

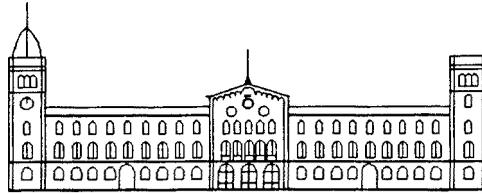
# Mecanismos adrenérgicos en la evacuación del humor acuoso

Xavier Gasull Casanova

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS I**

**TESIS DOCTORAL**

**MECANISMOS ADRENÉRGICOS EN LA  
EVACUACIÓN DEL HUMOR ACUOSO**

**XAVIER GASULL CASANOVA  
2000**







# ÍNDICE

---



ÍNDICE	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
1.1. Anatomía funcional de las cámaras oculares .....	15
1.1.1. Fisiología del ángulo iridocorneal .....	17
1.1.1.1. La red trabecular .....	18
1.1.1.2. El canal de Schlemm .....	20
1.2. El humor acuoso .....	21
1.2.1. Evacuación del humor acuoso .....	24
1.3. La presión intraocular (IOP) .....	28
1.4. Regulación de la presión intraocular .....	30
1.5. Alteraciones de la presión intraocular .....	31
1.5.1. Glaucoma .....	31
1.5.1.1. Glaucoma primario de ángulo cerrado .....	34
1.5.1.2. Glaucoma primario de ángulo abierto .....	34
1.5.1.3. Farmacología en el tratamiento del glaucoma .....	35
1.5.1.3.1. Adrenérgicos .....	39
1.6. Inervación de las estructuras de evacuación del humor acuoso e influencias sobre la presión intraocular .....	40
1.6.1. Inervación sensorial .....	40
1.6.2. Inervación parasimpática (colinérgica) .....	44
1.6.3. Inervación simpática (adrenérgica) .....	47
1.6.3.1. Receptores adrenérgicos .....	49
1.7. Participación de las prostaglandinas en la evacuación del humor acuoso .....	52
1.8. La célula trabecular .....	53
1.8.1. Segundos mensajeros .....	55
1.8.1.1. El calcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) .....	55
1.8.1.2. El AMPc .....	56
1.8.1.3. El GMPc .....	57
1.8.1.4. El $IP_3$ .....	57
1.8.2. Contracción y relajación de la célula trabecular .....	58
1.8.3. Regulación del volumen celular .....	59

<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
3.1. Animales de experimentación, obtención y condiciones de conservación .....	69
3.2. Disección.....	69
3.3. Cultivo primario de células trabeculares.....	70
3.4. Registro del calcio intracelular .....	70
3.5. Morfometría de las células trabeculares.....	73
3.6. Perfusión de segmentos anteriores <i>in vitro</i> .....	75
3.7. Fármacos y sustancias utilizadas.....	81
3.8. Métodos estadísticos.....	82
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>85</b>
4.1. Efectos adrenérgicos sobre las vías de evacuación del humor acuoso .....	87
4.1.1. Efectos sobre la facilidad de evacuación.....	87
4.1.1.1. Epinefrina y Norepinefrina .....	87
4.1.1.2. Agonistas $\beta_2$ .....	90
4.1.1.3. Agonistas $\alpha_1$ .....	92
4.1.1.4. Agonistas $\alpha_2$ .....	92
4.1.1.5. Bloqueo de los efectos de Epinefrina .....	95
4.1.2. Efectos sobre el calcio intracelular de la célula trabecular .....	97
4.1.2.1. Epinefrina y Norepinefrina .....	97
4.1.2.2. Agonistas $\beta_2$ .....	102
4.1.2.3. Agonistas $\alpha_1$ y $\alpha_2$ .....	102
4.1.3. Efectos sobre la morfología de la célula trabecular .....	106
4.1.3.1. Epinefrina y Norepinefrina .....	106
4.1.3.2. Agonistas $\alpha_1$ y $\alpha_2$ .....	109
4.2. Efecto de las prostaglandinas sobre la evacuación del humor acuoso .....	111
4.2.1. Efectos sobre la facilidad de evacuación.....	111
4.2.1.1. Prostaglandina $E_2$ .....	111
4.2.1.2. Indometacina.....	114
4.2.2. Efectos sobre el calcio intracelular de la célula trabecular .....	116
4.3. Participación del AMPc en la evacuación del humor acuoso .....	118
4.3.1. Forskolina.....	118

4.3.2. Isobutilmetilxantina (IBMX).....121

4.3.3. dibutiril-AMPc.....123

**5. DISCUSIÓN.....125**

**6. CONCLUSIONES.....143**

**7. REFERENCIAS.....149**

---

100



## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1 Partes del ojo .....	14
Fig. 1.2 Cámaras oculares .....	16
Fig. 1.3 Ángulo iridocorneal .....	17
Fig. 1.4 Red trabecular y canal de Schlemm .....	19
Fig. 1.5 Circulación del humor acuoso .....	21
Fig. 1.6 Formación y evacuación del humor acuoso .....	25
Fig. 1.7 Paso del humor acuoso a través de la red trabecular .....	26
Fig. 1.8 Vías de evacuación del humor acuoso .....	27
Fig. 1.9 Tipos de glaucoma .....	33
Fig. 1.10 Inervación periférica ocular .....	41
Fig. 1.11 Inervación de la red trabecular .....	43
Fig. 1.12 Inervación parasimpática y simpática ocular .....	46
Fig. 3.1 Esquema del sistema de registro del $[Ca^{2+}]_i$ .....	71
Fig. 3.2 Parámetros analizados en la cinética de los incrementos del $[Ca^{2+}]_i$ .....	73
Fig. 3.3 Parámetros analizados en el estudio de la morfología celular .....	74
Fig. 3.4 Esquema del sistema de registro de la facilidad de evacuación del humor acuoso .....	76
Fig. 3.5 Esquema de los protocolos experimentales utilizados .....	79
Fig. 4.1 Efecto de EPI y NE sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso .....	88
Fig. 4.2 Efecto de los agonistas $\beta_2$ y $\alpha_1$ -adrenérgicos sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso .....	90
Fig. 4.3 Efecto de la DEXMED sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso .....	93
Fig. 4.4 Bloqueo de los efectos de DEXMED sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso .....	95
Fig. 4.5 Bloqueo de los efectos de EPI sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso .....	96
Fig. 4.6 Movilizaciones de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por EPI y NE en las células trabeculares .....	98
Fig. 4.7 Oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por EPI y NE en las células trabeculares .....	100
Fig. 4.8 Movilizaciones de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por agonistas $\alpha$ -adrenérgicos en las células trabeculares .....	103
Fig. 4.9 Oscilaciones de $[Ca^{2+}]_i$ inducidas por agonistas $\alpha$ -adrenérgicos en las	

células trabeculares .....	105
Fig. 4.10 Efecto de la EPI sobre la morfología celular.....	107
Fig. 4.11 Efectos de la PGE <sub>2</sub> sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso.....	112
Fig. 4.12 Efecto de INDO sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso .....	114
Fig. 4.13 Efectos de EPI y INDO sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso..	117
Fig. 4.14 Efectos de la FSK sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso .....	119
Fig. 4.15 Efectos de IBMX y FSK sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso.	122
Fig. 4.16 Efecto de db-AMPC sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso .....	123

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Fármacos antiglaucomatosos.....	36
Tabla 1.2 Receptores adrenérgicos .....	50
Tabla 1.3 Receptores identificados en las células trabeculares.....	54
Tabla 1.4 Canales de membrana identificados en las células trabeculares .....	55
Tabla 3.1 Fármacos y drogas utilizados.....	82
Tabla 4.1 Efectos de EPI y NE sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso.....	89
Tabla 4.2 Efecto de los agonistas $\beta_2$ y $\alpha_1$ -adrenérgicos sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso.....	91
Tabla 4.3 Efecto de los agonistas $\alpha_2$ -adrenérgicos sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso.....	94
Tabla 4.4 Efectos de EPI y NE sobre el $[Ca^{2+}]_i$ en las células trabeculares .....	99
Tabla 4.5 Características de los incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por EPI y NE .....	101
Tabla 4.6 Efectos de los agonistas $\alpha$ -adrenérgicos sobre el $[Ca^{2+}]_i$ en las células trabeculares .....	104
Tabla 4.7 Efectos de EPI y NE sobre la morfología de las células trabeculares .....	108
Tabla 4.8 Efectos de los agonistas $\alpha$ -adrenérgicos sobre la morfología de las células trabeculares .....	110
Tabla 4.9 Efectos de PGE <sub>2</sub> sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso .....	113
Tabla 4.10 Efectos de EPI y INDO sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso .....	115
Tabla 4.11 Efecto de drogas que incrementan el AMPc sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso.....	120

**Abreviaturas utilizadas**

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> = concentración de calcio intracelular  
 8-BrAMPc = 8-Bromo-adenosinmonofosfato  
 8BrGMPc = 8-Bromo-guanosinmonofosfato  
 AC = adenilato ciclasa  
 AMPc = adenosinmonofosfato cíclico  
 ANP = péptido natriurético atrial- $\alpha$   
 ATP = adenosintrifosfato  
 ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> = bomba electrogénica Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>  
 AUC = área bajo la curva  
 BK<sub>Ca</sub> = canal de potasio dependiente de calcio de alta conductancia  
 BNP = péptido natriurético cerebral  
 BSA = albúmina sérica bovina  
 BTM = red trabecular bovina  
 C = facilidad de evacuación  
 CCK = colecistokinina  
 CGRP = péptido relacionado con el gen de la calcitonina  
 CNP = péptido natriurético tipo C  
 CO<sub>2</sub> = dióxido de carbono  
 COX = ciclooxigenasa  
 CREB = proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc  
 DAG = diacilglicerol  
 db-AMPc = dibutilil-adenosinmonofosfato cíclico  
 DEXMED = dexmedetomidina  
 DMEM = medio de cultivo celular *Dulbecco modified Eagle medium*  
 DMSO = dimetilsulfóxido

EDTA = *ethylenediaminetetraacetic acid*  
 EGTA = *ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid*  
 EPI = epinefrina (adrenalina)  
 ET-1; ET-2; ET-3 = endotelina-1; endotelina-2; endotelina-3  
 FSK = forskolina  
 GABA = ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
 GMPc = guanosinmonofosfato cíclico  
 IBMX = isobutilmetilxantina  
 INDO = indometacina  
 IOP = presión intraocular  
 IP<sub>3</sub> = inositol trifosfato  
 METX = metoxamina  
 NE = norepinefrina (noradrenalina)  
 NO = óxido nítrico  
 NY = neuropéptido Y  
 PBS = solución salina *Phosphate Buffered Saline*  
 PDE = fosfodiesterasa  
 PGA<sub>2</sub> = prostaglandina A<sub>2</sub>  
 PGD<sub>2</sub> = prostaglandina D<sub>2</sub>  
 PGE<sub>1</sub> = prostaglandina E<sub>1</sub>  
 PGE<sub>2</sub> = prostaglandina E<sub>2</sub>  
 PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  = prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>   
 PHEN = fenilefrina  
 PKA = proteína kinasa A  
 PRAZ = prazosin  
 VIP = polipéptido intestinal vasoactivo  
 YOH = yohimbina



# **INTRODUCCIÓN**

---



## 1. INTRODUCCIÓN

El ojo humano y en general el de los mamíferos superiores es una estructura sensorial contenida en la cavidad ocular del cráneo y conectada con el sistema nervioso central a través del nervio óptico. Las 5/6 partes de la superficie del globo ocular están ocupadas por la esclera que se continúa con la duramadre que recubre el nervio óptico. La esclera es la capa blanca y opaca que protege externamente el globo ocular. El 1/6 de la superficie del globo ocular restante está ocupado por la córnea, estructura de naturaleza fibrosa, transparente y convexa, en la que se produce la refracción de la luz que incide en ella. La unión de estas dos estructuras se produce en el limbo esclerocorneal (Fig. 1.1) (Tripathi y Tripathi, 1984a).

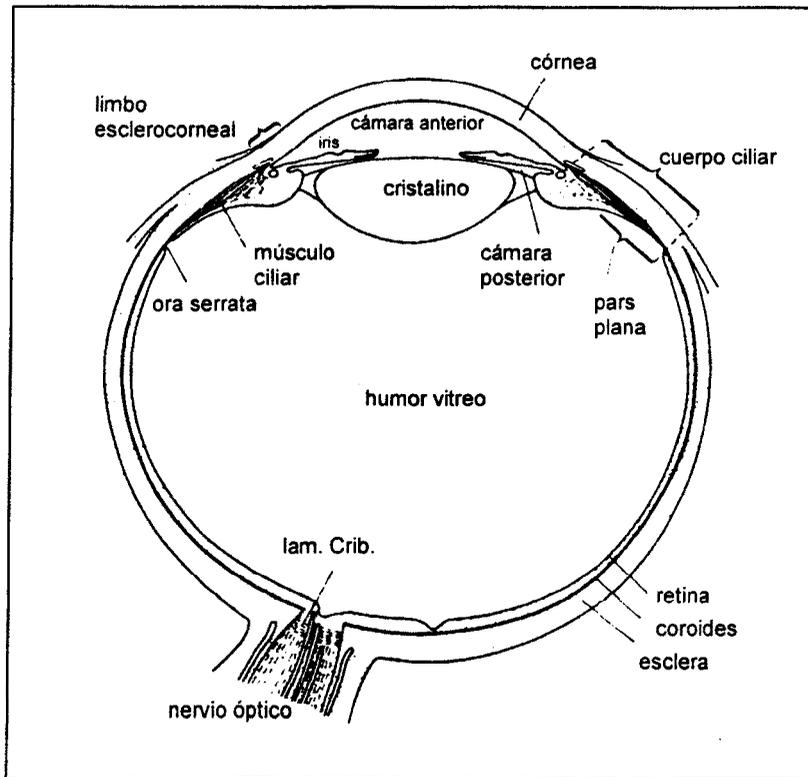
El ojo se divide en tres capas (túnicas) bien diferenciadas. Desde el exterior hacia el interior encontramos: la túnica fibrosa, la túnica vascular y la túnica nerviosa (Fig. 1.1).

La **túnica fibrosa**, la más externa, está formada a su vez por tres estructuras: la esclera, la córnea y el limbo esclerocorneal (Tripathi y Tripathi, 1984a).

La *esclera*, mencionada anteriormente, es una capa blanca, opaca y resistente, de naturaleza fibrosa que actúa recubriendo el ojo por la parte exterior (Fig. 1.1). Esta capa, junto con la presión intraocular (IOP) mantiene estable la estructura del globo ocular para su apropiada función óptica.

La *córnea*, que ocupa la parte anterior del globo ocular, es un tejido transparente caracterizado por la ausencia de vasos sanguíneos. De forma convexa por el exterior y cóncava por el interior, tiene una función principalmente óptica debido a que forma la principal superficie refractante del sistema dióptrico del ojo. La luz atraviesa esta estructura y, a través de las estructuras internas del ojo, incide en la retina donde la energía luminosa (fotónica) se transforma en una señal eléctrica (Fig. 1.1) (Waltman y Hart, 1987).

El *limbo esclerocorneal* es la zona de transición entre la esclera y la córnea, situada en la parte anterior del globo ocular (Fig. 1.1). Esta zona nutre periféricamente la córnea a través de pequeños vasos perilimbales y contiene las estructuras por donde el humor acuoso es drenado mayoritariamente: la red trabecular y el canal de Schlemm. Alteraciones, tanto estructurales como dinámicas en esta zona acostumbran a provocar la aparición de un glaucoma.



**Fig. 1.1** Esquema de las partes del ojo. Sección meridional. Modificado de Tripathi y Tripathi, 1984a.

La **túnica vascular** es la capa intermedia y forma la capa pigmentada y vascularizada del ojo. Se divide habitualmente en tres zonas: la coroides, el cuerpo ciliar y el iris (Tripathi y Tripathi, 1984a).

La *coroides* es la parte posterior de la túnica vascular que tiene como función principal proporcionar nutrientes a la retina. La coroides se extiende desde el punto de inserción del nervio óptico hasta la *ora serrata*, límite donde se convierte en el cuerpo ciliar (Fig. 1.1).

