor and ectoenzyme and reduced signaling responses to endogenously released nucleotides. *Mol Pharmacol.* 2002;62:521–528.

Alvarado-Castillo C, Harden TK, Boyer JL. Regulation of P2Y1 receptor-mediated signaling by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase isozymes NTPDase1 and NTPDase2. *Mol Pharmacol.* 2005;67:114–122.

Amadio M, Battaini F, Pascale A. The different facets of protein kinases C: old and new players in neuronal signal transduction pathways. *Pharmacol Res.* 2006;54(5):317-325.

Andersson M, Lewan L. Early increase in diadenosine tetraphosphate in regenerating rat liver. *Exp Cell Res.* 1988;175(2):414-418.

Ando Y, Lazarus GS, Jensen PJ. Activation of protein kinase C inhibits human keratinocyte migration. *J Cell Physiol.* 1993;156(3):487-496.

Arthur DB, Akassoglou K, Insel PA. P2Y2 receptor activates nerve growth factor/TrkA signaling to enhance neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:19138-19143.

Arthur DB, Georgi S, Akassoglou K, Insel PA. Inhibition of apoptosis by P2Y2 receptor activation: novel pathways for neuronal survival. *J Neurosci.* 2006;26(14):3798-3804.

Ashley N, Harris D, Poulton J. Detection of mitochondrial DNA depletion in living human cells using PicoGreen staining. *Exp Cell Res.* 2005;303(2):432-446.

Aspenström P, Fransson A, Saras J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J.* 2004;377:327–337.

Baker OJ, Camden JM, Rome DE, Seye CI, Weisman GA. P2Y2 nucleotide receptor activation up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 [corrected] expression and enhances lymphocyte adherence to a human submandibular gland cell line. *Mol Immunol.* 2008;45(1):65-75.

Balendran A, Hare GR, Kieloch A, Williams MR, Alessi DR. Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms. *FEBS Lett.* 2000;484(3):217-223.

Ballerini P, Di Iorio P, Ciccarelli R, Nargi E, D'Alimonte I, Traversa U, Rathbone MP, Caciagli F. Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release. *Neuroreport* 2002;13:1789–1792.

Bambara RA, Crute JJ, Wahl AF. Is Ap4A an activator of eukaryotic DNA replication? *Cancer Invest.* 1985;3(5):473-479.

Bard JB, Hay ED. The behavior of fibroblasts from the developing avian cornea. Morphology and movement in situ and in vitro. *J Cell Biol.* 1975;67(2PT.1):400-418.

Bard JB, Bansal MK, Ross AS. The extracellular matrix of the developing cornea: diversity, deposition and function. *Development* 1988;103 Suppl:195-205.

Bazan HE, Varner L. A mitogen-activated protein kinase (MAP-kinase) cascade is stimulated by platelet activating factor (PAF) in corneal epithelium. *Curr Eye Res.* 1997;16(4):372-379.

Behlke MA. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol. Ther.* 2006;13:644-670.

Belmonte C, Acosta MC, Gallar J. Neural basis of sensation in intact and injured corneas. *Exp Eye Res.* 2004;78:513–525.

Belous A, Wakata A, Knox CD, Nicoud IB, Pierce J, Anderson CD, Pinson CW, Chari RS. Mitochondrial P2Y-Like receptors link cytosolic adenosine nucleotides to mitochondrial calcium uptake. *J Cell Biochem* 2004;92:1062– 1073.

Benham CD. ATP-gated channels in vascular smooth muscle cells. *Ann NY Acad Sci.* 1990;603:275–285.

Ben-Levy R, Leighton IA, Doza YN, Attwood P, Morrice N, Marshall CJ, Cohen P. Identification of novel phosphorylation sites required for activation of MAPKAP kinase-2. *EMBO J.* 1995;14:5920–5930.

Bessard A, Coutant A, Rescan C, Ezan F, Fremin C, Courselaud B, Ilyin G, Baffet G. An MLCK-dependent window in late G1 controls S phase entry of proliferating rodent hepatocytes via ERK-p70S6K pathway. *Hepatology* 2006;44(1):152-163.

Bobbert P, Schlüter H, Schultheiss HP, Reusch HP. Diadenosine polyphosphates Ap3A and Ap4A, but not Ap5A or Ap6A, induce proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(10):1966-1973.

Boeynaems JM, Communi D, Gonzalez NS, Robaye B. Overview of the P2 receptors. *Semin Thromb Hemost.* 2005a;31(2):139-149.

Boeynaems JM, van Giezen H, Savi P, Herbert JM. P2Y receptor antagonists in thrombosis. *Curr Opin Investig Drugs.* 2005b;6(3):275-282.

- Bogdanov YD, Wildman SS, Clements MP, King BF, Burnstock G. Molecular cloning and characterization of rat P2Y4 nucleotide receptor. *Br J Pharmacol.* 1998;124:428–430.
- Borgland SL. Acute opioid receptor desensitization and tolerance: is there a link? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001;28(3):147-154.
- Boyd IA, Forrester T. The release of adenosine triphosphate from frog skeletal muscle in vitro. *J Physiol.* 1968;199(1):115-135.
- Boyer JL, Romero-Avila T, Schachter JB, Harden TK. Identification of competitive antagonists of the P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol.* 1996;50:1323– 1329.
- Brancho D, Tanaka N, Jaeschke A, Ventura JJ, Kelkar N, Tanaka Y, Kyuuma M, Takeshita T, Flavell RA, Davis RJ. Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev.* 2003;17:1969–1978.
- Brandle U, Guenther E, Irrle C, Wheeler-Schilling TH. Gene expression of the P2X receptors in the rat retina. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998a;59:269–272.
- Brandle U, Kohler K, Wheeler-Schilling TH. Expression of the P2X7-receptor subunit in neurons of the rat retina. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998b;62:106–109.
- Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J.* 1999;18(3):664-674.
- Buell G, Collo G, Rassendren F. P2X receptors: an emerging channel family. *Eur J Neurosci.* 1996;8:2221–2228.
- Bumcrot D, Manoharan M, Koteliansky V, Sah DW. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* 2006;2(12):711-719.
- Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A multidisciplinary Approach*, ed. RW Straub and L Bollis, 1978. pp. 107-118. New York: Raven Press.
- Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?. *Gen Pharmacol.* 1985;16(5):433-440.
- Burnstock G. P2 purinoceptors: historical perspective and classification. *Ciba Found. Symp* 1996;198:1–28.
- Burnstock G, Williams M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;295(3):86286-9.
- Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol.* 2004;240:31-304.

Burnstock G. Purinergic signalling-an overview. *Novartis Found Symp.* 2006;276:26-48.

Burrige K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004;116:167–179.

Campochiaro PA. Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. *Gene Ther* 2006;13(6):559-62.

Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith E. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 1997;90(5):859-869.

Carrington M, Carnall N, Crow MS, Gaud A, Redpath MB, Wasunna CL, Webb H. The properties and function of the glycosylphosphatidylinositol-phospholipase C in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1998;91(1):153-164.

Castro E, Torres M, Miras-Portugal MT, Gonzalez MP. Effect of diadenosine polyphosphates on catecholamine secretion from isolated chromaffin cells. *Br J Pharmacol.* 1990;100:360–364.

Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, Zhu Y, McLaughlin MM, Murdock P, McMillan L, Trill J, Swift A, Aiyar N, Taylor P, Vawter L, Naheed S, Szekeres P, Hervieu G, Scott C, Watson JM, Murphy AJ, Duzic E, Klein C, Bergsma DJ, Wilson S, Livi GP. A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem.* 2000;275:10767–10771.

Chandrasekher G, Kakazu AH, Bazan HE. HGF- and KGF-induced activation of PI-3K/p70 s6 kinase pathway in corneal epithelial cells: its relevance in wound healing. *Exp Eye Res.* 2001 Aug;73(2):191-202.

Charlton ME, Williams AS, Fogliano M, Sweetnam PM, Duman RS. The isolation and characterization of a novel G protein-coupled receptor regulated by immunologic challenge. *Brain Res.* 1997;764:141–148.

Chen J, Guerriero E, Lathrop K, SundarRaj N. Rho/ROCK signaling in regulation of corneal epithelial cell cycle progression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(1):175-183.

Chen S, Sears M. A low conductance chloride channel in the basolateral membranes of the non-pigmented ciliary epithelium of the rabbit eye. *Curr Eye Res.* 1997;16:710–718.

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH. MAP kinases. *Chem Rev.* 2001;101:2449–2476.

Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal.* 2003;15:463–469.

Cocco L, Maraldi NM, Capitani S, Martelli AM, Manzoli FA. Nuclear localization and signalling activity of inositol lipids. *Ital J Anat Embryol.* 2001;106(2 Suppl 1):31-43.