El *cuerpo ciliar* se encuentra a continuación de la coroides y de la retina, en la parte anterior del ojo. Tiene una forma aproximadamente triangular y, conjuntamente con el iris, marca la separación de las dos cámaras del ojo, la cámara anterior y la posterior (Fig. 1.1). La parte anterior del cuerpo ciliar forma el límite del ángulo iridocorneal y continúa por la parte anterior para formar la red trabecular uveal. La parte posterior está compuesta por los procesos ciliares y el músculo ciliar.

El *iris*, insertado en la parte media del cuerpo ciliar, marca la separación entre las dos

cámaras oculares y actúa como diafragma para la luz que llega a través de la córnea. El iris es una estructura pigmentada con una apertura en el centro: la pupila. A través de la pupila, el humor acuoso, formado en los procesos ciliares, pasa de la cámara posterior a la anterior (Fig. 1.1).

La **túnica sensorial** la forman dos estructuras claramente diferenciadas: la retina y el epitelio pigmentario de la retina (Tripathi y Tripathi, 1984a).

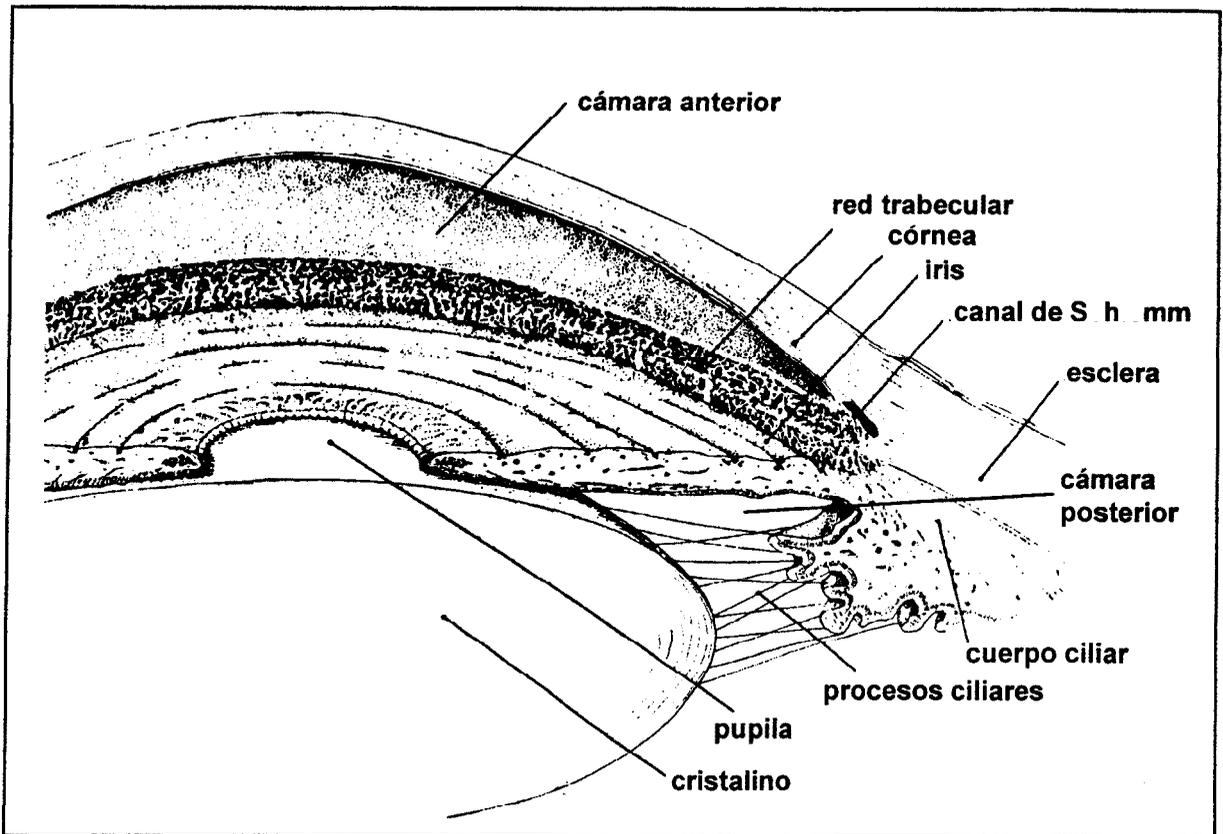
El *epitelio pigmentario* se encuentra unido fuertemente a la coroides y se extiende, igual que la coroides, desde el nervio óptico hasta la *ora serrata*, donde se continúa con el epitelio ciliar pigmentado.

La *retina* está débilmente unida al epitelio pigmentado y se muestra como una capa transparente. Aquí se encuentran los fotorreceptores (conos y bastones), las interneuronas y las células ganglionares que forman el nervio óptico con sus axones (Fig. 1.1).

### 1.1 Anatomía funcional de las cámaras oculares

Como se menciona en el apartado anterior, se observan en el ojo dos cámaras claramente diferenciadas: la cámara posterior y la cámara anterior (Fig. 1.2) (Tripathi y Tripathi, 1984a).

La **cámara posterior** (Fig. 1.2) está delimitada anteriormente por el epitelio pigmentado de la parte posterior del iris, anteromedialmente por la zona de contacto entre el iris y el cristalino y anterolateralmente por la zona de unión entre el iris y el cuerpo ciliar. El cristalino por la parte medial, los procesos ciliares por la lateral y el humor vítreo por la posterior acaban de delimitar la cámara posterior (Tripathi y Tripathi, 1984a). Esta cámara, igual que la cámara anterior, está bañada por el humor acuoso que se forma en los procesos ciliares y que fluye a través de la pupila para llenar la cámara anterior.

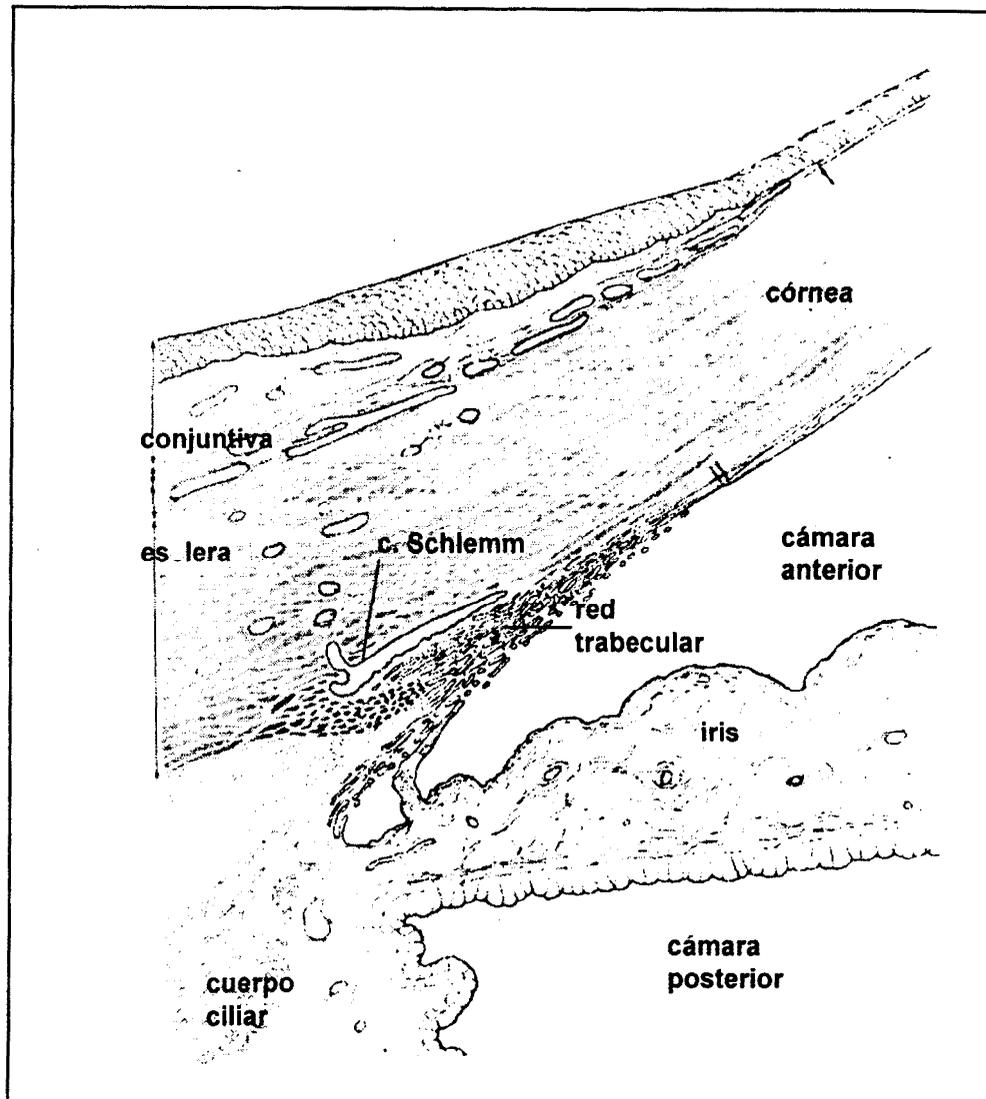


**Fig. 1.2** Esquema de las cámaras oculares (anterior y posterior) junto con las estructuras con que las delimitan. Modificado de Tripathi y Tripathi, 1984a.

La **cámara anterior** (Fig. 1.2) está delimitada, en su parte más anterior, por la córnea. El iris, junto con la superficie del cristalino, marcan la separación entre las dos cámaras por la parte posterior. Lateralmente, limita con la parte anterior del cuerpo ciliar que forma el extremo del ángulo iridocorneal. La forma y la profundidad de la cámara dependen de la curvatura de la córnea y de la forma del iris, parámetros que varían entre los diferentes individuos (Tripathi y Tripathi, 1984a). La cámara anterior está ocupada por el humor acuoso, principal responsable de la presión intraocular y que junto con la túnica fibrosa, mantiene una morfología ocular correcta para una buena función visual. Además, el humor acuoso contenido en la cámara anterior, aporta los nutrientes necesarios a la córnea y a la lente, tejidos que, debido a su ausencia de vascularización, necesitan el aporte de nutrientes de otras procedencias.

### 1.1.1. Anatomía del ángulo iridocorneal

En la cámara anterior del ojo, la córnea y el iris no interseccionan de manera brusca, sino que forman el ángulo iridocorneal (Fig. 1.3) (Tripathi y Tripathi, 1984a; Lütjen-Drecoll y Rohen, 1994a). En este punto se encuentran las estructuras que drenan el humor acuoso desde la cámara anterior hasta la circulación venosa (venas vorticosas).



**Fig. 1.3** Ángulo iridocorneal. Dibujo de las estructuras que forman el ángulo iridocorneal. Modificado de Cole, 1984.

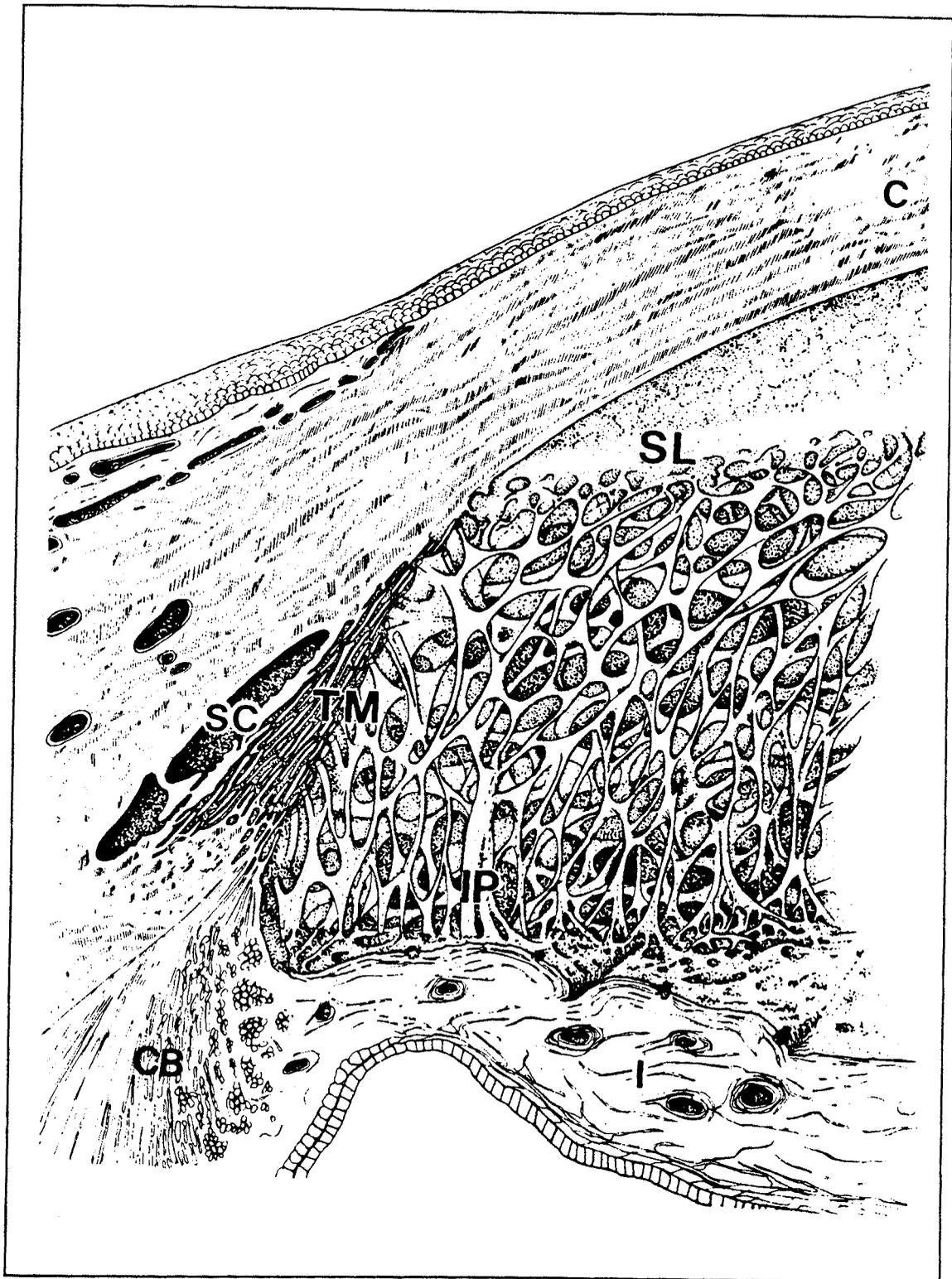
### 1.1.1.1 La red trabecular

La red trabecular es una estructura que se extiende desde el espolón escleral hasta la línea de Schwalbe (final de la membrana de Descemet de la córnea) (Lütjen-Drecoll y Rohen, 1994a). Esta estructura contiene hasta tres partes, estructural y funcionalmente diferentes: la trabécula iridouveal, la trabécula corneoescleral y la trabécula cribiforme (yuxtacanalicular) (Fig. 1.4).

La *trabécula iridouveal* es la parte más interna de la red trabecular y está en contacto con la base del iris, el cuerpo ciliar y la luz de la cámara anterior. Está formada por laminillas de tejido conectivo recubiertas por células endoteliales contenidas en una membrana basal. Estas láminas se extienden radialmente desde la base del iris o del tejido conectivo del músculo ciliar hasta el inicio del estroma corneal. En esta parte, las láminas de tejido dejan grandes espacios y aperturas de 25-75  $\mu\text{m}$  de diámetro, lo que se asocia a una muy baja resistencia al paso del humor acuoso.

En la *trabécula corneoescleral*, situada a continuación de la trabécula iridouveal y, por tanto, en una situación más anterior, las láminas de tejido están dispuestas formando una red de orientación preferentemente ecuatorial. Las células endoteliales que recubren estas estructuras conectan las diferentes láminas tanto en dirección radial como desde el interior hacia el exterior, de manera que forman una verdadera red tridimensional. Las aperturas que se encuentran entre las láminas de tejido tienen tendencia a ser más pequeñas a medida que se avanzan en dirección a la trabécula cribiforme. Las láminas de tejido son ricas en glicoproteínas, ácido hialurónico y fibras de colágeno.