Collison DJ, Duncan G. Regional differences in functional receptor distribution and calcium mobilization in the intact human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:2355–2363.

Communi D, Motte S, Boeynaems JM, Piroton S. Pharmacological characterization of the human P2Y4 receptor. *Eur J Pharmacol.* 1996a;317:383–389.

Communi D, Parmentier M, Boeynaems JM. Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996b;222(2):303-308.

Communi D, Boeynaems JM. Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides. *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18:83–86.

Communi D, Robaye B, Boeynaems JM. Pharmacological characterization of the human P2Y11 receptor. *Br J Pharmacol.* 1999;128:1199–1206.

Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, Boeynaems JM. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem.* 2001a;276:41479–41485.

Communi D, Suarez-Huerta N, Dussosoy D, Savi P, Boeynaems JM. Cotranscription and intergenic splicing of human P2Y11 and SSF1 genes. *J Biol Chem.* 2001b;276:16561–16566.

Corbalán-García S, Gómez-Fernández JC. Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761(7):633-654.

Coutinho-Silva R, Stahl L, Cheung KK, de Campos NE, de Oliveira Souza C, Ojcius DM, Burnstock G. P2X and P2Y purinergic receptors on human intestinal epithelial carcinoma cells: effects of extracellular nucleotides on apoptosis and cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288(5):G1024-G1035.

Cowlen MS, Zhang VZ, Warnock L, Moyer CF, Peterson WM, Yerxa BR. Localization of ocular P2Y2 receptor gene expression by in situ hybridization. *Exp Eye Res.* 2003;77:77–84.

Cressman VL, Lazarowski E, Homolya L, Boucher RC, Koller BH, Grubb BR. Effect of loss of P2Y2 receptor gene expression on nucleotide regulation of murine epithelial Cl⁻ transport. *J Biol Chem.* 1999;274:26461–26468.

Crooke A, Guzmán-Arangué A, Peral A, Abdurrahman MK, Pintor J. Nucleotides in ocular secretions: their role in ocular physiology. *Pharmacol Ther.* 2008;119(1):55-73.

Crosson CE, Klyce SD, Beuerman RW. Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27(4):464-473.

Crosson CE, Gray T. Characterization of ocular hypertension induced by adenosine agonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:1833–1839.

Crosson CE, Gray T. Response to prejunctional adenosine receptors is dependent on stimulus frequency. *Curr Eye Res.* 1997;16:359–364.

Crosson CE. Intraocular pressure responses to the adenosine agonist cyclohexyladenosine: evidence for a dual mechanism of action. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:1837–1840.

Crosson CE, Yates PW, Bhat AN, Mukhin YV, Husain S. Evidence for multiple P2Y receptors in trabecular meshwork cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309:484–489.

D'Alimonte I, Ciccarelli R, Di Iorio P, Nargi E, Buccella S, Giuliani P, Rathbone MP, Jiang S, Caciagli F, Ballerini P. Activation of P2X(7) receptors stimulates the expression of P2Y(2) receptor mRNA in astrocytes cultured from rat brain. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2007;20(2):301-316.

Daly JW, Butts-Lamb P, Padgett W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: Interactions with caffeine and related methylxanthines. *Cell Mol Neurobiol.* 1983;3:69-80.

Delicado EG, Jimenez AI, Carrasquero LMG, Castro E, Miras-Portugal MT. Cross-talk among epidermal growth factor, Ap(5)A, and nucleotide receptors causing enhanced ATP Ca(2+) signaling involves extracellular kinase activation in cerebellar astrocytes. *J Neurosci Res.* 2005;81:789-796.

Desai LP, Aryal AM, Ceacareanu B, Hassid A, Waters CM. RhoA and Rac1 are both required for efficient wound closure of airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287(6):L1134-L1144.

DerMardirossian C, Bokoch GM. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 2005;15:356–363.

Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. Inactivation of the human P2Y12 receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 2003;101:3908–3914.

Divecha N, Clarke JH, Roefs M, Halstead JR, D'Santos C. Nuclear inositides: inconsistent consistencies. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(3):379-393.

Dore-Savard L, Roussy G, Dansereau MA, Collingwood MA, Lennox KA, Rose SD, Beaudet N, Behlke MA, Sarret P. Central delivery of Dicer-substrate siRNA: a direct application for pain research. *Mol Ther.* 2008;16:1331-1339.

Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest.* 2004;113:340–345.

- Dovas A, Couchman JR. RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J.* 2005;390:1–9.
- Dranoff JA, O'Neill AF, Franco AM, Cai SY, Connolly GC, Ballatori N, Boyer JL, Nathanson MH. A primitive ATP receptor from the little skate *Raja erinacea*. *J Biol Chem.* 2000;275:30701–30706.
- Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 1929;68(3):213–237.
- D'Santos CS, Clarke JH, Divecha N. Phospholipid signalling in the nucleus. Een DAG uit het leven van de inositide signalering in de nucleus. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1436(1-2):201–232.
- Ecke D, Hanck T, Tulapurkar ME, Schafer R, Kassack M, Stricker R, Reiser G. Hetero-oligomerization of the P2Y11 receptor with the P2Y1 receptor controls the internalization and ligand selectivity of the P2Y11 receptor. *Biochem J.* 2008;409:107–116.
- Edwards FA, Gibb AJ. ATP-a fast neurotransmitter. *FEBS Lett.* 1993;325(1-2):86–89.
- Egea G, Lázaro-Diéguéz F, Vilella M. Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:168–178.
- Eldred JA, Sanderson J, Wormstone M, Reddan JR, Duncan G. Stress-induced ATP release from and growth modulation of human lens and retinal pigment epithelial cells. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:1213–1215.
- Ellis S, Mellor H. The novel Rho-family GTPase *rif* regulates coordinated actin-based membrane rearrangements. *Curr Biol.* 2000;10:1387–1390.
- Emmelin N, Feldberg W. Systemic effects of adenosine triphosphate. *Br J Pharmacol Chemother.* 1948;3(4):273–284.
- Enslin H, Brancho DM, Davis RJ. Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J.* 2000;19:1301–1311.
- Erb L, Lustig KD, Sullivan DM, Turner JT, Weisman GA. Functional expression and photoaffinity labeling of a cloned P2U purinergic receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10449–10453.
- Erlinge D, Hou M, Webb TE, Barnard EA, Moller S. Phenotype changes of the vascular smooth muscle cell regulate P2 receptor expression as measured by quantitative RT-PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;248:864–870.
- Evans RJ. The molecular biology of P2X receptors. *J Autonom Nerv Sys.* 1996;16:309–310.

- Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, Koller BH. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med.* 1999;5:1199–1202.
- Farahbakhsh NA, Cilluffo MC. P2 purinergic receptor-coupled signaling in the rabbit ciliary body epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:2317–2325.
- Flodgaard H, Klenow H. Abundant amounts of diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets. *Biochem J.* 1982;208(3):737-742.
- Folkow B. The vasodilator action of adenosine triphosphate. *Acta Physiol Scand.* 1949;17(4):311-316.
- Forrester JV, Dick AD, McMenamin PG, Roberts F. The Eye: Basic Sciences in Practice. In Ed. Saunders 2nd ed 2002, pp 15-20.
- Fries JE, Wheeler-Schilling TH, Guenther E, Kohler K. Expression of P2Y1, P2Y2, P2Y4, and P2Y6 receptor subtypes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004a;45:3410–3417.
- Fries JE, Wheeler-Schilling TH, Kohler K, Guenther E. Distribution of metabotropic P2Y receptors in the rat retina: a singlecell RT-PCR study. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004b;130:1–6.
- Fujikawa LS, Foster CS, Harrist TJ, Lanigan JM, Colvin RB. Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab Invest.* 1981;45:120–129.
- Fullard RJ, Snyder C. Protein levels in nonstimulated and stimulated tears of normal human subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31 (6):1119–1126.
- Gaddum JH, Holtz P. The localization of the action of drugs on the pulmonary vessels of dogs and cats. *J Physiol.* 1933;77(2):139-158.
- Gallar J, Pozo MA, Rebollo I, Belmonte C. Effects of capsaicin on corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990;31(10):1968-1974.
- Gao Z, Chen T, Weber MJ, Linden J. A2B adenosine and P2Y2 receptors stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. cross-talk between cyclic AMP and protein kinase c pathways. *J Biol Chem.* 1999;274(9):5972-5980.
- Gelman IH. The role of SSeCKS/gravin/AKAP12 scaffolding proteins in the spatiotemporal control of signaling pathways in oncogenesis and development. *Front Biosci.* 2002;7:d1782-d1797.
- Gillespie JH. The biological significance of the linkages in adenosine triphosphoric acid. *J Physiol.* 1934;80(4):345-359.

Gomes P, Srinivas SP, Vereecke J, Himpens B. Gap junctional intercellular communication in bovine corneal endothelial cells. *Exp Eye Res.* 2006;83:1225–1237.

Gonzalez MV, Jimenez B, Berciano MT, Gonzalez-Sancho JM, Caelles C, Lafarga M, Munoz AJ. Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the Activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution. *Cell Biol.* 2000;150(5):1199-1208.

Grbic DM, Degagné E, Langlois C, Dupuis AA, Gendron FP. Intestinal inflammation increases the expression of the P2Y6 receptor on epithelial cells and the release of CXC chemokine ligand 8 by UDP. *J Immunol.* 2008;180(4):2659-2668.

Griffith OH, Ryan M. Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. *Biochim Biophys Acta* 1999;1441(2-3):237-254.

Gundorova RA, Brikman IV, Ibadova SI, Issaeva RT. Stimulation of penetrating corneal wound healing by exogenous fibronectin. *Eur J Ophthalmol.* 1994;4(4):202-210.

Guo D, von Kügelgen I, Moro S, Kim YC, Jacobson KA. Evidence for the recognition of non-nucleotide antagonists within the transmembrane domains of the human P2Y1 receptor. *Drug Dev Res.* 2002;57:173–181.

Guyot A, Hanrahan JW. ATP release from human airway epithelial cells studied using a capillary cell culture system. *J Physiol.* 2002;545:199–206.

Guzmán-Aranguez A, Crooke A, Peral A, Hoyle CHV, Pintor J. Dinucleoside polyphosphates in the eye: from physiology to therapeutics. *Prog Retin Eye Res.* 2007;26(6):674-687.

Haik BG, Zimny ML. Scanning electron microscopy of corneal wound healing in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1977;16(9):787-796.

Hallberg B, Rayter SI, Downward J. Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *J Biol Chem.* 1994;269:3913–3916.

Harvey SA, Anderson SC, SundarRaj N. Downstream effects of ROCK signaling in cultured human corneal stromal cells: microarray analysis of gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45(7):2168-2176

Hashimoto K, Kumakura S, Tanemura I. Mode of action of adenine, uridine and cytidine nucleotides and 2,6-bis(diethanolamino)-4,8-dipiperidino-pyrimidino(5,4-d)pyrimidine on the coronary, renal and femoral arteries. *Arzneimittelforschung.* 1964;14:1252-1254.

Hayashi K, Sueishi K, Tanaka K, Inomata H. Immunohistochemical evidence of the origin of human corneal endothelial cells and keratocytes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1986;224(5):452-456.

Higashida H, Hoshi N, Zhang JS, Yokoyama S, Hashii M, Jin D, Noda M, Robbins J. Protein kinase C bound with A-kinase anchoring protein is involved in muscarinic receptor-activated modulation of M-type KCNQ potassium channels. *Neurosci Res.* 2005;51(3):231-234.

Higgs HN. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci.* 2005;30:342–353.

Hoffmann C, Moro S, Nicholas RA, Harden TK, Jacobson KA. The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y1 receptor in surface expression and activation processes. *J Biol Chem.* 1999;274:14639–14647.

Hohage H, Reinhardt C, Borucki U, Enck G, Schluter H, Schlatter E, Zidek W. Effects of diadenosine polyphosphates on renal function and blood pressure in anesthetized Wistar rats. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7:1216–1222.

Hollah P, Hausberg M, Kosch M, Barenbrock M, Letzel M, Schlatter E, Rahn KH. A novel assay for determination of diadenosine polyphosphates in human platelets: studies in normotensive subjects and in patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 2001;19(2):237-245.

Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001;409:202–207.

Holopainen JM, Moilanen JA, Sorsa T, Kivelä-Rajamäki M, Tervahartiala T, Vesaluoma MH, Tervo TM. Activation of matrix metalloproteinase-8 by membrane type 1-MMP and their expression in human tears after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(6):2550-2556.

Holton FA, Holton P. The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *J Physiol.* 1953;119(4):50P-51P.

Holton P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol.* 1959;145(3):494-504.

Hou M, Harden TK, Kuhn CM, Baldetorp B, Lazarowski E, Pendergast W, Möller S, Edvinsson L, Erlinge D. UDP acts as a growth factor for vascular smooth muscle cells by activation of P2Y(6) receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(2):H784-H792.

Hoyle CH. Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function. *Gen Pharmacol.* 1990;21(6):827-831.

Hoyle CHV, Hilderman R, Pintor JJ, Schlüter H, King BF. Diadenosine polyphosphates as extracellular signal molecules. *Drug Dev Res.* 2001;52:260–273.

Hoyle CHV, Peral A, Pintor J. Melatonin potentiates tear secretion induced by diadenosine tetraphosphate in the rabbit. *Eur J Pharmacol* 2006;552:159-161.

- Huang TY, DerMardirossian C, Bokoch GM. Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(1):26–31.
- Humphrey PP, Buell G, Kennedy I, Khakh BS, Michel AD, Surprenant A, Trezise DJ. New insights on P2X purinoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1995;352:585–596.
- Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Ret Eye Res.* 2000;19:113–129.
- Ingall AH, Dixon J, Bailey A, Coombs ME, Cox D, McInally JI, Hunt SF, Kindon ND, Teobald BJ, Willis PA, Humphries RG, Leff P, Clegg JA, Smith JA, Tomlinson W. Antagonists of the platelet P2T receptor: A novel approach to antithrombotic therapy. *J Med Chem.* 1999;42:213–220.
- Irvine RF. Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(5):349-360.
- Itoh H, Yamamura S, Ware JA, Zhuang S, Mii S, Liu B, Kent KC. Differential effects of protein kinase C on human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281(1):H359-H370.
- Jackson AL, Linsley PS. Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet.* 2004;20:521-524.
- Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:247–269.
- Jankowski J, Hagemann J, Tepel M, van Der Giet M, Stephan N, Henning L, Gouni-Berthold I, Sachinidis A, Zidek W, Schluter H. Dinucleotides as growth-promoting extracellular mediators. Presence of dinucleoside diphosphates Ap2A, Ap2G, and Gp2G in releasable granules of platelets. *J Biol Chem.* 2001 Mar 23;276(12):8904-9
- Jankowski J, Jankowski V, Laufer U, van der Giet M, Henning L, Tepel M, Zidek W, Schluter H. Identification and quantification of diadenosine polyphosphate concentrations in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1231–1238.
- Jarvis MF, Khakh BS. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacol* 2009;56:208-215.
- Jiang SY, Ramachandran S. Comparative and evolutionary analysis of genes encoding small GTPases and their activating proteins in eukaryotic genomes. *Physiol Genomics* 2006;24:235–251.
- Jumblatt JE, Jumblatt MM. Regulation of ocular mucin secretion by P2Y2 nucleotide receptors in rabbit and human conjunctiva. *Exp Eye Res.* 1998;67:341-346.

- Kang SJ, Kim EK, Kim HB. Expression and distribution of extracellular matrices during corneal wound healing after keratomileusis in rabbits. *Ophthalmologica* 1999;213(1):20-24.
- Kauffmanstein G, Hechler B, Cazenave JP, Gachet C. Adenine triphosphate nucleotides are antagonists at the P2Y receptor. *J Thromb Haemost*. 2004;2:1980-1988.
- Kaulich M, Streicher F, Mayer R, Müller I, Müller CE. Flavonoids—novel lead compounds for the development of P2Y2 receptor antagonists. *Drug Dev Res*. 2003;59:72-81.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Seguela P, Voigt M, Humphrey PP. International union of pharmacology: XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev*. 2001;53:107-118.
- Kim SG, Gao ZG, Soltysiak KA, Chang TS, Brodie C, Jacobson KA. P2Y6 nucleotide receptor activates PKC to protect 1321N1 astrocytoma cells against tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Cell Mol Neurobiol*. 2003;23(3):401-418.
- Kimura K, Kawamoto K, Teranishi S, Nishida T. Role of Rac1 in Fibronectin-Induced Adhesion and Motility of Human Corneal Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(10):4323-4329.
- Kimura K, Hattori A, Usui Y, Kitazawa K, Naganuma M, Kawamoto K, Teranishi S, Nomizu M, Nishida T. Stimulation of Corneal Epithelial Migration by a Synthetic Peptide (PHSRN) Corresponding to the Second Cell-Binding Site of Fibronectin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(3):1110-1118.
- Klepeis VE, Weinger I, Kaczmarek E, Trinkaus-Randall V. P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration. *J Cell Biochem*. 2004;93(6):1115-1133.
- Klishin A, Lozovaya N, Pintor J, Miras-Portugal MT, Krishtal O. Possible functional role of diadenosine polyphosphates: negative feedback for excitation in hippocampus. *Neuroscience* 1994;58:235-236.
- Koivunen J, Aaltonen V, Koskela S, Lehenkari P, Laato M, Peltonen J. Protein kinase C alpha/beta inhibitor Go6976 promotes formation of cell junctions and inhibits invasion of urinary bladder carcinoma cells. *Cancer Res*. 2004;64(16):5693-5701.
- Kovar DR. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18:11-17.
- Kudirka JC, Panupinthu N, Tesseyman MA, Dixon SJ, Bernier SM. P2Y nucleotide receptor signaling through MAPK/ERK is regulated by extracellular matrix: involvement of beta3 integrins. *J Cell Physiol*. 2007;213(1):54-64.