La *trabécula cribiforme* limita con el canal de Schlemm y forma la pared interna de dicho canal. Esta parte de la red trabecular no está organizada en láminas de tejido como las anteriores si no que las células que la forman son alargadas y están dispersas en la matriz extracelular. De este modo, el humor acuoso fluye entre las células por la matriz extracelular. Esta matriz está formada por finas fibrillas de colágeno así como por otros tipos de fibras elásticas. En esta zona se encuentra la máxima resistencia al paso del humor acuoso (Rohen et al., 1981).



**Fig. 1.4** Red trabecular y canal de Schlemm. C: córnea; SL: línea de Schalbe; SC: canal de Schelmm; TM: red trabecular; IP: proceso iridial; CB: cuerpo ciliar; I: iris. Modificado de Tripathi y Tripathi, 1984a.

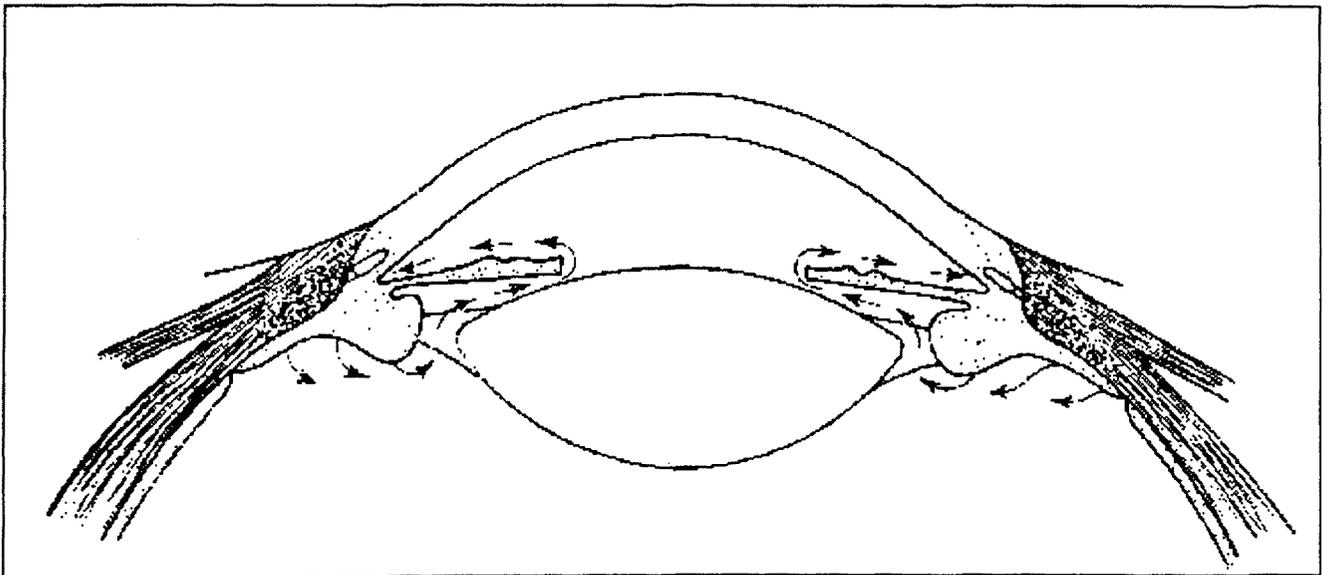
Como se detalla más adelante, la trabécula cribiforme junto con el endotelio del canal representa el principal componente de la resistencia al paso del humor acuoso. Las otras dos partes de la red trabecular tienen una función de soporte. En esta zona se acumulan y eliminan los productos que puedan llegar por el humor acuoso (ej. pigmento) y que podrían obstruir los espacios más pequeños de la red trabecular y dificultar el paso del humor acuoso. Las células de estas zonas tienen una elevada actividad fagocítica, pudiendo incorporar grandes moléculas.

#### 1.1.1.2 El canal de Schlemm

A continuación de la red trabecular y, anteriormente a ésta, se encuentra el canal de Schlemm (Fig. 1.4). Este canal está insertado en la esclera y recorre de manera circular todo el ángulo iridocorneal. El canal posee un endotelio propio que forma su pared más interna y está en íntimo contacto con la capa subendotelial, donde las células tienen numerosas interdigitaciones y fibras que mantienen unidas las dos capas (Rohen, 1982).

## 1.2. El humor acuoso

El humor acuoso es el fluido contenido en las cámaras (anterior y posterior) del ojo. Se secreta en los procesos ciliares y se drena hacia la circulación venosa mayoritariamente a través de la red trabecular y del canal de Schlemm (Fig. 1.5). La producción de humor acuoso se realiza en los procesos ciliares del cuerpo ciliar. A partir de un filtrado plasmático, junto con la secreción específica de ciertas sustancias por las células del epitelio ciliar, se forma el humor acuoso en la cámara posterior.



**Fig. 1.5** Formación (epitelio ciliar) y evacuación (ángulo iridocorneal) del humor acuoso. Las flechas indican el recorrido que sigue el humor acuoso.

Como su nombre indica, el humor acuoso es una solución acuosa de electrolitos, proteínas y otras sustancias diversas en pequeña cantidad. Estos componentes proceden de diferentes fuentes. La mayoría de los componentes derivan del plasma sanguíneo y del epitelio ciliar, pero otras sustancias provienen de tejidos como el endotelio corneal, el cristalino o el humor vítreo (Caprioli, 1987; Berman, 1991). Además de las sustancias que se secretan o se filtran en los diferentes tejidos, algunas de ellas son recaptadas como nutrientes por las células de los tejidos bañados por el humor acuoso (Cole, 1984). La composición está controlada por diferentes factores y, cuando estos no se regulan adecuadamente, se producen cambios en la composición del humor acuoso que pueden inducir diferentes patologías en la cámara anterior (Berman, 1991).

Este fluido es transparente e incoloro, con una viscosidad inferior a la del plasma sanguíneo debido a la menor concentración de proteínas (Berman, 1991). En el humor acuoso humano, la concentración de los principales cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) es similar a la del plasma, con la excepción del  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentra a una concentración considerablemente menor. Los dos principales aniones ( $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ ) también se encuentran a concentraciones similares a las del plasma. Esta composición iónica es la adecuada para mantener la neutralidad eléctrica y obtener la capacidad tamponadora necesaria para los tejidos bañados por el humor acuoso (Cole, 1984; Caprioli, 1987; Berman, 1991).

Otras moléculas presentes en el humor acuoso son: el ascorbato, que se encuentra 20 veces más concentrado que en el plasma, el glutatión, a una concentración inferior a la plasmática y la glucosa, a una concentración entre el 63 y el 76% de la plasmática. Por otra parte, los aminoácidos libres se encuentran en una gran variedad de concentraciones dependiendo de si proceden de un filtrado plasmático o de si son secretados por el epitelio ciliar (Berman, 1991). Otro tipo de sustancias como las catecolaminas, prostaglandinas y hormonas, se encuentran a concentraciones que varían según el estado del individuo y de las patologías que pueda sufrir. Las proteínas se encuentran a concentraciones muy inferiores (1/500) a las plasmáticas. La proteína más abundante es la albúmina (50% del total de proteínas), seguida de transferrina, prealbúmina, orosomucoide y la  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida. También se han hallado algunos tipos de inmunoglobulinas (Ig G y Ig E) (Berman, 1991).

La presencia de catecolaminas en el humor acuoso de humanos se ha estudiado en pacientes con cataratas o, de manera experimental, en primates (Cooper et al., 1984). La concentración media de norepinefrina encontrada en el humor acuoso humano fue de 0.796 ng/ml mientras que en el plasma fue de 0.311 ng/ml. Los niveles de epinefrina y dopamina variaron entre 0 y 0.132 ng/ml. En primates, la concentración de norepinefrina libre fue de 2.843 ng/ml y de dopamina 0.462 ng/ml, mientras que no se detectó la presencia de epinefrina libre. En los primates, la iridectomía produjo una disminución en la concentración de norepinefrina detectada (0.497 ng/ml; Cooper et al., 1984). Por otra parte, también se ha detectado en gatos y en humanos la presencia de dopamina  $\beta$ -hidroxilasa en el humor acuoso (Gual et al., 1982, 1983). Este enzima está directamente relacionado con la actividad eferente, liberándose junto a catecolaminas tras la estimulación simpática. La sobrestimulación de esta vía produce aumentos en los niveles del enzima en el humor acuoso, lo que se asocia a una mayor liberación de catecolaminas en el humor acuoso (Gual et al., 1982, 1983).

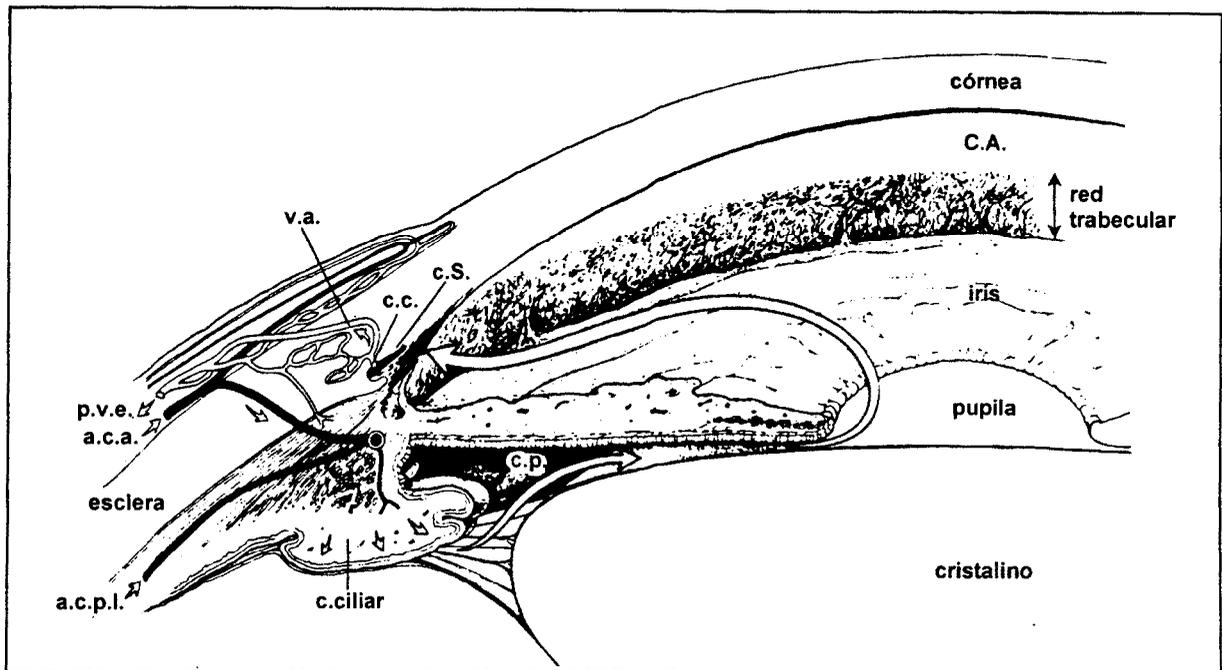
### 1.2.1. Evacuación del humor acuoso

El humor acuoso secretado en la cámara posterior por el epitelio ciliar fluye libremente a través de la pupila hacia la cámara anterior. Aunque este es su recorrido principal, nada impide en principio que parte de éste fluya hacia el humor vitreo y, por tanto, hacia el segmento posterior del ojo. Una muy pequeña porción del humor acuoso sigue esta ruta. En la cámara anterior, la superficie anterior del iris no tiene ninguna barrera epitelial, por lo que el humor acuoso puede filtrarse hacia el estroma del iris. Esta posibilidad, junto con la cantidad de humor acuoso que pueda filtrarse a través del estroma corneal, es despreciable en comparación con la cantidad que se drena a través de la ruta convencional (red trabecular y canal de Schlemm) o por la ruta uveoescleral (Lütjen-Drecoll y Rohen, 1994a).

Las dos vías principales de evacuación del humor acuoso se encuentran a nivel del ángulo iridocorneal: la vía convencional a través de la red trabecular y el canal de Schlemm (dependiente de presión) y la vía uveoescleral (independiente de presión).

La evacuación a través de la *vía convencional* comporta el paso del humor acuoso a través de la red trabecular (Fig. 1.6). La resistencia máxima al paso del humor acuoso se encuentra en la trabécula cribiforme y en el endotelio del canal. En monos, se ha calculado que en este segmento se encuentra el 90% de la resistencia total (Mäepea y Bill, 1989). Los espacios entre las células trabeculares, en esta parte de la red trabecular, controlan el paso del humor acuoso hacia el endotelio del canal. En este sentido, si los espacios se obstruyen por algún motivo, la evacuación del humor acuoso se dificulta. Para su drenaje hacia la circulación venosa, el humor acuoso debe penetrar en el canal de Schlemm y, para eso, debe salvar el endotelio del canal. En condiciones fisiológicas, el endotelio está sujeto a constantes variaciones de flujo y presión, por lo que ha desarrollado diferentes mecanismos para permitir el paso del humor acuoso (Fig. 1.7). En ese sentido, la observación más conocida es la habilidad de las células endoteliales para formar *canales transcelulares* (también llamadas vacuolas gigantes) que llegan a abrirse simultáneamente a la luz del canal y al espacio subendotelial permitiendo el paso del humor acuoso como un verdadero poro (Bill y Svedbergh, 1972; Inomata et al, 1972). Como se mencionó anteriormente, esta vía depende de la presión intraocular, por lo que si se aumenta o se reduce experimentalmente este parámetro, el número de vacuolas incrementa o disminuye respectivamente, en relación proporcional al cambio en la presión. Si la presión intraocular se incrementa por encima de ciertos valores, la vacuolización se satura y ya no sigue un

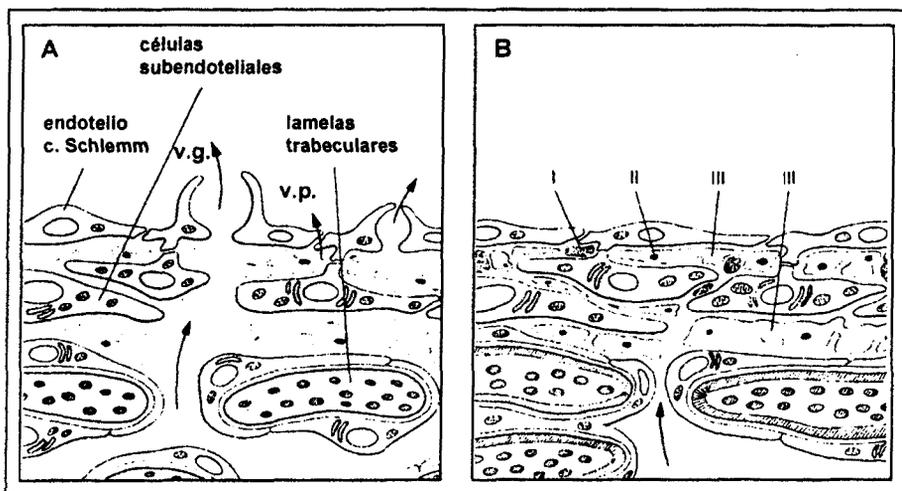
comportamiento lineal. Algunos estudios muestran que, además de esta vía, se produce un paso de humor acuoso a nivel paracelular (rutas paracelulares) entre las células endoteliales (Epstein y Rohen, 1991).



**Fig. 1.6** Formación y evacuación del humor acuoso. C.A.: cámara anterior; c.p.: cámara posterior; c.S.: canal de Schlemm; c.c.: canal colector; v.a.: venas acuosas; p.v.e.: plexo venoso episcleral; a.c.a.: arteria ciliar anterior; a.c.p.l.: arteria ciliar posterior larga; c.ciliar: cuerpo ciliar. Modificado de Potter, 1981.