- Kulick MB, von Kügelgen I. P2Y-receptors mediating an inhibition of the evoked entry of calcium through N-type calcium channels at neuronal processes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303:520–526.
- Kulkarni AA, Trousdale MD, Stevenson D, Gukasyan HJ, Shiue MHI, Kim K-J, Read RW, Lee VHL. Nucleotide-induced restoration of conjunctival chloride and fluid secretion in adenovirus type 5-infected pigmented rabbit eyes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305:1206–1211.
- Kurpakus WM, Kernacki KA, Hazlett LD. Corneal cell proteins and ocular surface pathology. *Biotech Histochem.* 1999;74(3):146-159.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001;81:807–869.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007;23:2947-2948.
- Lazarowski ER, Watt WC, Stutts MJ, Boucher RC, Harden TK. Pharmacological selectivity of the cloned human P2U-purinoreceptor: potent activation by diadenosine tetraphosphate. *Br J Pharmacol.* 1995;116:1619–1627.
- Lehrer MS, Sun TT, Lavker RM. Strategies of epithelial repair: modulation of stem cell and transit amplifying cell proliferation. *J Cell Sci.* 1998;111(Pt 19):2867-2875.
- Leipzig J. Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am J Physiol.* 2003;284:F419–F432.
- Leitch EC, Willcox MD. Synergic antistaphylococcal properties of lactoferrin and lysozyme. *J Med Microbiol.* 1998 Sep;47(9):837-42.
- Leitch EC, Willcox MD. Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. *J Med Microbiol.* 1999a;48:867–871.
- Leitch EC, Willcox MD. Lactoferrin increases the susceptibility of *S. Epidermidis* biofilms to lysozyme and vancomycin. *Curr Eye Res.* 1999b;19:12–19.
- Leon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich A, LeMeur M, Cazenave JP, Gachet C. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y1 receptor-null mice. *J Clin Invest.* 1999;104:1731–1737.
- Leon C, Vial C, Cazenave JP, Gachet C. Cloning and sequencing of a human cDNA encoding endothelial P2Y1 purinoreceptor. *Gene* 1996;171:295–297.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 1998;74:49–139.

Linden J. Cloned adenosine A₃ receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions. *Trends Pharmacol Sci.* 1994;15(8):298-306.

Linder S, Aepfelbacher M. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells, *Trends Cell Biol.* 2003;13:376–385.

Lu L, Reinach PS, Kao WW-Y. Corneal Epithelial Wound Healing. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001;226(7):653-664.

Luke TM, Hexum TD. UTP and ATP increase extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in bovine chromaffin cells through epidermal growth factor receptor transactivation. *Purinergic Signal.* 2008;4(4):323-330.

Luo J, Jankowski V, Gungar N, Neumann J, Schmitz W, Zidek W, Schluter H, Jankowski J. Endogenous diadenosine tetraphosphate, diadenosine pentaphosphate, and diadenosine hexaphosphate in human myocardial tissue. *Hypertension* 2004;43:1055–1059.

Lustig KD, Shiao AK, Brake AJ, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5113–5117.

Lüthje J, Ogilvie A. The presence of diadenosine 5',5''-P₁,P₃-triphosphate (Ap₃A) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;115(1):253-260.

Luthje J, Ogilvie A. Catabolism of Ap₄A and Ap₃A in human serum. Identification of isoenzymes and their partial characterization. *Eur. J. Biochem.* 1987;169:385–388.

MacDonald PE, Braun M, Galvanovskis J, Rorsman P. Release of small transmitters through kiss-and-run fusion pores in rat pancreatic beta cells. *Cell Metabol.* 2006;4:283–290.

Mackay DJ, Hall A. Rho GTPases. *J Biol Chem.* 1998;273(33):20685-20688.

Maguen E, Zorapapel NC, Zieske JD, Ninomiya Y, Sado Y, Kenney MC, Ljubimov AV. Extracellular matrix and matrix metalloproteinase changes in human corneas after complicated laser-assisted in situ keratomileusis (LASIK). *Cornea* 2002;21(1):95-100.

Mamedova LK, Wang R, Besada P, Liang BT, Jacobson KA. Attenuation of apoptosis in vitro and ischemia/reperfusion injury in vivo in mouse skeletal muscle by P₂Y₆ receptor activation. *Pharmacol Res.* 2008;58(3-4):232-239.

Maminishkis A, Jalickee S, Blaug SA, Rymer J, Yerxa BR, Peterson WM, Miller SS. The P₂Y₂ receptor agonist INS37217 stimulates RPE fluid transport in vitro and retinal reattachment in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(11):3555-3566.

Manzoli L, Billi AM, Faenza I, Matteucci A, Martelli AM, Peruzzi D, Falconi M, Rhee SG, Gilmour RS, Cocco L. Nuclear phospholipase C: a novel aspect of phosphoinositide signalling. *Anticancer Res.* 1999;19(5A):3753-3756.

- Manzoli L, Billi AM, Martelli AM, Cocco L. Regulation of nuclear phospholipase C activity. *Acta Biochim Pol.* 2004;51(2):391-395.
- Marcet B, Horckmans M, Libert F, Hassid S, Boeynaems JM, Communi D. Extracellular nucleotides regulate CCL20 release from human primary airway epithelial cells, monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *J Cell Physiol.* 2007;211(3):716-727.
- Maroney AC, Glicksman MA, Basma AN, Walton KM, Knight EJ, Murphy CA, Bartlett BA, Finn JP, Angeles T, Matsuda Y, Neff NT, Dionne CA. J. Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway. *Neurosci.* 1998;18(1):104-111.
- Marteau F, Le Poul E, Communi D, Communi D, Labouret C, Savi P, Boeynaems JM, Gonzalez NS. Pharmacological characterization of the human P2Y13 receptor. *Mol Pharmacol.* 2003;64:104–112.
- May C, Weigl L, Karel A, Hohenegger M. Extracellular ATP activates ERK1/ERK2 via a metabotropic P2Y1 receptor in a Ca²⁺ independent manner in differentiated human skeletal muscle cells. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(10):1497-1509.
- Mayo KH, Mvele OM, Puri RN. Proton magnetic resonance spectroscopic analysis of diadenosine 50, 5000-polyphosphates. *FEBS Lett.* 1990;265:97–100.
- McArdle CA, Davidson JS, Willars GB. The tail of the gonadotrophin-releasing hormone receptor: desensitization at, and distal to, G protein-coupled receptors. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;151(1-2):129-136
- McMonnies C, Ho A, Wakefield D. Optimum dry eye classification using questionnaire responses. *Adv Exp Med Biol.* 1998;438:835–838.
- Mediero A, Peral A, Pintor J. Dual roles of diadenosine polyphosphates in corneal epithelial cell migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:4500–4506.
- Mediero A, Alarma-Estrany P, Pintor J. New treatments for ocular hypertension. *Auton Neurosci.* 2009;147(1-2):14-19.
- Meldrum E, Parker PJ, Carozzi A. The PtdIns-PLC superfamily and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1991;1092(1):49-71.
- Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J.* 1998;332(Pt 2):281-292.
- Merriman-Smith R, Tunstall M, Kistler J, Donaldson P, Housley G, Eckert R. Expression profiles of P2-receptor isoforms P2Y1 and P2Y2 in the rat lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:2791–2796.

Millard TH, Sharp SJ, Machesky LM. Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J.* 2004;380:1–17.

Miras-Portugal MT, Gualix J, Mateo J, Díaz-Hernández M, Gómez-Villafuertes R, Castro E, Pintor J. Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism. *Prog Brain Res.* 1999;120:397-409.

Mitchell CH, Carre DA, McGlenn AM, Stone RA, Civan MM. A release mechanism for stored ATP in ocular ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7174–7178.

Mitchell CH. Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space. *J Physiol.* 2001;534:193–202.

Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J Biol Chem.* 1997;272:16657–16662.

Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36(13):2557-2567.

Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N. Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;371(4):707-712.

Murakami T, Fujihara T, Nakamura M, Nakata K. P2Y(2) receptor elicits PAS-positive glycoprotein secretion from rabbit conjunctival goblet cells in vivo. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2003;19:345–352.

Murphy GA, Solski PA, Jillian SA, Pérez de la Ossa P, D'Eustachio P, Der CJ, Rush MG. Cellular functions of TC10, a Rho family GTPase: regulation of morphology, signal transduction and cell growth. *Oncogene* 1999;18:3831–3845.

Muscella A, Greco S, Elia MG, Storelli C, Marsigliante S. Differential signalling of purinoceptors in HeLa cells through the extracellular signal-regulated kinase and protein kinase C pathways. *J Cell Physiol.* 2004;200(3):428-439.

Nakamura M, Nagano T, Chikama T, Nishida T. Up-regulation of phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin by combination of substance P and IGF-1 in SV-40 transformed human corneal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;242(1):16-20.

Nakamura M, Nagano T, Chikama T, Nishida T. Role of the small GTP-binding protein rho in epithelial cell migration in the rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(5):941-947.

- Nakamura M, Chikama T, Nishida T. Participation of p38 MAP kinase, but not p44/42 MAP kinase, in stimulation of corneal epithelial migration by substance P and IGF-1. *Curr Eye Res.* 2005;30(10):825-834.
- Naumann N, Siratska O, Gahr M, Rosen-Wolff A. P-glycoprotein expression increases ATP release in respiratory cystic fibrosis cells. *J Cystic Fibrosis* 2005;4:157–168.
- Neary JT, Kang Y, Willoughby KA, Ellis EF. Activation of extracellular signal-regulated kinase by stretch-induced injury in astrocytes involves extracellular ATP and P2 purinergic receptors. *J Neurosci.* 2003;23(6):2348-2356.
- Nguyen T, Erb L, Weisman GA, Marchese A, Heng HH, Garrad RC, George SR, Turner JT, O'Dowd BF. Cloning, expression, and chromosomal localization of the human uridine nucleotide receptor gene. *J Biol Chem.* 1995;270:30845–30848.
- Nicholas RA, Lazarowski ER, Watt WC, Li Q, Boyer J, Harden TK. Pharmacological and second messenger signalling selectivities of cloned P2Y receptors. *J Autonom Pharmacol.* 1996a;16:319–323.
- Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. *Mol Pharmacol.* 1996b;50(2):224-229.
- Nicholas RA. Identification of the P2Y(12) receptor: a novel member of the P2Y family of receptors activated by extracellular nucleotides. *Mol Pharmacol.* 2001;60:416–420.
- Nishida T, Nakagawa S, Ohashi Y, Awata T, Manabe R. Fibronectin in corneal wound healing: appearance in cultured rabbit cornea. *Jpn J Ophthalmol.* 1982;26:410–415.
- Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 1995;9(7):484-496.
- North RA. P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels. *Ciba Found Symp.* 1996;198:91-105.
- North RA, Surprenant A. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:563-580.
- Offord EA, Sharif NA, Macé K, Tromvoukis Y, Spillare EA, Avanti O, Howe WE, Pfeifer AM. Immortalized human corneal epithelial cells for ocular toxicity and inflammation studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:1091–1101.
- Ogilvie A, Lüthje J, Pohl U, Busse R. Identification and partial characterization of an adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine hydrolase on intact bovine aortic endothelial cells. *Biochem J.* 1989;259(1):97-103.
- Ogilvie A, Blasius R, Schulze-Lohoff E, Sterzel RB. Adenine dinucleotides: a novel class of signalling molecules. *J Autonom Pharmacol.* 1996;16:325–328.

- Omelchenko T, Vasiliev JM, Gelfand IM, Feder HH, Bonder EM. Rho-dependent formation of epithelial "leader" cells during wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(19):10788-10793.
- Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 2000;12:1-13.
- Otto IM, Raabe T, Rennefahrt UE, Bork P, Rapp UR, Kerkhoff E. The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization. *Curr Biol*. 2000;10(6):345-348.
- Panjwani N, Michalopoulos G, Song J, Zaidi TS, Yogeewaran G, Baum J. Neutral glycolipids of migrating and nonmigrating rabbit corneal epithelium in organ and cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990;31:689-695.
- Parr CE, Sullivan DM, Paradiso AM, Lazarowski ER, Burch LH, Olsen JC, Erb L, Weisman GA. Cloning and expression of a human P2U nucleotide receptor, a target for cystic fibrosis pharmacotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:3275-3279.
- Patel K, Barnes A, Camacho J, Paterson C, Boughtflower R, Cousens D, Marshall F. Activity of diadenosine polyphosphates at P2Y receptors stably expressed in 1321N1 cells. *Eur J Pharmacol*. 2001;430:203-210.
- Paulsen FP, Pufe T, Schaudig U, Held-Feindt J, Lehmann J, Schroder JM, Tillmann BN. Detection of natural peptide antibiotics in human nasolacrimal ducts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2157-2163.
- Pawlak G, Helfman DM. MEK mediates v-Src-induced disruption of the actin cytoskeleton via inactivation of the Rho-ROCK-LIM kinase pathway. *J Biol Chem*. 2002;277(30):26927-26933.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrinol Rev*. 2001;22:153-183.
- Pearson RA, Dale N, Llaudet E, Mobbs P. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 2005;46:731-744.
- Pendergast W, Yerxa BR, Douglass JG 3rd, Shaver SR, Dougherty RW, Redick CC, Sims IF, Rideout JL. Synthesis and P2Y receptor activity of a series of uridine dinucleoside 5'-polyphosphates *Bioorg Med Chem Lett*. 2001;11(2):157-160.
- Peral A, Carracedo G, Acosta MC, Gallar J, Pintor J. Increased levels of diadenosine polyphosphates in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:4053-4058.

Peral A, Loma P, Yerxa B, Pintor J. Topical application of nucleotides increase lysozyme levels in tears. *Clin Ophthalmol* 2008;346(2):1-7.

Peral A, Gallar J, Pintor J. Adenine nucleotide effect on intraocular pressure: Involvement of the parasympathetic nervous system. *Exp Eye Res.* 2009 Feb 27. [Epub ahead of print]

Perez E, Lopez-Briones LG, Gallar J, Belmonte C. Effects of chronic sympathetic stimulation on corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987;28(2):221-224.

Peterson WM, Meggyesy C, Yu K, Miller SS. Extracellular ATP activates calcium signaling, ion, and fluid transport in retinal pigment epithelium. *J Neurosci.* 1997;17:2324–2337.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:e45.

Picher M, Boucher RC. Biochemical evidence for an ecto alkaline phosphodiesterase I in human airways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000;23(2):255-261.

Pintor J, Torres M, Miras-Portugal MT. Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates—Ap4A and Ap5A—from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. *Life Sci.* 1991;48:2317–2324.

Pintor J, Diaz-Rey MA, Torres M, Miras-Portugal MT. Presence of diadenosine polyphosphates—Ap4A and Ap5A—in rat brain synaptic terminals. Ca²⁺ dependent release evoked by 4-aminopyridine and veratridine. *Neurosci Lett.* 1992a;136:141–144.

Pintor J, Kowalewsky HJ, Torres M, Miras-Portugal MT, Zimmermann H. Synaptic vesicle storage of diadenosine polyphosphates in the Torpedo electric organ. *Neurosci Res Commun.* 1992b;10:9–15.

Pintor J, Rotllan P, Torres M, Miras-Portugal MT. Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal Biochem.* 1992c;200:296–300.

Pintor J, Porrás A, Mora F, Miras-Portugal MT. Amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates—Ap4A and Ap5A—from caudate putamen of conscious rat. *Neurosci Lett.* 1993;150: 13–16.

Pintor J, Porrás A, Mora F, Miras-Portugal MT. Dopamine receptor blockade inhibits the amphetamine-induced release of diadenosine polyphosphates, diadenosine tetraphosphate and diadenosine pentaphosphate, from neostriatum of the conscious rat. *J Neurochem.* 1995;64:670–676.

Pintor J, King BF, Miras-Portugal MT, Burnstock G. Selectivity and activity of adenine dinucleotides at recombinant P2X2 and P2Y1 purinoceptors. *Br J Pharmacol.* 1996;119:1006–1012.