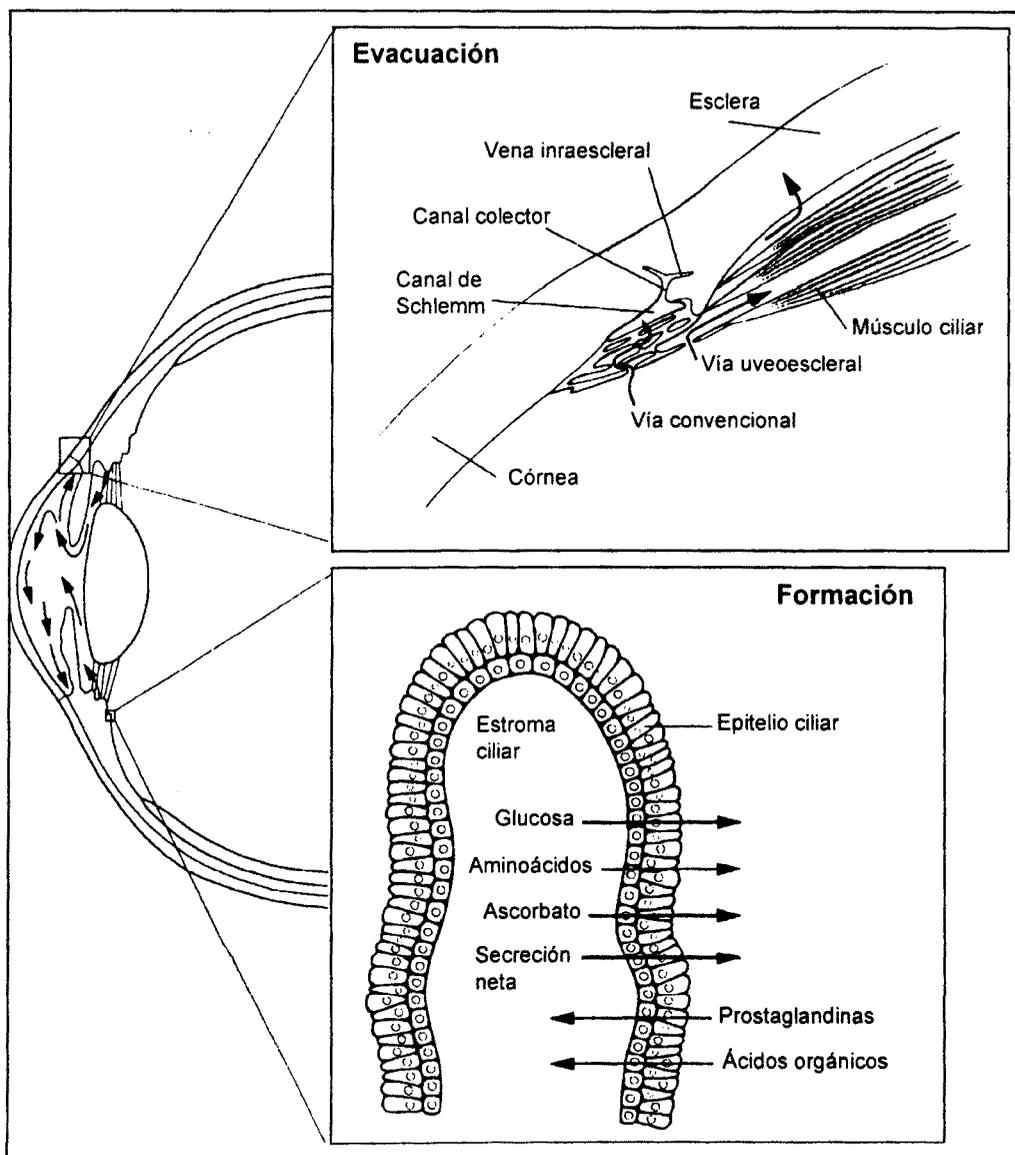
La evacuación del humor acuoso por esta vía puede modularse mediante tres mecanismos: acción de diferentes sustancias sobre la red trabecular, el tono del músculo ciliar y los cambios en la composición de la matriz extracelular. La acción de diferentes sustancias, derivadas de la inervación periférica, puede modificar la evacuación del humor acuoso a través de esta ruta (comentado más adelante en detalle). Por otra parte, los tendones del músculo ciliar están parcialmente insertados entre las láminas de tejido trabecular y cuando el músculo se contrae, las láminas de la red trabecular se expanden dejando más espacio libre para el paso del humor acuoso. Así, un aumento en el tono muscular del músculo ciliar se acompaña por un aumento de la facilidad de evacuación del humor acuoso (Nilsson y Bill, 1994). El músculo ciliar recibe inervación simpática que lo relaja y parasimpática que lo contrae. Así, la estimulación del sistema parasimpático produce la contracción del músculo ciliar y aumenta la evacuación del humor acuoso. Además, si el músculo se desinserta, no se observa este efecto (Kaufman, 1989), en cambio, la estimulación simpática produce una disminución de la evacuación del humor

acuoso en monos (Bill, 1970). Finalmente, los cambios en la composición de la matriz extracelular también provocan alteraciones en la evacuación del humor acuoso. Los espacios entre las células trabeculares están ocupados por la matriz extracelular que se compone principalmente de fibras de colágeno de tipo I y de fibras de elastina (Berman, 1991). Estos dos tipos de fibras son los componentes funcionales y estructurales mayoritarios de la matriz. Además, también se han encontrado otros compuestos como fibras de colágeno de tipo IV, glicosaminoglicanos (la red trabecular es rica en estas sustancias), fibronectina y laminina (Berman, 1991). Los cambios en esta composición, inducidos por anomalías en las células o bien por ciertos fármacos (ej. corticoides), pueden alterar el flujo del humor acuoso.



**Fig. 1.7** Paso del humor acuoso a través de la trabécula cribiforme y el endotelio del canal. **A.** Vía transcelular por vacuolas gigantes (v.g.) y ruta paracelular (v.p.) entre las células del endotelio. EN condiciones fisiológicas. **B.** Paso del humor acuoso dificultado en condiciones patológicas (glaucoma) por depósitos de material extracelular (I, II, III). Modificado de Lütjen-Drecoll y Rohen, 1994b.

A través de la *vía uveoescleral*, el humor acuoso penetra en el cuerpo ciliar, debido a la falta de barrera epitelial en el ángulo iridocorneal, y se filtra libremente entre las fibras del músculo ciliar hacia el espacio supraciliar y supracoroidal (Nilsson y Bill, 1994) (Fig. 1.8). Desde aquí, puede filtrarse a través de la esclera o por pequeños canalículos hacia el exterior del globo ocular, donde es reabsorbido en los vasos de la órbita y de la conjuntiva. La evacuación del humor acuoso a través de esta vía es independiente de la presión intraocular. Además, grandes aumentos en la presión intraocular producen compresión de las estructuras, impidiendo que la evacuación aumente.



**Fig. 1.8** Evacuación del humor acuoso a través de la vía convencional y la vía uveoescleral. Formación del humor acuoso en el epitelio ciliar. Secreción y absorción de diferentes compuestos. Modificado de Nilsson y Bill, 1994.

### 1.3. La presión intraocular (IOP)

El humor acuoso tiene dos funciones principales: nutrir las estructuras a las que baña y crear un nivel de presión en el interior del globo ocular, la presión intraocular (IOP), que prevenga la distensión del ojo durante los movimientos oculares y asegure la correcta morfología ocular para su función óptica. La IOP no tiene exactamente el mismo valor en todas las partes del globo ocular, siendo ésta mayor a nivel posterior y algo menor en la parte anterior. Este hecho favorece el flujo del humor acuoso desde la cámara posterior hacia la cámara anterior (Hart, 1994). En condiciones normales, no se observan grandes variaciones en la IOP (15-16 mmHg), pero experimenta pequeñas variaciones sincrónicas con los cambios de presión arterial. Tanto el volumen sanguíneo intraocular como la IOP incrementan durante la sístole y disminuyen durante la diástole. Las variaciones son pequeñas (1-2 mmHg), excepto en situaciones de IOP elevadas donde estas variaciones pueden ser considerables. Durante el día la IOP es mayor que durante la noche (variación ~5.9 mmHg), siendo un efecto secundario al aumento de la formación del humor acuoso (Nilsson y Bill, 1994).

En condiciones fisiológicas, la formación y la evacuación del humor acuoso están en equilibrio:

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

donde  $F_{in}$  = formación del humor acuoso;  $F_o$  = evacuación del humor acuoso;  $F_{trab}$  = evacuación a través de la vía trabecular (convencional) y  $F_u$  = evacuación a través de la vía uveoescleral.

La fuerza que provoca el flujo de salida del humor acuoso, está determinada por la diferencia de presión hidrostática entre la cámara anterior y las venas epiesclerales (hacia donde drena el humor acuoso). Según la ley de Ohm, el flujo (Q) a través de un sistema es proporcional a la diferencia entre las presiones de entrada y de salida ( $\Delta P$ ) e inversamente proporcional a la resistencia (R) del sistema ( $Q = \Delta P / R$ ). Aplicando la ley de Ohm a este sistema tenemos:

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

siendo  $P_v$  = la presión epiescleral y  $R$  = la resistencia de las vías de evacuación. Si aislamos la IOP obtenemos:

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

En fisiología ocular, en lugar de la resistencia se suele utilizar la "facilidad" (C) o conductancia que es el inverso de la resistencia. Así:

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

En el ojo humano, los parámetros medios encontrados son: IOP = 15-16 mmHg;  $P_v = 8-9$  mmHg;  $F_{in} = 2.5-2.8 \mu\text{l}/\text{min}$  y  $C = 0.3-0.4 \mu\text{l}/\text{min}/\text{mmHg}$ . La facilidad de evacuación uveoescleral ( $F_u$ ) no se ha determinado en humanos, pero el cálculo teórico da un valor de  $\sim 0.8 \mu\text{l}/\text{min}$ .

En diferentes especies animales, la IOP es relativamente similar a los valores en humanos. En el conejo, la IOP media es de 17 mmHg, en el gato de 16 mmHg y en primates la IOP es ligeramente inferior, alrededor de 12-13 mmHg. En bovinos, la IOP se ha establecido en unos 18 mmHg.

La medida de la IOP se realiza mediante tonometría de aplanación o tonografía de indentación. En la tonografía de aplanación se mide la fuerza necesaria para aplanar la córnea. Ya que la presión se define como la fuerza por unidad de área, la medida de la presión puede realizarse con relativa facilidad. La tonometría de indentación se basa en la medida del grado de indentación de la córnea mediante una sonda metálica pulida con un peso conocido contenida en un émbolo cilíndrico (Hart, 1994).

En humanos, la facilidad de evacuación se suele determinar mediante la tonografía, mientras que en estudios experimentales, se suele utilizar el método de Bány (Bány, 1964). Este método, consiste en canular la cámara anterior con dos agujas. Una se utiliza para medir la IOP y la otra se conecta a un reservorio, el peso del cual se registra continuamente. Se realiza una medida de la IOP con la conexión al reservorio cerrada. Después se eleva para provocar una pequeña entrada de líquido del reservorio hacia la cámara anterior y por tanto un pequeño incremento en la IOP. Este nuevo estado se deja estabilizar durante un tiempo y se eleva el reservorio 10 cm hasta que se estabiliza la IOP medida. La facilidad se calcula mediante la diferencia entre el flujo de entrada de medio del reservorio (proporcional a la disminución de peso del reservorio) en cada uno de los dos niveles dividido por la diferencia de presiones entre

los dos niveles. Esta maniobra provoca una ligera disminución de la producción del humor acuoso (pseudofacilidad) que se corrige restando, a la facilidad de evacuación determinada,  $0.02 \mu\text{l}/\text{min}/\text{mmHg}$ .

#### 1.4. Regulación de la presión intraocular

Los valores de la IOP varían según ciertos parámetros como la presión sanguínea o la osmolaridad del plasma, pero los factores que más influyen son la formación y la evacuación del humor acuoso. El equilibrio entre estos dos parámetros mantiene la IOP estable en un cierto rango (Davson, 1984). Por este motivo, la regulación de la formación y de la evacuación del humor acuoso son los determinantes más importantes para el mantenimiento de la IOP.

En lo que se refiere a la *formación del humor acuoso*, el flujo sanguíneo del epitelio ciliar es un factor crítico que determina la disponibilidad de sustancias y de fluidos para la secreción de humor acuoso. Modificaciones en el flujo sanguíneo por el sistema nervioso, pueden dar como consecuencia variaciones en la tasa de humor acuoso secretado por el epitelio ciliar. La barrera sangre-humor acuoso, estructura de los procesos ciliares que marca la separación entre la sangre y el humor acuoso, también tiene un papel importante en la regulación del paso de solutos de la sangre al humor acuoso. Si por algún motivo se lesiona esta barrera, se pueden producir filtrados de sustancias que normalmente no están presentes como neurotransmisores (ex: acetilcolina) o autacoides (ex: prostaglandinas) (Bito, 1984).

El ojo está ricamente inervado por el sistema nervioso simpático y parasimpático. La inervación simpática proviene del ganglio cervical superior y la mayoría de las fibras se dirigen hacia el iris y los vasos uveales, pero hay fibras que inervan los procesos ciliares (Stone y Kuwayama, 1989). Los datos sobre los efectos directos de la estimulación de este sistema son escasos y principalmente se han descrito los efectos de agonistas y antagonistas adrenérgicos sobre la producción del humor acuoso. Los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (Isoproterenol, terbutalina) estimulan la formación de humor acuoso en monos dormidos (Bill, 1970; Gharagozloo et al 1988; Stone y Kuwayama, 1989) mientras que los agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos (clonidina, apraclonidina) la reducen (Lee et al, 1984a). En individuos despiertos, los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos no tienen efecto, pero si los antagonistas (timolol) que reducen la formación de humor acuoso (Topper y Brubaker, 1985). Se cree que este efecto es debido a la existencia de un nivel de estimulación

basal de AMPc en los procesos ciliares. Durante la vigilia el sistema puede ser inhibido por el timolol pero no es posible su sobrestimulación. Durante el sueño, el sistema no está estimulado, pudiéndose estimular con agonistas.

La inervación parasimpática llega al ojo a través del nervio oculomotor y de los nervios faciales (Stone y Kuwayama, 1989). Aunque la estimulación del nervio oculomotor incrementa la formación del humor acuoso en conejos y gatos (Uusitalo, 1972; Macri y Cevario, 1975) los efectos no son claros debido a que paralelamente se modifica la circulación sanguínea de la úvea. La estimulación del nervio facial incrementa la IOP, mientras que el bloqueo del ganglio pterigopalatino produce el efecto contrario (Nilsson, 1986). Las fibras postgangliónares contienen acetilcolina y el neuropeptido VIP (péptido intestinal vasoactivo). Se cree que este último se libera tras la estimulación del nervio facial favoreciendo la formación de humor acuoso. Los efectos de agonistas muscarínicos sobre la formación de humor acuoso son contradictorios (Kaufman, 1984) y aunque se han detectado receptores muscarínicos en los procesos ciliares, la función de estos no se ha estudiado con detalle.

El otro factor importante en la regulación de la IOP, la evacuación del humor acuoso, se desarrolla en los próximos puntos de la introducción.

## **1.5. Alteraciones de la presión intraocular**

La IOP está sujeta a variaciones durante el día y las estaciones como se ha explicado en apartados anteriores. Estas variaciones de la IOP no tienen carácter patológico, pero cuando ésta se eleva por encima de ciertos valores, puede derivar en un estado patológico importante: el glaucoma.

### **1.5.1. Glaucoma**

Habitualmente pensamos en el *Glaucoma* como una única patología, pero en realidad este nombre hace referencia a un grupo de patologías en las que la IOP está suficientemente elevada para afectar a las estructuras sensoriales, lo que deriva en una pérdida de agudeza visual que puede llevar a la ceguera completa (Johnson y Brubaker, 1986; Kanski, 1996).