- Pintor J, Diaz-Hernandez M, Gualix J, Gomez-Villafuertes R, Hernando F, Miras-Portugal MT. Diadenosine polyphosphate receptors. From rat and guinea-pig brain to human nervous system. *Pharmacol Ther.* 2000;87:103–115.
- Pintor J, Villafuertes RG, Miras-Portugal MT. Pharmacological profile of the dinucleotide receptor present in rat brain isolated synaptic terminals. *Anal Pharmacol.* 2001a;2(1):85–92.
- Pintor J, Peral A. Therapeutic potential of nucleotides in the eye. *Drug Dev Res.* 2001b;52:190–195.
- Pintor J, Carracedo G, Alonso MC, Bautista A, Peral A. Presence of diadenosine polyphosphates in human tears. *Pflugers Arch.* 2002a;443(3):432–436.
- Pintor J, Peral A, Hoyle CHV, Redick C, Douglass J, Sims I, Yerxa B. Effects of diadenosine polyphosphates on tear secretion in New Zealand white rabbits. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002b;300:291–297.
- Pintor J, Peral A, Pelaez T, Martin S, Hoyle CHV. Presence of diadenosine polyphosphates in the aqueous humor: their effect on intraocular pressure. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;304:342–348.
- Pintor J, Bautista A, Carracedo G, Peral A. UTP and diadenosine tetraphosphate accelerate wound healing in the rabbit cornea. *Ophthalm Physiol Opt.* 2004a;24:186–193.
- Pintor J, Pelaez T, Peral A. Adenosine tetraphosphate, Ap₄, a physiological regulator of intraocular pressure in normotensive rabbit eyes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004b;308:468–473.
- Pintor J, Sanchez-Nogueiro J, Irazu M, Mediero A, Pelaez T, Peral A. Immunolocalization of P₂Y receptors in the rat eye. *Purin Signal.* 2004c;1:83–90.
- Pintor J. Adenine nucleotides and dinucleotides as new substances for the treatment of ocular hypertension and glaucoma. *Curr Opin Invest Drugs* 2005;6:76–80.
- Pivorun EB, Nordone A. Brain synaptosomes display a diadenosine tetraphosphate (Ap₄A)-mediated Ca²⁺ influx distinct from ATP-mediated influx. *J Neurosci Res.* 1996;44(5):478–89.
- Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P. Fidelity and spatiotemporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol.* 2002;64:755–763.
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 1995;270:7420–7426.

Ralevic V, Hoyle CHV, Burnstock G. Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries. *J Physiol*. 1995;483:703–713.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*. 1998;50:413–492.

Ralevic V, Burnstock G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect*. 2003;16:133–140.

Rapaport E, Zamecnik PC. Presence of diadenosine 5',5'''-P₁, P₄-tetrphosphate (Ap₄A) in mamalian cells in levels varying widely with proliferative activity of the tissue: a possible positive "pleiotypic activator". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(11):3984-3988.

Redzic ZB, Markovic ID, Vidovic VP, Vranic VP, Gasic JM, Duricic BM, Pokrajac M, Dordevic JB, Segal MB, Rakic LM. Endogenous nucleosides in the guinea-pig eye: analysis of transport and metabolites. *Exp Eye Res*. 1998;66:315–325.

Reigada D, Mitchell CH. Release of ATP from retinal pigment epithelial cells involves both CFTR and vesicular transport. *Am J Physiol*. 2005;288:C132–C140.

Rhodes JD, Collison DJ, Duncan G. Calcium activates SK channels in the intact human lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:3927–3932.

Ridley AJ. Rho GTPases. Integrating integrin signaling, *J Cell Biol*. 2000;150:F107–F109.

Ridley AJ. Rho family proteins: coordinating cell responses, *Trends Cell Biol*. 2001;11:471–477.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back, *Science* 2003;302:1704–1709.

Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *TRENDS in Cell Biology* 2006;16(10):522-529.

Rieck PW, Cholidis S, Hartmann C. Intracellular signaling pathway of FGF-2-modulated corneal endothelial cell migration during wound healing in vitro. *Exp Eye Res*. 2001;73(5):639-650.

Riento K. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol*. 2003;23:4219–4229.

Robbins DJ, Zhen E, Owaki H, Vanderbilt C, Ebert D, Geppert TD, Cobb MHJ. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *Biol Chem*. 1993;268(7):5097-5106.

- Roberts JA, Vial C, Digby HR, Agboh KC, Wen H, Atterbury-Thomas A, Evans RJ. Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Archiv Eur J Physiol*. 2006;452:486–500.
- Rodriguez del Castillo A, Torres M, Delicado EG, Miras-Portugal MT. Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates-Ap4A and Ap5A-in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. *J Neurochem*. 1988;51(6):1696-1703.
- Rodriguez-Pascual F, Torres M, Rotllán P, Miras-Portugal MT. Extracellular hydrolysis of diadenosine polyphosphates, ApnA, by bovine chromaffin cells in culture. *Arch Biochem Biophys*. 1992;297(1):176-183.
- Roovers K, Assoian RK. Effects of rho kinase and actin stress fibers on sustained extracellular signal-regulated kinase activity and activation of G(1) phase cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol*. 2003;23(12):4283-4294.
- Rossi L, Manfredini R, Bertolini F, Ferrari D, Fogli M, Zini R, Salati S, Salvestrini V, Gulinelli S, Adinolfi E, Ferrari S, Di Virgilio F, Baccarani M, Lemoli RM. The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration. *Blood*. 2007;109(2):533-542.
- Rossmann KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(2):167–180.
- Rotllán P, Asensio AC, Ramos A, Rodriguez-Ferrer CR, Oaknin S. Ecto enzymatic hydrolysis of the signalling nucleotides diadenosine polyphosphates. *Res signpost*. 2002. En “Recent Research Developments in Biochemistry”, vol 3, pp. 191-209.
- Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004;68(2):320-344.
- Rubinfeld H, Hanoch T, Seger R. Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *J Biol Chem*. 1999;274:30349–30352.
- Ryan JS, Baldrige WH, Kelly ME. Purinergic regulation of cation conductances and intracellular Ca²⁺ in cultured rat retinal pigment epithelial cells. *J Physiol*. 1999;520:745–759.
- Sack RA, Beaton A, Sathe S, Morris C, Willcox M, Bogart B. Towards a closed eye model of the pre-ocular tear layer. *Prog Ret Eye Res*. 2000;19(6):649–668.
- Saika S, Okada Y, Miyamoto T, Yamanaka O, Ohnishi Y, Ooshima A, Liu CY, Weng D, Kao WW. Role of p38 MAP kinase in regulation of cell migration and proliferation in healing corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(1):100-109.
- Sakai K, Akima M, Matsushita. Femoral vascular responses to purine and pyrimidine derivatives: release of 5-hydroxytryptamine by purine derivatives in isolated, cross-circulated rat hindlimb. *Jpn J Pharmacol*. 1979;29(2):243-251.

Sander EE, Collard JG. Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer* 1999;35(14):1905-1911.

Saporito MS, Brown EM, Miller MS, Carswell S. CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons *In vivo*. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;288(2):421-427.

Satpathy M, Gallagher P, Jin Y, Srinivas SP. Extracellular ATP opposes thrombin-induced myosin light chain phosphorylation and loss of barrier integrity in corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2005;81(2):183-192.

Sauzeau V, Le Jeune H, Cario-Toumaniantz C, Vaillant N, Gadeau AP, Desgranges C, Scalbert E, Chardin P, Pacaud P, Loirand G. P2Y(1), P2Y(2), P2Y(4), and P2Y(6) receptors are coupled to Rho and Rho kinase activation in vascular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278(6):H1751-H1761

Saxena R, Srivastava S, Trivedi D, Anand E, Joshi S, Gupta SK. Impact of environmental pollution on the eye. *Acta Ophthalmol Scand*. 2003;81:491-494.

Schafer R, Sedehizade F, Welte T, Reiser G. ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285(2):L376-L385.

Schechtman D, Mochly-Rosen D. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene* 2001;20(44):6339-6347.

Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin *in vivo* and *in culture* suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;103:49-62.

Schlüter H, Offers E, Brüggemann G, van der Giet M, Tepel M, Nordhoff E, Karas M, Spieker C, Witzel H, Zidek W. Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure. *Nature* 1994;367(6459):186-188.

Schulz A, Schöneberg T. The structural evolution of a P2Y-like G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 2003;278(37):35531-35541.

Selbie LA, Schmitz-Peiffer C, Sheng Y, Biden TJ. Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J Biol Chem*. 1993;268(32):24296-24302.

Sellers LA, Simon J, Lundahl TS, Cousens DJ, Humphrey PP, Barnard EA. Adenosine nucleotides acting at the human P2Y1 receptor stimulate mitogen-activated protein kinases and induce apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276(19):16379-16390.

Shanley LJ, McCaig CD, Forrester JV, Zhao M. Insulin, not leptin, promotes *in vitro* cell migration to heal monolayer wounds in human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(4):1088-1094.

Shaver SR, Rideout JL, Pendergast W, Douglass JG, Brown EG, Boyer JL, Patel RI, Redick CC, Jones AC, Picher M, Yerxa BR. Structure-activity relationships of dinucleotides: Potent and selective agonists of P2Y receptors. *Purinergic Signal*. 2005;1(2):183-191.

Sharma GD, He J, Bazan HE. p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem*. 2003;278(24):21989-21997.