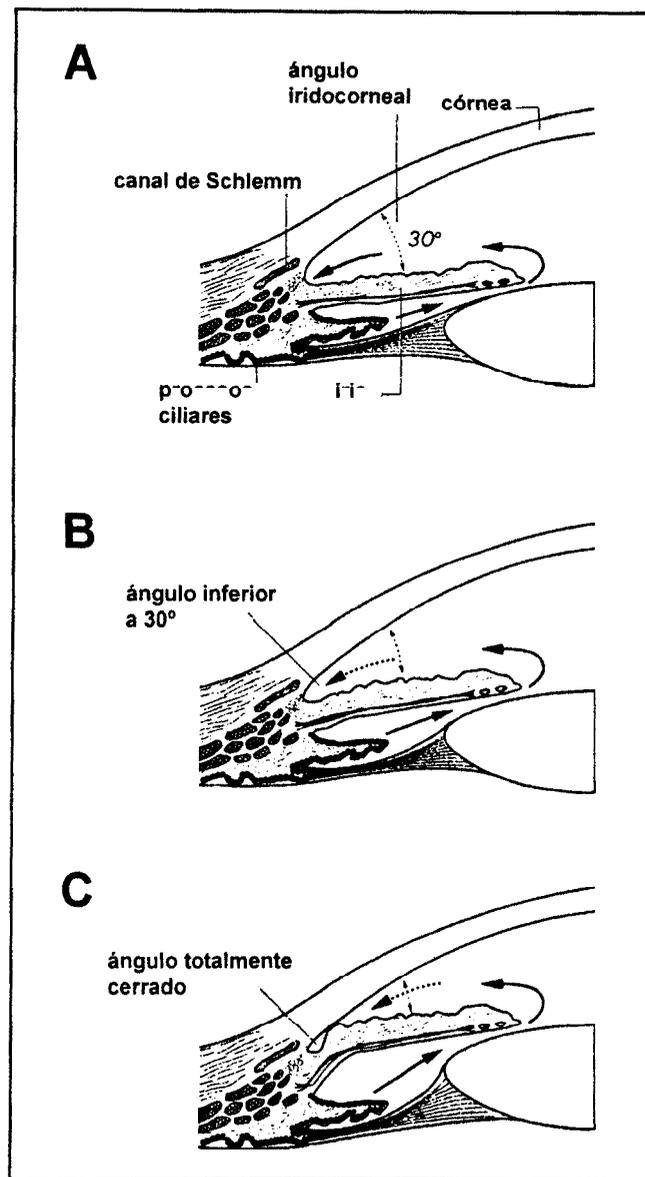
Como se mencionó anteriormente, la presión interna del ojo viene dada por el volumen

de los elementos que contiene. El ojo sólo puede modificar y controlar el volumen de uno de estos componentes internos: el humor acuoso. Así, cuando se produce alguna anomalía que incrementa el volumen de humor acuoso, éste aumenta dando como a resultado un glaucoma.

El glaucoma es una patología frecuente, sobretodo a partir de los 40 años, afectando entre un 1 y un 4% de la población y está considerada una de las principales causas de ceguera en la edad adulta.

En primer lugar, los diferentes tipos de glaucoma se clasifican como de *ángulo abierto* o de *ángulo cerrado* según la forma del ángulo iridocorneal (Fig. 1.9). El ángulo tiene un aspecto aparentemente normal en el primer caso y es más pequeño (más cerrado) en el segundo. Además, dependiendo de la ausencia o presencia de factores asociados que contribuyan al aumento de la IOP, el glaucoma puede ser *primario* o *secundario*. Si utilizamos la edad del individuo para clasificar los tipos de glaucoma tenemos glaucomas *congénitos*, *infantiles*, *juveniles* o *adultos* (Kanski, 1996).

Como consecuencia del incremento de la IOP, se producen una serie de manifestaciones: se alteran los medios refractantes del ojo que generan síntomas como visión borrosa o aureolas de colores, se puede producir una congestión vascular que produce un enrojecimiento del ojo, pero el efecto más importante de esta elevación de la IOP, es la compresión que sufre la retina, la capa sensorial del ojo, así como la papila óptica. Debido a esta compresión, se altera transitoriamente la función de los somas de las células nerviosas y de las fibras del nervio óptico, lesionándose de manera irreversible. Normalmente, se empieza a perder visión por el campo visual periférico que se va extendiendo hasta perder la capacidad visual en todo el campo (ceguera completa), y de manera irreversible (Armaly, 1973; Johnson y Brubaker, 1986).



**Fig. 1.9** Estructura del ángulo iridocorneal en diferentes tipos de glaucoma. **A:** Glaucoma de ángulo abierto: la morfología del ángulo iridocorneal es completamente normal. **B:** Glaucoma crónico de ángulo cerrado: el ángulo es mas pequeño que en condiciones normales. **C:** Glaucoma agudo de ángulo cerrado: el ángulo está bloqueado por el iris.

### 1.5.1.1 Glaucoma primario de ángulo cerrado

Dentro de los glaucomas de ángulo cerrado se incluyen un conjunto de patologías agudas y crónicas en las que hay una obstrucción temporal o permanente del drenaje a través de la red trabecular por el iris, lo que resulta en una disminución de la evacuación del humor acuoso y, por lo tanto, un aumento de la IOP (Skuta, 1994) (Fig. 1.9). El glaucoma primario de ángulo cerrado es entre 4 y 10 veces menos frecuente que el glaucoma primario de ángulo abierto, afectando a 1 de cada 1000 individuos mayores de 40 años y tiene un componente hereditario según la profundidad del ángulo de la cámara anterior. La aparición de este tipo de glaucoma está asociado a multitud de parámetros como la raza (menos frecuente en la raza negra), el sexo (más frecuente en mujeres que en hombres, 4:1), la hipermetropía (más frecuente) y la edad (más frecuente en personas mayores) (Skuta, 1994). La obstrucción del ángulo por parte del iris se puede producir por la exposición del ojo a luz tenue, alteraciones emocionales con estimulación simpática, simpaticomiméticos y anticolinérgicos que provocan la dilatación de la pupila.

### 1.5.1.2 Glaucoma primario de ángulo abierto

El glaucoma primario de ángulo abierto es el tipo de glaucoma más frecuente, presentándose en 1 de cada 200 individuos mayores de 40 años, y muchas veces de manera bilateral (en ambos ojos). En países como el Reino Unido y Estados Unidos, se considera que es el causante del 20% de los casos de ceguera (Wilensky, 1994; Kanski, 1996). Afecta a los dos sexos por igual y tiene un importante componente hereditario, probablemente multifactorial. En este tipo de glaucoma, las estructuras del ángulo iridocorneal son aparentemente normales, pero la IOP está aumentada de manera patológica por encima de 21 mmHg (Fig. 1.9). La causa de la elevación de la IOP es una disminución en la evacuación del humor acuoso, debido a algún tipo de problema a nivel de la trabécula cribiforme o del endotelio del canal de Schlemm. La última característica que se encuentra habitualmente es una excavación glaucomatosa a nivel de la papila óptica y pérdida en el campo visual (Kanski, 1996). Los principales factores de riesgo para la aparición de un glaucoma de ángulo abierto son: la IOP elevada, la papila óptica grande, la raza (mayor en la raza negra y oriental), la edad (más frecuente en edades avanzadas), la historia familiar, patologías sistémicas (*diabetes mellitus*, hipertensión arterial), síndromes oculares exfoliativos o pigmentarios y miopía.

En el glaucoma de ángulo abierto, se han encontrado a nivel histológico algunas modificaciones en la estructura de la red trabecular y del endotelio del canal de Schlemm. En trabeculotomías de ojos con glaucoma de ángulo abierto se han encontrado agrupaciones de material extracelular en la zona cribiforme que se depositan alrededor de las fibrillas de las láminas de tejido trabecular. Estos depósitos provocan que los espacios entre las láminas de tejido trabecular sean más pequeños, por lo que el paso del humor acuoso está dificultado (Lütjen-Drecoll y Rohen, 1994b). Depósitos de material parecidos, se han encontrado en las paredes del canal de Schlemm y también en la parte anterior del músculo ciliar. En algunos otros casos de glaucoma de ángulo abierto, la obstrucción de los espacios de la red trabecular son debidos a la acumulación de otro tipo de sustancias como material de pseudoexfoliación, moléculas de pigmento o material del cristalino. Cabe destacar que en los ojos con este tipo de glaucoma hay una pérdida de células endoteliales trabeculares mayor que en ojos normales de la misma edad. Esta pérdida va acompañada de una delgadez de las láminas de tejido trabecular uveal y corneoescleral por acumulación de colágeno y depósitos de material fibrilar y como consecuencia los espacios entre fibrillas se obstruyen dificultando el paso del humor acuoso.

### 1.5.1.3 Farmacología en el tratamiento del glaucoma

Los fármacos utilizados en el tratamiento del glaucoma buscan reducir la IOP mediante dos posibles efectos, la reducción de la formación de humor acuoso o bien el aumento de la evacuación del humor acuoso. Para este fin, se utilizan fármacos colinérgicos, inhibidores de la anhidrasa carbónica, prostaglandinas, agentes hiperosmóticos, inhibidores de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , fármacos activos en el citoesqueleto y adrenérgicos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 *Fármacos antiglaucomatosos*

Grupo	tejido diana	acción	resultado
<i>Colinérgicos</i>			
pilocarpina, carbachol (directos)	músculo ciliar	contracción	↑ F <sub>trab</sub>
fisostigmina, ecotipoato (indirectos)	músculo ciliar	contracción	↑ F <sub>trab</sub>
<i>Inhibidores de la Anhidrasa carbónica (A.C.)</i>			
acetazolamida, mezolamida, doclorfenamida, dorzolamida	epitelio ciliar	inhib. A.C.	↓ F <sub>in</sub>
<i>Prostaglandinas</i>			
PGF <sub>2α</sub> , latanoprost	músculo ciliar	??	↑ F <sub>u</sub>
<i>Agentes hiperosmóticos</i>			
glicerol, manitol, isosorbide	sistémico	↑ osmolaridad plasma	↑ Absorción. H <sub>2</sub> O vasos oculares
<i>Inhibidores ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup></i>			
ouabaina	epitelio ciliar	inhib. ATPasa	↓ F <sub>in</sub>
<i>Fármacos activos en el citoesqueleto</i>			
EDTA, EGTA	red trabecular, endotelio c. Schlemm	uniones intercelulares	↑ F <sub>trab</sub>
citocalasina B y D	red trabecular, endotelio c. Schlemm	depimerización actina	↑ F <sub>trab</sub>
ácido etacrínico	red trabecular, endotelio c. Schlemm	unión grupos sulfidrílo	↑ F <sub>trab</sub>
<i>Adrenérgicos</i>			
agonistas α <sub>2</sub> (brimonidina, aproclonidina, clonidina)	epitelio ciliar	↓ AMPc	↓ F <sub>in</sub>
agonistas no selectivos (epinefrina, dipivefrina)	red trabecular	??	↑ F <sub>trab</sub> , ↑ F <sub>u</sub>
antagonistas β (timolol, levobunolol, metipranolol, carteolol, betaxolo)	epitelio ciliar	↓ AMPc	↓ F <sub>in</sub>

Abreviaciones: F<sub>in</sub> = formación del humor acuoso; F<sub>trab</sub> = evacuación del humor acuoso a través de la vía trabecular (convencional); F<sub>u</sub> = evacuación del humor acuoso a través de la vía uveoescleral

### *Colinérgicos:*

Actualmente, se acepta que los agonistas colinérgicos utilizados reducen la IOP aumentando la evacuación del humor acuoso por la vía convencional (red trabecular). Este efecto se asocia a la contracción del músculo ciliar por parte de estos fármacos, cosa que "aumenta" los espacios intertrabeculares y por tanto la evacuación del humor acuoso (Kaufman y Bárány, 1976; Zimmerman, 1981). Este efecto es paralelo a una disminución de la evacuación a través de la vía uveoescleral, y aunque contrarresta al anterior, el resultado total es un aumento de la evacuación. Los fármacos colinérgicos más utilizados son la pilocarpina y el carbachol (colinérgicos directos) o los inhibidores de la colinesterasa (fisostigmina y ecotiopato; colinérgicos indirectos) (Hurvitz et al., 1991; Kaufman y Mittag, 1994). Los principales efectos secundarios de los colinérgicos son problemas de acomodación debido a la contracción del músculo ciliar, lo que produce una miopía asociada. Además se asocian a una mayor incidencia de aparición de cataratas.

### *Inhibidores de la anhidrasa carbónica*

Los inhibidores de la anhidrasa carbónica se utilizan por su efecto sobre la producción de humor acuoso. Este enzima participa en el epitelio ciliar en la secreción del humor acuoso, y su inhibición supone una disminución de su secreción (40-50%), por lo que se produce un descenso en la IOP (Kaufman y Mittag, 1994). Los fármacos más utilizados en este grupo son la acetazolamida, metazolamida, doclorfenamida y dorzolamida. Inicialmente este grupo de fármacos se utilizaba por vía sistémica, debido a su mala farmacocinética en solución tópica, lo que producía numerosos efectos secundarios en otros tejidos (eritrocitos, riñón,...). Actualmente, se ha desarrollado en forma tópica, colirios, lo que evita muchos de los efectos secundarios sobre otros tejidos

### *Prostaglandinas*

Actualmente, las prostaglandinas y especialmente los análogos de la  $PGF_{2\alpha}$  son los fármacos hipotensores más potentes que se conocen (Crawford y Kaufman, 1991). El mecanismo de acción consiste en un aumento de la evacuación por la vía uveoescleral sin apenas modificar la formación de humor acuoso (Crawford et al., 1987) ni la evacuación a través de la vía convencional (Gabelt y Kaufman, 1990). No se conoce con exactitud el mecanismo

celular de actuación, pero se cree que actúa disminuyendo los espacios entre las fibras musculares del músculo ciliar, y provoca la lisis enzimática del tejido conectivo intermuscular. La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  se administra como profármaco en forma de isopropilester a bajas concentraciones.

#### *Agentes hiperosmóticos*

El mecanismo de actuación de este grupo farmacológico es ligeramente diferente de los otros grupos. En este caso, la disminución en la IOP se consigue tras crear una diferencia osmótica (30 mOsm) entre la sangre y el humor vítreo, provocando que parte del agua de esta estructura fluya hacia los vasos oculares (Kaufman y Mittag, 1994). Este efecto es rápido (30 minutos) y se puede llegar a disminuciones de la IOP de hasta 40-50 mmHg, por lo que se suelen utilizar en ataques agudos de glaucoma de ángulo cerrado. Su utilización es limitada debido a que sus efectos en otras estructuras del organismo derivados del aumento en la osmolaridad plasmática son importantes. Los compuestos más utilizados para este fin son el glicerol, el manitol y el isosorbide.

#### *Inhibidores de la ATPasa $\text{Na}^+/\text{K}^+$*

Este enzima que se encuentra en gran concentración en el epitelio ciliar, tiene como función principal el aporte de energía necesario para el transporte de  $\text{Na}^+$  hacia la cámara posterior, lo cual va acompañado de un movimiento pasivo de agua que constituye la base para la secreción del humor acuoso (Kaufman y Mittag, 1994). La inhibición de este enzima produce una disminución en la secreción de humor acuoso con la consecuente reducción de la IOP. En este caso también se pueden producir algunos efectos secundarios como edema corneal y efectos cardíacos.

#### *Fármacos activos en el citoesqueleto*

Este grupo de fármacos actúan a nivel de la trabécula cribiforme o del endotelio del canal mediante la alteración de las uniones entre las células (EDTA, EGTA), inhibiendo la polimerización de los filamentos de actina (Citocalasina B y D) o uniendo grupos sulfidrilos en la membrana celular (ácido etacrínico). Mediante estos procesos, se producen cambios en el citoesqueleto que comportan un aumento de la evacuación del humor acuoso por la vía convencional. De momento, estos fármacos todavía no se han desarrollado para la práctica

clínica (Kaufman y Mittag, 1994).