Sharma GD, Kakazu A, Bazan HE. Protein kinase C alpha and epsilon differentially modulate hepatocyte growth factor-induced epithelial proliferation and migration. *Exp Eye Res*. 2007;85(2):289-297.

Shemarova IV. Phosphoinositide signaling in unicellular eukaryotes. *Crit Rev Microbiol*. 2007;33(3):141-156.

Shen J, Samul R, Silva RL, Akiyama H, Liu H, Saishin Y, Hackett SF, Zinnen S, Kossen K, Fosnaugh K, Vargeese C, Gomez A, Bouhana K, Aitchison R, Pavco P, Campochiaro PA. Suppression of ocular neovascularization with siRNA 587 targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther*. 2006;13:225–234.

Silberberg SD, Chang T-H, Swartz KJ. Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X4 receptor channels. *J Gen Physiol*. 2005;125:347–359.

Singer WD, Brown H, Sternweis PC. Regulation of eukaryotic Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C and Phospholipase D *Annual Review of Biochemistry* 1997;66: 475-509.

Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1325-1358.

Soto D, Pintor J, Peral A, Gual A, Gasull X. Effects of dinucleoside polyphosphates on trabecular meshwork cells and aqueous humor outflow facility. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;314:1042–1051.

Spampinato S, Baiula M, Calienni M. Agonist-regulated internalization and desensitization of the human nociceptin receptor expressed in CHO cells. *Curr Drug Targets*. 2007;8(1):137-146.

Srinivas SP, Mutharasan R, Fleiszig S. Shear-induced ATP release by cultured rabbit corneal epithelial cells. *Adv Exp Med Biol*. 2002;506:677–685.

Steele C. Corneal wound healing: a review. *Optometry Today* 1999;28-32.

Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A₂-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol*. 1992;6:384-393.

Sternweis PC, Smrcka AV. Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem Sci*. 1992;17(12):502-506.

Stoeckelhuber M, Stoeckelhuber BM, Welsch U. Apocrine glands in the eyelid of primates contribute to the ocular host defense. *Cells Tissues Organs* 2004;176:187–189.

Stoner HB, Green HN. Studies on the role of the adrenal cortex in adenosine triphosphate shock. *Br J Exp Pathol*. 1950;31(5):603-614.

Stradal TE, Scita G. Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18:4–10.

Street M, Marsh SJ, Stabach PR, Morrow JS, Brown DA, Buckley NJ. Stimulation of Galphaq-coupled M1 muscarinic receptor causes reversible spectrin redistribution mediated by PLC, PKC and ROCK. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 8):1528-1536.

Stumpf A, Wenners-Epping K, Walte M, Lange T, Koch H-G, Haberle J, Dubbers A, Falk S, Kiesel L, Nikova et al.. Physiological concept for a blood based CFTR test. *Cell Physiol Biochem*. 2006;17:29–36.

Sugioka M, Fukuda Y, Yamashita M. Ca²⁺ responses to ATP via purinoceptors in the early embryonic chick retina. *J Physiol*. 1996;493(Pt 3):855–863.

SundarRaj N, Kinchington PR, Wessel H, Goldblatt B, Hassell J, Vergnes JP, Anderson SC. A Rho-associated protein kinase: differentially distributed in limbal and corneal epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(7):1266-1272.

Suzuki K, Saito J, Yanai R, Yamada N, Chikama T-I, Seki K, Nishida T. Cell–matrix and cell–cell interactions during corneal epithelial wound healing. *Prog Ret Eye Res*. 2003;22:113–133.

Swantek JL, Cobb MH, Geppert TD. Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) is required for lipopolysaccharide stimulation of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) translation: glucocorticoids inhibit TNF-alpha translation by blocking JNK/SAPK. *Mol Cell Biol*. 1997;17(11):6274-6282.

Szumilo M, Rahden-Staroń I. Biological role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in mammalian cells. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2008;62:593-598.

Taboubi S, Milanini J, Delamarre E, Parat F, Garrouste F, Pommier G, Takasaki J, Hubaud JC, Kovacic H, Lehmann M. G alpha(q/11)-coupled P2Y2 nucleotide receptor inhibits human keratinocyte spreading and migration. *FASEB J*. 2007;21(14):4047-4058.

Tamiya-Koizumi K. Nuclear lipid metabolism and signaling. *J Biochem.* 2002;132(1):13-22.

Tanaka N, Nejime N, Kubota Y, Kagota S, Yudo K, Nakamura K, Kunitomo M, Takahashi K, Hashimoto M, Shinozuka K. Myosin light chain kinase and Rho-kinase participate in P2Y receptor-mediated acceleration of permeability through the endothelial cell layer. *J Pharm Pharmacol.* 2005;57(3):335-340.

Tripathi BJ, Kwait PS, Tripathi RC. Corneal growth factors: a new generation of ophthalmic pharmaceuticals. *Cornea.* 1990;9(1):2-9.

Urquilla PR. Prolonged contraction of isolated human and canine cerebral arteries induced by uridine 5'-triphosphate. *Stroke* 1978;9(2):133-136.

Valster A, Tran NL, Nakada M, Berens ME, Chan AY, Symons M. Cell migration and invasion assays. *Methods.* 2005;37(2):208-215.

Valverde MA, Diaz M, Sepulveda FV, Gill DR, Hyde SC, Higgins CF. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 1992;355:830–833.

van Calker D, Müller M, Hamprecht B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem.* 1979;33(5):999-1005.

Vasiljev KS, Uri A, Laitinen JT. 2-Alkylthio-substituted platelet P2Y₁₂ receptor antagonists reveal pharmacological identity between the rat brain Gi-linked ADP receptors and P2Y₁₂. *Neuropharmacology* 2003;45:145–154.

von Kugelgen I, Wetter A. Molecular pharmacology of P2Y receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2000;362:310–323.

von Kugelgen I. Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes. *Pharmacol Ther.* 2006;110:415–432.

Wadhwa R, Kaul SC, Miyagishi M, Taira K. Know-how of RNA interference and its applications in research and therapy. *Mutat Res.* 2004;567:71-84.

Waldo GL, Harden TK. Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y₁ receptor. *Mol Pharmacol.* 2004;65:426–436.

Wang R, He G, Nelman-Gonzalez M, Ashorn CL, Gallick GE, Stukenberg PT, Kirschner MW, Kuang J. Regulation of Cdc25C by ERK-MAP Kinases during the G₂/M Transition. *Cell* 2007;128:1119-1132.

Waring GO 3rd, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 1982;89(6):531-590.

Watanabe M, Yano w, Kondo S, Hattori Y, Yamada N, Yanai R, Nishida T. Up-Regulation of Urokinase-Type Plasminogen Activator in Corneal Epithelial Cells Induced by Wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(8):3332-3338.

Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* 2005;15(2):76-83

Watanabe T, Umehara T, Kohara M. Therapeutic application of RNA interference for hepatitis C virus. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:1263-1276.

Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* 1993;324:219–225.

Weinger I, Klepeis VE, Trinkaus-Randall V. Tri-nucleotide receptors play a critical role in epithelial cell wound repair. *Purinergic Signal.* 2005;1(3):281-292.

Weinmann-Dorsch C, Hedl A, Grummt I, Albert W, Ferdinand FJ, Friis RR, Pierron G, Moll W, Grummt F. Drastic rise of intracellular adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine correlates with onset of DNA synthesis in eukaryotic cells. *Eur J Biochem.* 1984;138(1):179-185.

Weisman GA, Wang M, Kong Q, Chorna NE, Neary JT, Sun GY, Gonzalez FA, Seye CI, Erb L. Molecular determinants of P2Y2 nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes. *Mol Neurobiol.* 2005;31:169–183.

Westkaemper RB. A proton magnetic resonance study of the effects of polyamine and divalent metal ions on diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate base stacking. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;144(2):922-929.

Wheeler-Schilling TH, Marquardt K, Kohler K, Guenther E, Jabs R. Identification of purinergic receptors in retinal ganglion cells. *Mol Brain Res.* 2001;92:177–180.

White N, Ryten M, Clayton E, Butler P, Burnstock G. P2Y purinergic receptors regulate the growth of human melanomas. *Cancer Lett.* 2005;224(1):81-91.

White PJ, Webb TE, Boarder MR. Characterization of a Ca²⁺ response to both UTP and ATP at human P2Y11 receptors: Evidence for agonist-specific signaling. *Mol Pharmacol.* 2003;63:1356–1363.

Wihlborg AK, Wang L, Braun OO, Eyjolfsson A, Gustafsson R, Gudbjartsson T, Erlinge D. ADP receptor P2Y12 is expressed in vascular smooth muscle cells and stimulates contraction in human blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1810–1815.

Wildman SS, Brown SG, King BF, Burnstock G. Selectivity of diadenosine polyphosphates for rat P2X receptor subunits. *Eur J Pharmacol.* 1999;367:119–123.