#### 1.5.1.3.1. Adrenérgicos

Los efectos de los fármacos de este grupo son múltiples debido a la diversidad de los receptores que pueden activar y a la distribución de los receptores en los diferentes tejidos. Desde el punto de vista clínico, los fármacos más interesantes son los agonistas  $\alpha_2$  y  $\beta_2$ . Los receptores del tipo  $\alpha_{2A}$  se han encontrado en diferentes tejidos oculares como la retina, iris y epitelio ciliar (Bylund et al., 1997) así como en la red trabecular (Stamer et al., 1996). Los agonistas  $\alpha_2$  (apraclonidina, clonidina, brimonidina) inhiben la secreción del humor acuoso (35-40%) en humanos (Gharagozloo et al., 1989) mientras que los estudios tonográficos hasta la fecha no mostraron grandes cambios en la facilidad de evacuación (Robin, 1988). Los receptores adrenérgicos  $\beta_2$  se han encontrado en el epitelio ciliar (Polansky, 1990) en el músculo ciliar (Van Alphen et al., 1965) y en la red trabecular (Jampel et al., 1987) de manera que los agonistas de estos receptores tienen efectos diversos sobre el humor acuoso. Los agonistas no selectivos más utilizados en el glaucoma son la epinefrina (adrenalina) y el profármaco dipivefrina. La epinefrina incrementa la evacuación del humor acuoso por la vía convencional en conejos, primates y humanos, probablemente a través de la estimulación del sistema del AMPc (Kaufman, 1989), aunque el mecanismo exacto no se conoce todavía. Paralelamente, la epinefrina incrementa la evacuación a través de la vía uveoescleral en primates y humanos (Bill, 1969; Townsend y Brubaker, 1980). Inicialmente, se creía que este efecto era debido a la relajación del músculo ciliar a través de la síntesis de AMPc, pero actualmente se baraja la hipótesis de la liberación local de prostaglandinas por parte de la epinefrina. Finalmente, la epinefrina estimula la secreción de humor acuoso en el epitelio ciliar (Schneider y Brubaker, 1990), lo que constituye un efecto contrario al deseado. Esta estimulación de la secreción de humor acuoso rápidamente se desensibiliza, con lo que el resultado neto es una disminución de la IOP por el incremento en la evacuación.

Otro tipo de fármacos utilizados dentro de este grupo son los antagonistas adrenérgicos, y entre ellos, los antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Estos actúan a nivel del epitelio ciliar inhibiendo la secreción de humor acuoso (efecto contrario al de la epinefrina) en un ~30% en humanos despiertos, mientras que no son efectivos durante el sueño (Topper y Brubaker, 1985). Este tipo de antagonistas no modifican la evacuación del humor acuoso por la vía convencional (Robinson

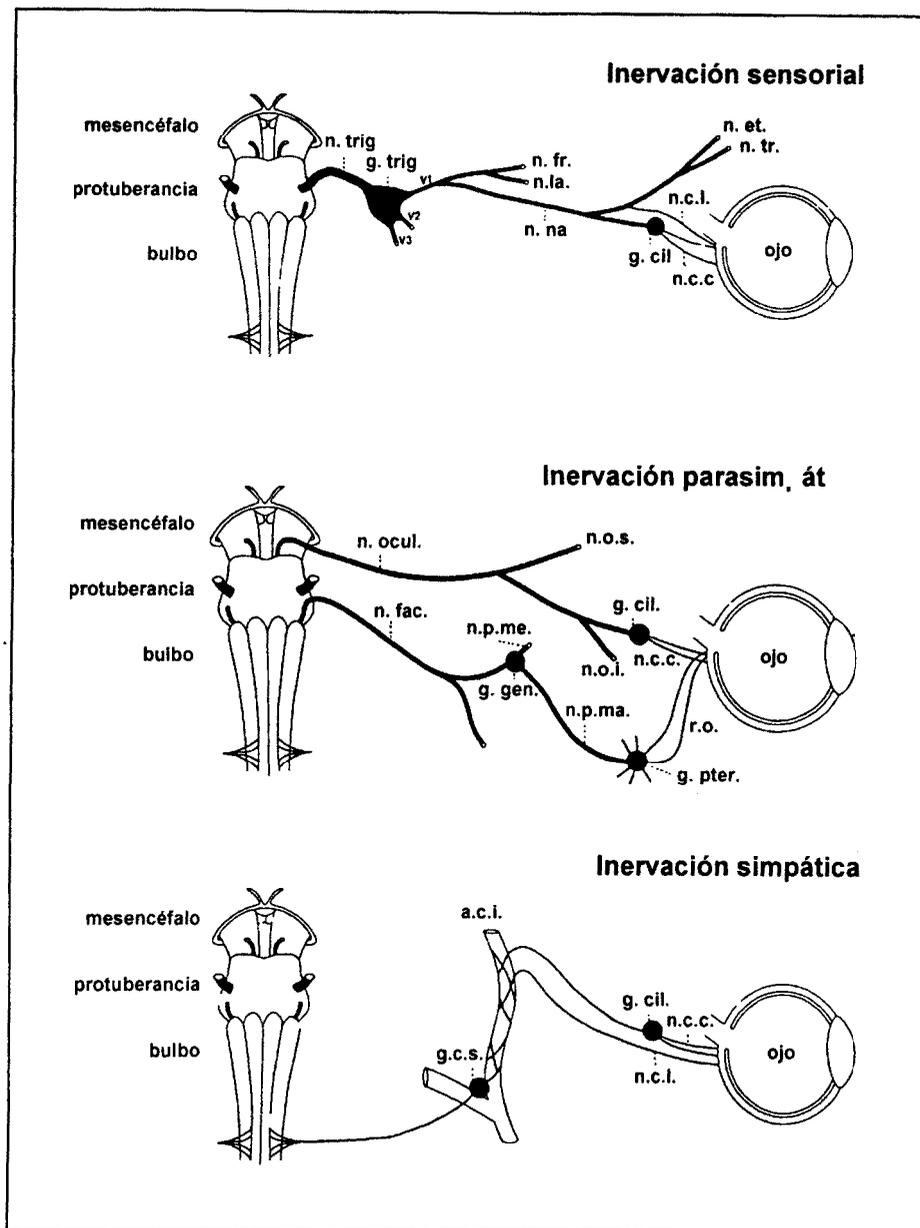
y Kaufman, 1990), mientras que tienen un ligero efecto inhibitor sobre la evacuación por la vía uveoescleral por contracción del músculo ciliar (Gilmartin et al., 1984). Este último efecto no es lo suficientemente importante, predominando la inhibición de la secreción del humor acuoso. Dentro de este grupo, los antagonistas más utilizados son el timolol, levobunolol, metipranolol y carteolol (antagonistas no selectivos  $\beta_1/\beta_2$ ) y el betaxolol (antagonista selectivo  $\beta_2$ ).

## **1.6. Inervación de las estructuras de evacuación del humor acuoso e influencias sobre la presión intraocular**

El sistema nervioso periférico se divide en el sistema somático y el sistema autónomo. Mientras que el primero incluye la inervación sensorial (no visceral) y la inervación motora, el sistema autónomo incluye la inervación simpática, parasimpática y entérica.

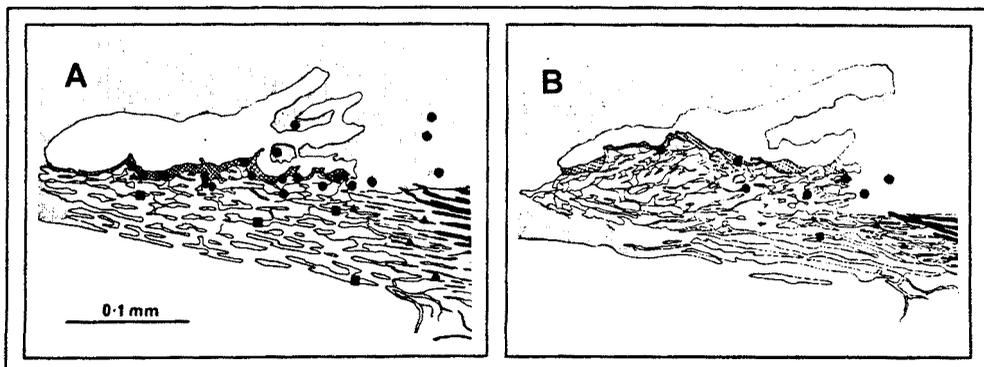
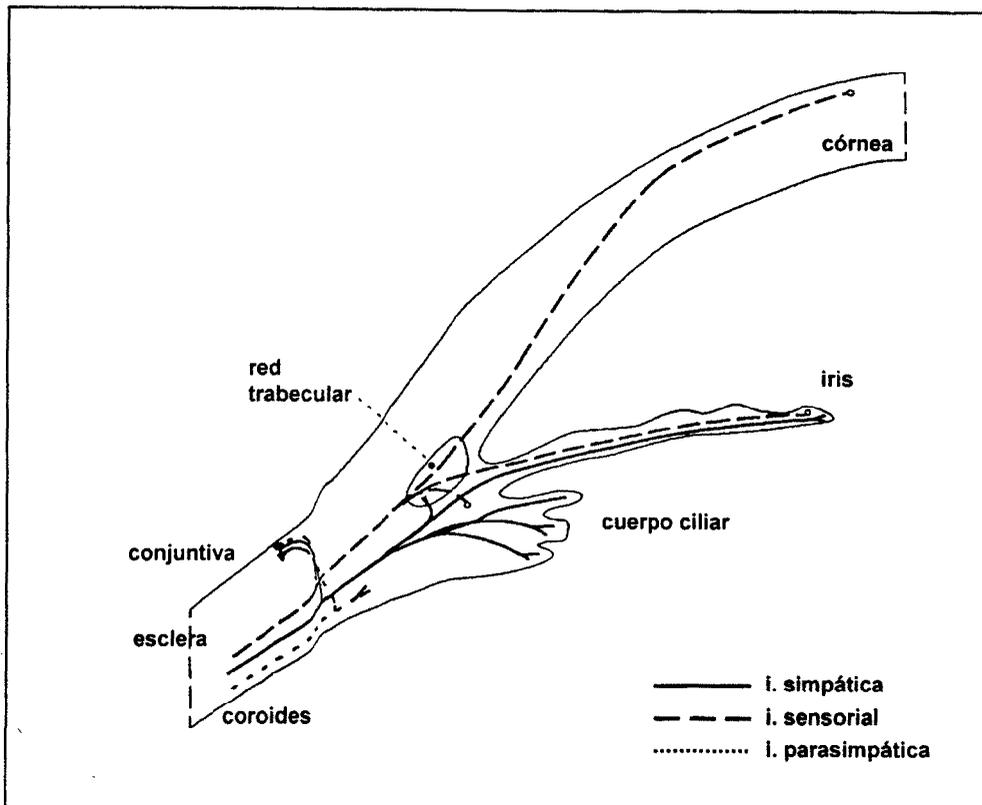
### **1.6.1. Inervación sensorial**

En el ojo, la inervación *sensorial* proviene del nervio trigémino (Panneton y Burton, 1981; Marfurt, 1981; Stone y Kuwayama, 1989; Ten Tusscher et al., 1994) (Fig. 1.10). Los somas de las neuronas sensoriales se encuentran en el ganglio trigémino de donde parten tres ramas, la oftálmica, la maxilar y la mandibular. A su vez, la rama oftálmica se divide en los nervios lacrimal, frontal y nasociliar, siendo este último el que inerva las estructuras oculares a través de los nervios ciliares largos y los nervios ciliares cortos (que parten del ganglio ciliar) (Ten Tusscher et al., 1994) (Fig. 1.10 y 1.11). Tanto en la red trabecular como en el endotelio del canal de Schlemm se han encontrado fibras sensoriales que provienen del nervio oftálmico (Ruskell, 1976; Bergmanson, 1977) preferentemente en la trabécula cribiforme y la zona adyacente a la pared interna del canal, así como en el espolón escleral. Las terminaciones sensoriales encontradas no parecen tener ningún tipo de estructura especializada y serían terminaciones libres (Ruskell, 1976). Estudios inmunohistoquímicos han demostrado la presencia, en estas estructuras, de numerosas fibras nerviosas que contienen neuropéptidos característicos de fibras sensoriales. En este sentido se han descrito en humanos y primates fibras inmunoreactivas a sustancia P (Laties et al., 1981) y CGRP (Stone y McGlenn, 1988), y en otras especies animales a CCK (Stone, 1984) y galanina (Stone et al., 1988).



**Fig. 1.10** Inervación periférica ocular. Modificado de Ten Tusch et al., 1994. n.trig.=nervio trigémino; g.trig.=ganglio trigémino; V<sub>1</sub>=nervio oftálmico; V<sub>2</sub>=nervio maxilar; V<sub>3</sub>=nervio mandibular; n.fr.=nervio frontal; n.la.=nervio lagrimal; n.na.=nervio nasociliar; n.et.=nervio etmoidal posterior; n.tr.=nervio infratroclear; n.c.l.=nervios ciliares largos; g.cil.=ganglio ciliar; n.c.c.=nervios ciliares cortos; n.ocul.=nervio oculomotor; n.fac.=nervio facial; n.o.s.=nervio oculomotor superior; n.o.i.=nervio oculomotor inferior; n.p.me.=nervio petroso menor; n.p.ma.=nervio petroso mayor; g.gen.=ganglio geniculado; r.o.=ramas oculares; g.pter.=ganglio pterigopalatino; g.c.s.=ganglio cervical superior; a.c.i.=arteria carótida interna.

Algunos autores han registrado la respuesta de los nervios ciliares tras inducir cambios experimentales en la IOP con el fin de estudiar si el sistema sensorial es capaz de detectar los cambios en la IOP (von Sallmann et al., 1958; Lele y Grimes, 1960; Perkins, 1961; Belmonte et al., 1971; Zuazo et al., 1986). En general, disminuciones de la IOP reducen la actividad espontánea de los nervios ciliares mientras que incrementos en la IOP provocan un aumento rápido en la actividad nerviosa y una posterior adaptación a niveles de actividad espontánea mayores. Hasta la fecha no se han detectado estructuras que actúen como baroreceptores en el ojo, aunque se han encontrado terminaciones sensoriales que transmiten los estímulos mecánicos, térmicos y químicos (Belmonte y Giraldez, 1981; Mintenig et al., 1995; Belmonte et al., 1997). Los mecanorreceptores sensoriales podrían actuar en este sentido, pero todavía no se ha demostrado su implicación en la regulación de la IOP. Por otra parte, la estimulación del nervio trigémino produce una elevación de la IOP (Perkins, 1957; Stjernschantz et al., 1979), probablemente debida a la liberación de neuropeptidos y prostaglandinas (inflamación neurogénica). Del mismo modo, la sección del nervio trigémino produce un incremento rápido de la IOP que retorna a niveles normales al cabo de una semana aunque la facilidad de evacuación permanece elevada (Palkama et al., 1974; Stjernschantz et al., 1979).



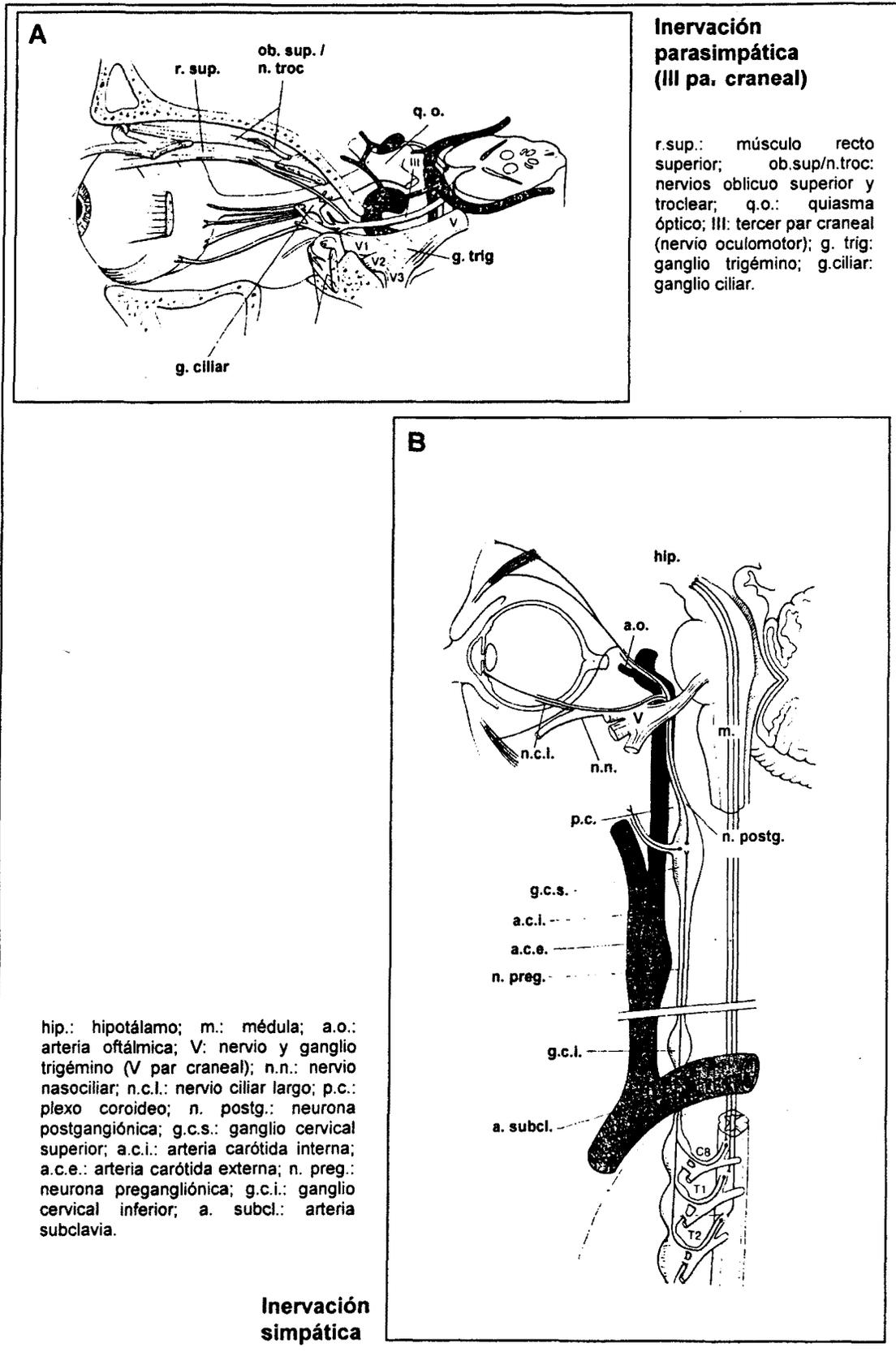
**Fig. 1.11** *Parte superior:* Terminaciones nerviosas periféricas hacia las diferentes estructuras del ángulo iridocorneal. Modificado de Ten Tuschler et al., 1994. *Parte inferior:* Terminaciones nerviosas identificadas en la red trabecular de dos monos (*Macaca mulatta*). **A:** Ejemplar con abundantes terminaciones nerviosas. **B:** Ejemplar con inervación escasa. Modificado de Ruskell, 1976.

### 1.6.2. Inervación parasimpática (colinérgica)

Parte de la inervación *parasimpática* del globo ocular tiene su origen en el núcleo de Edinger-Westphal (situado en el tronco del encéfalo) de donde parte el nervio oculomotor (Reiner et al., 1983; Ten Tusscher et al., 1994). Las fibras nerviosas parasimpáticas sinapsan en el ganglio ciliar y entran en el globo ocular a través de los nervios ciliares cortos (Ruskell y Griffiths, 1979) (Fig. 1.10; 1.12). El resto de fibras parasimpáticas del ojo parten de la protuberancia ventral por el nervio facial hacia el ganglio geniculado (Petroso). Desde aquí, las fibras del nervio petroso mayor sinapsan en el ganglio pterigopalatino y entran en el globo ocular a través de las ramas oculares (Ruskell, 1970; Ten Tusscher et al., 1994) (Fig. 1.10; 1.12). Tanto en la red trabecular como en el espolón escleral, se han encontrado fibras parasimpáticas procedentes del nervio oftálmico (Holland et al., 1957; Ruskell, 1976) así como fibras procedentes del ganglio pterigopalatino (Ruskell, 1976). Nomura y Smelser (1974) identificaron terminaciones colinérgicas en la parte posterior de la red trabecular, en la zona contigua a la inserción del músculo ciliar (Fig. 1.11). Paralelamente, en estudios histoquímicos se han detectado fibras con actividad acilcolinesterasa en estas zonas (Laties y Jacobowitz, 1964). Las fibras nerviosas que contienen VIP se asocian con fibras parasimpáticas (colinérgicas) en diferentes estructuras del organismo. De este modo, se han detectado fibras inmunoreactivas en el ángulo iridocorneal humano, de rata y de gato (Stone, 1986a) especialmente en la trabécula uveal.

Como se ha citado anteriormente, los agonistas muscarínicos disminuyen la IOP al aumentar la evacuación del humor acuoso. Su efecto es debido, preferentemente, a la contracción del músculo ciliar y no a un efecto directo sobre la red trabecular (Kaufman y Bárány, 1976; Zimmerman, 1981). Por otra parte, la estimulación del nervio oculomotor produce un aumento de la IOP por contracción de los músculos extraoculares (Greaves y Perkins, 1953), efecto que debe tenerse en cuenta al estudiar la dinámica del humor acuoso. Como se ha descrito anteriormente en otro apartado de este capítulo, la estimulación del nervio oculomotor incrementa la formación del humor acuoso que junto con el efecto anterior, produce un incremento en la IOP. La estimulación del nervio oculomotor a nivel preganglionar produce un incremento en la evacuación del humor acuoso en monos (Törnqvist, 1970), conejos (Uusitalo, 1972; Stjernschantz, 1976) y en ojos de gato enucleados y perfundidos (Macri y Cevario, 1975). Los diferentes resultados encontrados en numerosos estudios no han llegado a definir los mecanismos parasimpáticos sobre la IOP. De esta forma, la estimulación del ganglio ciliar en conejos provoca un incremento en la IOP (Schmerl y Steinberg, 1949), mientras que produce el

efecto contrario en gatos (Armaly, 1959a, b y c; Lele y Grimes, 1960). Otros estudios han mostrado disminuciones de la IOP tras la estimulación del nervio oculomotor a nivel preganglionar en conejos y gatos (Uusitalo, 1972; Macri y Cevario, 1975; Stjernschantz, 1976) pero este efecto no se encontró en primates (Törnqvist, 1970). En conejos, la extirpación del ganglio ciliar disminuye la IOP (Schmerl y Steinberg, 1949), mientras que la sección intracraneal o intraorbital del nervio preganglionar produjo efectos distintos sobre la IOP: disminución en conejos y perros (Thomas, 1964; Palkama et al., 1974), incremento en gatos simpatectomizados (Armaly, 1959a) e incremento inicial seguido de disminución en primates (Törnqvist, 1970). Por otra parte, la participación del nervio facial se ha evaluado en humanos tras su sección a nivel preganglionar, mostrando una disminución de la IOP (Golding-Wood, 1964). Se han encontrado efectos similares en monos, donde la sección del nervio facial o del ganglio pterigopalatino produce una disminución de la IOP (Ruskell, 1970). La estimulación de esta vía induce un moderado incremento de la IOP en gatos, conejos y monos (Gloster, 1961; Stjernschantz y Bill, 1980; Nilsson et al., 1985), pero es un efecto secundario a la vasodilatación que se produce a nivel intraocular.



**Fig. 1.12 A:** Inervación parasimpática procedente del III par craneal. **B:** Inervación simpática procedente del ganglio cervical superior. Modificado de Weinstein, 1994.

### 1.6.3. Inervación simpática (adrenérgica)

La inervación *simpática* del globo ocular procede del asta ipsilateral de la médula espinal (Palkama et al., 1986; Ten Tusscher et al., 1994) (Fig. 1.10; Fig. 1.12). Las fibras nerviosas llegan al ganglio cervical superior situado en la bifurcación de la arteria carótida. Las fibras simpáticas que parten del ganglio cervical superior forman un plexo alrededor de la arteria carótida interna y junto con la arteria oftálmica o junto con los nervios nasociliar y oculomotor llegan al ojo a través de los nervios ciliares largos y cortos (pasando por el ganglio ciliar) (Hara et al., 1982) (Fig. 1.10). En los diferentes estudios, la inervación adrenérgica (simpática; Fig. 1.11) de las estructuras del ángulo iridocorneal muestra variaciones según la especie (Ehinger, 1964; 1966a; 1966b; 1971; Laties y Jacobowitz, 1966). En monos y humanos, la inervación adrenérgica de la red trabecular se encuentra mayoritariamente en la trabécula iridouveal (Ehinger, 1971; Nomura y Smelser, 1974), aunque también se han hallado fibras en las zonas corneoescleral y cribiforme. La cantidad de estas fibras varía entre las diferentes especies de primates (Ruskell, 1976). En humanos, la presencia de inervación adrenérgica es mayor en individuos más jóvenes, mientras que no se ha encontrado inervación en individuos de más de 64 años de edad (Ehinger, 1971), por lo que se ha sugerido su implicación en la aparición de glaucoma. Alrededor de 1/3 de las terminaciones nerviosas encontradas en la red trabecular son adrenérgicas (Nomura y Smelser, 1974). Paralelamente, en conejos se han encontrado fibras nerviosas que muestran fluorescencia a catecolaminas en la red trabecular y en la zona adyacente al músculo ciliar (Laties y Jacobowitz, 1966). La inmunoreactividad para el Neuropeptido Y (NY), asociada a fibras adrenérgicas, es poco frecuente en la zona del ángulo iridocorneal en humanos y primates (Stone, 1986b; Stone et al., 1986), aunque se han encontrado fibras en la parte más posterior de la red trabecular.

La influencia del sistema nervioso simpático en la regulación de la IOP y en particular en la evacuación del humor acuoso se ha estudiado en experimentos de estimulación nerviosa y denervación. Los efectos simpáticos se han estudiado tras la estimulación del tronco nervioso o del ganglio cervical superior en diferentes especies. En perros y gatos, la estimulación del sistema simpático produce un incremento inicial en la IOP que posteriormente disminuye a niveles menores al valor basal (Henderson y Starling, 1904; Greaves y Perkins, 1952). En monos, aunque la estimulación a nivel preganglionar produce una disminución de la IOP debido a vasoconstricción intraocular, la evacuación del humor acuoso disminuye por un efecto directo sobre la red trabecular (Casey, 1966; Bill, 1970). También se han encontrado ligeros aumentos

de la evacuación a través de la red trabecular que podrían ser mediados por receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Bill, 1970). En conejos, se han obtenido resultados parecidos aunque en esta especie no se produce el incremento inicial en la IOP (Schmerl y Steinberg, 1949; Greaves y Perkins, 1952; Langham y Rosenthal, 1966; Paterson, 1966; Uusitalo, 1972; Belmonte et al., 1987a). De este modo, la estimulación del nervio cervical simpático (Greaves y Perkins, 1952; Langham y Rosenthal, 1966) o del ganglio cervical superior (Uusitalo, 1972; Palkama et al., 1974) disminuyen la IOP a través de la reducción en la formación del humor acuoso y la vasoconstricción uveal, pero los efectos sobre la evacuación del humor acuoso son escasos, encontrándose incrementos (Paterson, 1966), disminuciones (Uusitalo, 1972) o falta de efecto (Langham y Rosenthal, 1966). Los mayores incrementos de la evacuación del humor acuoso se han encontrado tras estimulación nerviosa simpática en animales tratados con cocaína, lo cual previene la recaptación de la norepinefrina liberada (Paterson, 1966). Por otra parte, la estimulación moderada y breve (2-3h) de los nervios cervicales simpáticos produce un aumento de la IOP en conejos anestesiados y en conejos no anestesiados (Gallar y Liu, 1993) por liberación de norepinefrina y NY. En cambio la estimulación sostenida (20h) a frecuencias menores no produce cambios significativos en la IOP (Belmonte et al., 1987b). En monos, la estimulación del nervio cervical simpático produce una disminución moderada de la evacuación del humor acuoso (Casey, 1966).

La sección de los nervios cervicales simpáticos (simpatectomía preganglionar) produce diferentes efectos sobre la IOP, tanto incrementos como disminuciones (Jaffe, 1948; Langham y Taylor, 1960a; Linnér y Prijot, 1957; Casey, 1966; Greaves y Perkins, 1952), por lo que no se ha llegado a conclusiones definitivas. La ganglionectomización del ganglio cervical superior produce una disminución progresiva de la IOP hasta las 24h posteriores para recuperar los valores basales tras 3-4 días (Linnér y Prijot, 1955; Lieb et al., 1958; Langham y Taylor, 1960b; Sears y Bárány, 1960; Treister y Bárány, 1970; Gual et al., 1989). Esta disminución de la IOP se asocia a un incremento de la evacuación del humor acuoso (Bárány, 1962; Langham y Taylor, 1960b; Sears y Bárány, 1960). Por otra parte, se han registrado cambios en la actividad de los nervios ciliares como consecuencia de cambios en el flujo sanguíneo ocular, lo que sugiere una modulación nerviosa del flujo sanguíneo ocular y de la presión intraocular (Gual y de Castro, 1985).

### 1.6.3.1. Receptores adrenérgicos

Se han descrito dos grandes familias de receptores adrenérgicos: los  $\alpha$ -adrenérgicos y los  $\beta$ -adrenérgicos (Ahlquist, 1948; Alexander y Peters, 1999). Dentro de cada familia, se han encontrado varios subtipos para los  $\alpha$  y los  $\beta$ .

Los receptores  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$  están relacionados con la activación de la proteína G de tipo  $G_{q/11}$  que se asocia, en la mayoría de células, a la activación de la fosfolipasa C (Morris y Malbon, 1999), produciendo diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato ( $IP_3$ ) (Tabla 1.2). La afinidad de estos receptores por norepinefrina (NE) y epinefrina (EPI) es diferente. El subtipo  $\alpha_{1A}$  es más selectivo para NE que para EPI, mientras que para los otros dos subtipos ( $\alpha_{1B}$  y  $\alpha_{1D}$ ) no hay diferencias en la selectividad para las dos sustancias. Dentro de la familia de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos encontramos también los  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$ . Estos tres subtipos están asociados a la activación de la proteína  $G_{i/o}$  que inhibe la síntesis de AMPc y pueden estimular la fosfolipasa C y el  $[Ca^{2+}]_i$ . En este caso, los tres tipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos tienen una mayor afinidad para la EPI que para la NE (Tabla 1.2).

En la familia de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos se han identificado 4 subtipos:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  (Tabla 1.2) (Alexander y Peters, 1999). En la mayoría de los tejidos, la estimulación de estos receptores se asocia a la activación de la proteína  $G_s$ , la cual estimula la síntesis de AMPc. El subtipo  $\beta_3$  también se ha encontrado asociado a la proteína  $G_{i/o}$  (Morris y Malbon, 1999). La selectividad de estos receptores para NE y EPI varía para cada uno de ellos. Los subtipos  $\beta_1$  y  $\beta_4$  tienen mayor selectividad para NE que para EPI, mientras que es al revés para los  $\beta_2$ . Finalmente para los receptores  $\beta_3$  no hay diferencias entre la selectividad a las dos sustancias (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Receptores adrenérgicos

Subtipos	orden de potencia	acoplados	acción celular
<i><math>\alpha_1</math>-adrenérgicos</i>			
$\alpha_{1A}$	NE $\geq$ EPI	G <sub>q/11</sub>	$\uparrow$ IP <sub>3</sub> , DAG, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
$\alpha_{1B}$	NE = EPI	G <sub>q/11</sub>	$\uparrow$ IP <sub>3</sub> , DAG, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
$\alpha_{1D}$	NE = EPI	G <sub>q/11</sub>	$\uparrow$ IP <sub>3</sub> , DAG, [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>
<i><math>\alpha_2</math>-adrenérgicos</i>			
$\alpha_{2A}$	EPI > NE	G <sub>i/o</sub>	$\downarrow$ AMPc
$\alpha_{2B}$	EPI > NE	G <sub>i/o</sub>	$\downarrow$ AMPc
$\alpha_{2C}$	EPI > NE	G <sub>i/o</sub>	$\downarrow$ AMPc
<i><math>\beta</math>-adrenérgicos</i>			
$\beta_1$	NE > EPI	G <sub>s</sub>	$\uparrow$ AMPc
$\beta_2$	EPI > NE	G <sub>s</sub>	$\uparrow$ AMPc
$\beta_3$	NE = EPI	G <sub>s</sub> (G <sub>i/o</sub> )	$\uparrow$ AMPc / $\downarrow$ AMPc
$\beta_4$	NE $\geq$ EPI	G <sub>s</sub>	$\uparrow$ AMPc

Abreviaciones: NE=norepinefrina; EPI=epinefrina; IP<sub>3</sub>=inositol trifosfato; DAG=diacilglicerol; AMPc=adenosin monofosfato ciclico. (Alexander y Peters, 1999).