- Wildman SS, Unwin RJ, King BF. Extended pharmacological profiles of rat P2Y2 and rat P2Y4 receptors and their sensitivity to extracellular H⁺ and Zn²⁺ ions. *Br J Pharmacol*. 2003;140(7):1177–1186.
- Willard FS, Crouch MF. MEK, ERK, and p90RSK are present on mitotic tubulin in Swiss 3T3 cells: a role for the MAP kinase pathway in regulating mitotic exit. *Cell Signal*. 2001;13(9):653-664.
- Wilson SE, Lloyd SA, He YG. EGF, basic FGF, and TGF b1 messenger RNA production in rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33:1987–1995.
- Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromalepithelial interactions in the cornea. *Prog Ret Eye Res*. 1999;18:293–309.
- Woodell JE, LaBerge M, Langan EM 3rd, Hilderman RH. P1,P4-diadenosine 5'-tetraphosphate induced DNA synthesis in mechanically injured cultured endothelial cells. *Proc Inst Mech Eng [H]*. 2003;217(1):21-26
- Wong TT, Sethi C, Daniels JT, Limb GA, Murphy G, Khaw PT. Matrix metalloproteinases in disease and repair processes in the anterior segment. *Surv Ophthalmol*. 2002;47(3):239-256.
- Wong TT, Mead AL, Khaw PT. Matrix metalloproteinase inhibition modulates postoperative scarring after experimental glaucoma filtration surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(3):1097-1103.
- Xie X, Gu Y, Fox T, Coll JT, Fleming MA, Markland W, Caron PR, Wilson KP, Su MS. Crystal structure of JNK3: a kinase implicated in neuronal apoptosis. *Structure* 1998;6(8):983-991.
- Yang L, Crason D, Trinkaus-Randall V. Cellular injury induces activation of MAPK via P2Y receptors. *J Cell Biochem*. 2004;91:938–950.
- Yerxa BR, Johnson FL. P2Y2 receptor agonists: structure, activity, and therapeutic utility. *Drugs Future* 1999;24:759–769.
- Yerxa BR. Therapeutic use of nucleotides in respiratory and ophthalmic diseases. *Drug Dev Res*. 2001;52:196–201.
- You L, Ebner S, Kruse FE. Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)-induced migration and signal transduction in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(11):2496-2504.
- Zhang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldsmith EJ. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* 1994;367(6465):704-711.

Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Palmer K, Qiao X, Fan X, Yang S, Laz TM, Bayne M, Monsma F Jr. P2Y₁₃: identification and characterization of a novel Galphai-coupled ADP receptor from human and mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;301(2):705–713.

Zhao H-B, Yu N, Fleming CR. Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18724–18729.

Zhao W, Xu Y, Kong D, Liu R, Zhang Z, Jin C, Xiu Y. Tissue-selective RNA interference in prostate cancer cell using prostate specific membrane antigen promoter/enhancer(). *Urol Oncol* 2008;16:16.

Zheng F, Soellner D, Nunez J, Wang H. The basal level of intracellular calcium gates the activation of phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling by brain-derived neurotrophic factor in cortical neurons. *J Neurochem.* 2008;106(3):1259-1274.

Zhong X, Kriz R, Seehra J, Kumar R. N-linked glycosylation of platelet P2Y₁₂ ADP receptor is essential for signal transduction but not for ligand binding or cell surface expression. *FEBS Lett.* 2004;562:111–117.

Zieske JD, Gipson IK. Protein synthesis during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1986;27:1–7.

Zieske JD, Bukusoglu G, Gipson IK. Enhancement of Vinculin Synthesis by Migrating Stratified Squamous Epithelium. *J Cell Biol* 1989;109: 571-576.

Zieske JD, Takahashi H, Hutcheon AE, Dalbone AC. Activation of epidermal growth factor receptor during corneal epithelial migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(6):1346-1355.

Zimmermann H, Volkandt W, Wittich B, Hausinger A. Synaptic vesicle life cycle and synaptic turnover. *J Physiol.* 1993;87:159–170.

Zimmerman H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Nauyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2000;362:299-309.

Anexos

8.- ANEXOS

El trabajo recogido en esta memoria se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV en la E.U. de Óptica de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección del Dr. Jesús Pintor Just.

Dña. Aránzazu Mediero ha sido financiada por una Beca-Contrato del Programa de Becas Predoctorales de la Universidad Complutense de Madrid (convocatoria 2005). Parte de los resultados obtenidos en este trabajo han dado lugar a las siguientes publicaciones y participaciones en congresos:

PUBLICACIONES:

- Mediero A, Peral A, Pintor J. Dual role of Diadenosine Polyphosphates on Corneal Epithelial Cell Migration. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47(10):4500-4506.
- Aránzazu Mediero, Ana Guzmán-Aranguez, Almudena Crooke, Assumpta Peral and Jesús Pintor. Corneal Re-epithelialization Stimulated by Diadenosine Polyphosphates Recruits RhoA/ROCK and ERK1/2 Pathways. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008;49(11):4982-4992.
- Almudena Crooke[§], Aránzazu Mediero[§], Ana Guzmán-Aránguez, Jesús Pintor. Silencing of P2Y₂ receptor delays Ap₄A-corneal re-epithelization process. [§] Estos autores contribuyen de la misma manera al trabajo. Enviado a Molecular Vision.

CONGRESOS:

- Aránzazu Mediero, Assumpta Peral y Jesús Pintor. Efecto de los nucleótidos en los mecanismos de reparación de daños en las células del epitelio corneal. Primera Jornada Complutense de Investigación en Óptica, Optometría y Ciencias de la Visión. E.U. de Óptica UCM, 20 de Mayo de 2005.

- Aránzazu Mediero, Assumpta Peral y Jesús Pintor. Efecto de los nucleótidos en la migración celular durante el proceso de reparación de daños en las células del epitelio corneal. SEBBM (Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular). Zaragoza 12-15 de Septiembre de 2005.

- Jesús Pintor, Aránzazu Mediero, Asumpta Peral. Cicatrización corneal inducida por nucleótidos y dinucleótidos. FARMADRID. Facultad Veterinaria UCM, 2005.

- Jesús Pintor, Aránzazu Mediero y Assumpta Peral. Role of diadenosine polyphosphates in corneal wound healing. PURINES. Ferrara, Mayo de 2006.

- Aránzazu Mediero, Assumpta Peral y Jesús Pintor. Estudio de las rutas intracelulares (MAPK y citoesqueleto) implicadas en la migración celular del epitelio corneal de conejo mediante Ap₄A y Ap₃A. SEBBM (Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular). Elche 7 al 10 de Septiembre de 2006.

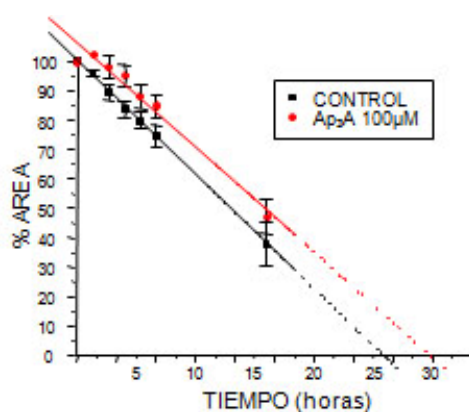
- A. Mediero, A. Peral, J. Pintor. Role of Intracellular Pathways (MAPK and Cytoskeleton) in Rabbit Corneal Epithelial Wound Healing Mediated by Ap₄A and Ap₃A. ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) IOVS, Abstract 3489-B880. Fort Lauderdale Fl, USA, 2007.

- A. Crooke, A. Mediero, A. Guzman-Aranguez, A. Peral, J. Pintor. Role of P2Y₂ Nucleotide Receptor in Ap₄A-Induced Migration of Rabbit Corneal Epithelial Cells. ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), IOVS, Abstract 3395/A249. Fort Lauderdale Fl, USA, 2008.

FE DE ERRATAS:

- PÁGINA 150:

En la Figura 17B existe un error en la gráfica correspondiente a la variación del área lesionada vs tiempo para Ap₃A 100 μM, siendo la gráfica correcta la que aquí se adjunta:



- PÁGINA 180:

En la frase “... la preincubación con U0126 produce un aumento en la VEM con una disminución del TER de 3 horas cuando lo comparamos con el dinucleótido solo” existe un error, y la frase correcta es: “... la pre-incubación con U0126 produce un aumento en la VEM con una disminución del TER de 4 horas cuando lo comparamos con el dinucleótido solo”.

- PÁGINA 181:

En la Tabla 20, existe un error en el valor de TER para Ap₃A 100 μM. En lugar donde pone + 8 h debe poner + 4 h.