En las estructuras que participan en la regulación de la formación y en la evacuación del humor acuoso, la distribución de los receptores adrenérgicos es sustancialmente diferente. Tanto en los procesos ciliares humanos como de diferentes animales, se han identificado preferentemente receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (Nathanson, 1980; Mittag y Tormay, 1985; Wax y Molinoff, 1987) y receptores  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$  (Mittag y Tormay, 1985; Huang et al., 1995; Jin et al., 1994; Wikberg-Matsson et al., 1996). La distribución de estos receptores varía según la especie estudiada, encontrándose los tres subtipos de receptores  $\alpha_2$  en el cuerpo ciliar de conejos mientras que en humanos solo se detectaron los subtipos  $\alpha_{2B}$  y  $\alpha_{2C}$  (Huang et al., 1995) y en cerdos el subtipo  $\alpha_{2A}$  (Wikberg-Matsson et al., 1996).

En las estructuras de evacuación del humor acuoso, y concretamente en la red trabecular, se han identificado receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos tanto en el tejido *in situ* (Jampel et al., 1987; Elena et al., 1990) como en células trabeculares en cultivo (Wax et al., 1989). Los receptores  $\alpha_{2A}$  han sido identificados en células trabeculares humanas en cultivo (Stamer et al., 1996). No se han identificado específicamente los receptores de tipo  $\alpha_1$  en las células trabeculares.

La participación simpática en la regulación de las vías de evacuación del humor acuoso se ha estudiado mediante la administración de agonistas y antagonistas adrenérgicos en animales *in vivo* o en preparaciones *in vitro*. La utilización de la EPI como agonista no selectivo de los receptores adrenérgicos ha mostrado efectos diversos en diferentes especies. De este modo, el efecto hipotensor ( $\downarrow$  IOP) de esta sustancia se ha atribuido a la estimulación de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos en la red trabecular y a la síntesis de AMPc (Bill, 1969; 1970; Sears y Neufeld, 1975; Kaufman y Bárány, 1981; Potter, 1981; Camras et al., 1985; Allen y Epstein, 1986; Robinson y Kaufman, 1990; Erickson y Nathanson, 1992; Erickson et al., 1994; Crawford et al., 1996; Wang et al., 1999). En otros estudios no se han encontrado efectos en la facilidad de evacuación tras la aplicación de EPI ni de agonistas  $\beta_2$  específicos (Yoshino y Suzuki, 1992; Suzuki et al., 1997) o se han encontrado efectos diferentes según la concentración de la droga utilizada (Wiederholt et al., 1995). Los efectos de EPI también se han asociado a la liberación de prostaglandinas en la red trabecular, por lo que diferentes estudios han sugerido este efecto (Camras et al., 1985; Anderson y Wilson, 1990; Crawford et al., 1996). Otros estudios relacionaron los efectos de la EPI con los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Eakins y Ryan, 1964) e incluso se han implicado otros receptores (adenosina) en la mediación del efecto de la EPI (Crosson y Petrovich, 1999).

Los antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos no han mostrado efecto sobre la evacuación del humor acuoso (Murray, 1979; Allen y Epstein, 1986; Serle et al., 1991; Erickson et al., 1994; Kanno et al., 1998), y su utilización como hipotensores oculares se asocia a la disminución en la formación de humor acuoso en el epitelio ciliar.

Por otra parte, la participación de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos se ha descrito en diferentes estudios. Inicialmente, se implicó a los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en general en los incrementos de la evacuación del humor acuoso producidos por la EPI (Eakins y Ryan, 1964), pero posteriormente, numerosos estudios han demostrado que son los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos los que tienen un papel más importante en la evacuación del humor acuoso. Algunos autores han sugerido que los receptores  $\alpha_2$  participan a nivel de la vía uveoescleral (Toris et al., 1995a, 1999) aumentando la evacuación del humor acuoso por esta vía (brimonidina). Otro agonista  $\alpha_2$  como la apraclonidina, produce el efecto contrario sobre la vía uveoescleral y aumenta ligeramente la evacuación por la vía convencional (Toris et al., 1995b).

En todos estos estudios, los efectos de los agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos se han evaluado tras 5-8 días de administración de las drogas, por lo que no se evaluaron los efectos agudos de dichas sustancias. Aparte de los efectos sobre las vías de evacuación, los efectos hipotensores de los agonistas  $\alpha_2$  se asocian a una disminución en la formación del humor acuoso (Serle et al., 1991; Toris et al., 1995a, 1995b, 1999).

Aunque no se han identificado selectivamente receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en la red trabecular, se han estudiado los efectos de los antagonistas  $\alpha_1$  en la evacuación del humor acuoso. En la mayoría de los trabajos, estos fármacos disminuyen la IOP, pero sus efectos sobre la evacuación del humor acuoso son variables, encontrándose incrementos de la evacuación uveoescleral (Zhan et al., 1998; Kanno et al., 1998), incrementos de la evacuación por la vía convencional (Mastropasqua et al., 1996; Wang et al., 1997) o sin efecto sobre la evacuación por la vía convencional (Murray, 1979; Serle et al., 1984; Zhan et al., 1998; Kanno et al., 1998; Oshika et al., 1991).

### **1.7. Participación de las prostaglandinas**

Diferentes estudios han mostrado efectos de las prostaglandinas sobre la dinámica del humor acuoso. Los efectos encontrados muestran una disminución de la IOP tras la aplicación de diferentes tipos de prostaglandinas:  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Lee et al., 1984b; Camras et al., 1987; Hayashi et al., 1987; Crawford et al., 1987; Villumsen y Alm, 1989; Camras et al., 1989; Gabelt y Kaufman, 1989, 1990; Poyer et al., 1992; Toris et al., 1993; Erkilic et al., 1996),  $\text{PGE}_2$  (Wang et al., 1998),  $\text{PGA}_2$  (Hayashi et al., 1987; Toris et al., 1995c) y  $\text{PGD}_2$  (Goh et al., 1989). La disminución de la IOP se ha asociado mayoritariamente a un aumento de la evacuación del humor acuoso por la vía uveoescleral (Lee et al., 1984b; Hayashi et al., 1987, Gabelt y Kaufman, 1989, 1990; Goh et al., 1989; Toris et al., 1993, 1995c) aunque se han encontrado disminuciones en la evacuación en algún caso (Wang et al., 1998). Actualmente la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  o sus análogos (latanoprost) se usan como fármacos antiglaucomatosos.

Los estudios que han determinado los efectos específicos de estos compuestos sobre la vía convencional de evacuación del humor acuoso muestran aumentos de la evacuación (Crawford et al., 1987; Toris et al., 1995c), disminuciones (Gabelt y Kaufman, 1989) o no han detectado ningún cambio apreciable (Villumsen y Alm, 1989; Gabelt y Kaufman, 1990; Toris et

al., 1993; Erkilic et al., 1996). Por otra parte, algunos estudios han mostrado que las células trabeculares pueden producir y secretar prostaglandinas ( $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ) y que esta producción puede ser modulada por diferentes sustancias como la dexametasona, la bradikina o el ácido araquidónico (Weinreb et al., 1983; Gerritsen et al., 1986). Además se han identificado receptores de tipo  $FP_A$  en la red trabecular humana y en las células trabeculares en cultivo (Anthony et al., 1998) y receptores  $EP_2$  en células trabeculares porcinas (Zhao et al., 1995).

La participación de las prostaglandinas en la evacuación del humor acuoso se ha relacionado con las catecolaminas y el AMPc, debido a que la norepinefrina u otros agonistas adrenérgicos pueden estimular la síntesis y liberación de prostaglandinas (Waitzman et al., 1979; Nebigil y Malik, 1993). Además, algunos autores han mostrado que los efectos hipotensores de la epinefrina pueden ser bloqueados por antagonistas de la síntesis de prostaglandinas (Bhattacharjee y Hammond, 1977; Camras et al., 1985; Anderson y Wilson, 1990; Erickson et al., 1994; Crawford et al., 1996). Los mecanismos intracelulares de este efecto todavía no se conocen, pero se sugiere la síntesis y liberación de  $PGE_2$ . Paralelamente, se han estudiado los efectos de las prostaglandinas sobre la contractilidad de la red trabecular (Krauss et al., 1997), lo que apunta hacia un papel activo de las prostaglandinas sobre la red trabecular.

### 1.8. La célula trabecular

Los primeros estudios de la red trabecular atribuyeron un papel totalmente pasivo a las células que forman dicha estructura. Se pensó que su función era meramente estructural y que el humor acuoso fluía libremente a través de la estructura que formaban.

Desde hace algunos años, los estudios con células trabeculares en preparaciones *in vitro* han demostrado que tienen un papel activo y que posiblemente jueguen un papel importante en la regulación de la evacuación del humor acuoso, y por tanto de la presión intraocular (Erickson y Nathanson, 1992; Wiederholt et al., 1995; Llobet et al., 1999). Diferentes estudios han mostrado que sustancias presentes en el humor acuoso activan vías de transducción intracelulares y provocan cambios en la morfología, activación de genes específicos, síntesis de proteínas, etc... Así mismo, cambios en el volumen celular o activación/inactivación de cotransportadores iónicos específicos (Gual, 1997; Al-Aswaad, 1999), provocan cambios en el flujo de evacuación del humor acuoso.

Hay que distinguir entre los efectos agudos y los efectos crónicos de fármacos o drogas sobre las células trabeculares. Durante muchos años se ha asociado la aparición de glaucoma de ángulo abierto con anomalías en la producción de matriz extracelular por parte de las células trabeculares. Así, la administración de corticoides de manera crónica se correlaciona con cambios en las proteínas de la matriz extracelular (ej.: colágeno) y con la disminución de la evacuación del humor acuoso, con el consiguiente aumento de la presión intraocular (Clark, 1995; Wordinger y Clark, 1999).

Los estudios realizados hasta la fecha, han aportado información sobre los diferentes receptores de membrana y canales iónicos identificados hasta la fecha en la célula trabecular (Tabla 1.3 y 1.4).

**TABLA 1.3** *Receptores identificados en la célula trabecular*

Receptor	subtipo	agonista endógeno	proteína G	acción	referencias
Múscarinico	M <sub>3</sub>	acetilcolina	G <sub>q/11</sub>	↑ IP <sub>3</sub> , DAG, [Ca <sup>2+</sup> ]	Gupta et al., 1994
Péptido Natriuretico	ANP	ANP, BNP, CNP	-	↑ GMPc	Chang et al., 1996
Atrial (ANP)	ANP <sub>B</sub>		-	↑ GMPc	Pang et al., 1996
Adrenérgicos	α <sub>2A</sub>	Norepinefrina, epinefrina	G <sub>16</sub>	↓ AMPc	Stamer et al., 1996
	β <sub>2</sub>		G <sub>s</sub>	↑ AMPc	Jampel et al., 1987
Bradikinina	B <sub>2</sub>	Bradikinina	G <sub>q/11</sub>	↑ IP <sub>3</sub> , DAG, [Ca <sup>2+</sup> ]	Sharif y Xu, 1996
Canabinoides	CB <sub>1</sub>	anandamida	G <sub>16</sub>	↓ AMPc	Straiker et al., 1999
Dopamina	D <sub>1</sub>	dopamina	G <sub>s</sub>	↑ AMPc	Karnezis et al., 1989
Endotelina	ET <sub>A</sub>	ET-1, ET-2, ET-3	G <sub>q/11</sub>	↑ IP <sub>3</sub> , DAG, [Ca <sup>2+</sup> ]	Tao et al., 1998
Gabaérgicos	GABA <sub>B</sub>	GABA	G <sub>16</sub>	↓ AMPc	Zarbin y Anholt, 1991
Histamina	H <sub>1</sub>	histamina	G <sub>q/11</sub>	↑ IP <sub>3</sub> , DAG, [Ca <sup>2+</sup> ]	Sharif et al., 1994, 1996
Neuropeptido Y	--	neuropeptido Y	G <sub>16</sub>	↓ AMPc	Ohuchi et al., 1992
Prostanoides	FP <sub>A</sub>	PGF <sub>2α</sub>	G <sub>q/11</sub>	↑ IP <sub>3</sub> , DAG, [Ca <sup>2+</sup> ]	Anthony et al., 1998
	EP <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub>	G <sub>s</sub>	↑ AMPc	Zhao et al., 1995
Glucocorticoides	GR	cortisol, corticoesterona	--	--	Weinreb et al., 1981
α-2-macroglobulina		α-2-macroglobulina	--	↑ IP <sub>3</sub> , DAG, [Ca <sup>2+</sup> ]	Howard et al., 1996

Abreviaturas: ANP=péptido natriurético atrial-α; BNP=péptido natriurético cerebral; CNP=péptido natriurético tipo C; ET-1=endotelina-1; ET-2=endotelina 2; ET-3=endotelina-3; PGF<sub>2α</sub>=prostaglandina F<sub>2α</sub>; PGE<sub>2</sub>=prostaglandina E<sub>2</sub>; IP<sub>3</sub>=inositol trifosfato; DAG=diacilglicerol; AMPc=adenosin monofosfato ciclico; GMPc=guanosin monofosfato ciclico.

**TABLA 1.4** *Canales de membrana identificados en la célula trabecular*

Canal	permeabilidad	características	acción	referencias
BK <sub>Ca</sub>	K <sup>+</sup>	activado por Ca <sup>2+</sup>	hiperpolarización	Stumpff et al., 1997
Aquaporina-1	H <sub>2</sub> O	–	regulación volumen	Stamer et al., 1995a

Abreviaturas: BK<sub>Ca</sub>=canal de potasio de alta conductancia calcio dependiente.

### 1.8.1. Segundos mensajeros

#### 1.8.1.1. El calcio intracelular

El ion calcio (Ca<sup>2+</sup>) es quizás el segundo mensajero menos estudiado en la célula trabecular, aunque diferentes autores han estudiado los efectos sobre la concentración plasmática de Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) de endotelina-1 (Kohmoto et al., 1994; Kageyama et al., 1996; Tao et al., 1998), bradikina (Llobet et al., 1999), PGF<sub>2α</sub> (Anthony et al., 1998), agonistas muscarínicos (Shade et al., 1996), histamina (WoldeMussie y Ruiz, 1992), neuropéptido Y (Ohuchi, 1992). En el caso de agonistas adrenérgicos, solo existe un estudio (Tanihara et al., 1991) en el que se ensayaron noradrenalina e isoproterenol sobre células trabeculares en cultivo. Para la mayoría de las sustancias, la movilización de calcio que inducen se asocia a la activación de una proteína G<sub>q/11</sub> y la generación de DAG e IP<sub>3</sub> (endotelina-1, bradikina, PGF<sub>2α</sub>, histamina), pero también se han relacionado con la activación de proteínas G<sub>i/o</sub> (neuropéptido Y) o G<sub>s</sub> (isoproterenol). También se han observado modificaciones en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> tras someter a las células trabeculares en cultivo a cambios de presión (Matsuo y Matsuo, 1996). La caracterización de un canal de potasio dependiente de calcio de alta conductancia (BK<sub>Ca</sub>) en las células trabeculares (Stumpff et al., 1997) sugiere que las mobilizaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> podrían modular la actividad de este canal.

Los antagonistas del calcio se han implicado en la evacuación del humor acuoso por su efecto sobre la red trabecular (Erickson et al., 1995; Melena et al., 1999). En este estudio, la perfusión de segmentos anteriores con verapamil incrementa la evacuación del humor acuoso a través de la red trabecular, aunque algunos autores han encontrado efectos contrarios (Santafe et al., 1996). También se han implicado los antagonistas de los canales de calcio en la posible contractibilidad de la red trabecular (Lepple-Wienhues et al., 1992).

En otros tipos celulares parecidos, como células del músculo liso o del endotelio

vascular, las sustancias adrenérgicas inducen mobilizaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  importantes (Jacob, 1991; Cobbold et al., 1991; Schöfl et al., 1993; Hamada et al., 1997). En el músculo liso vascular, los agonistas  $\alpha_1$  inducen incrementos rápidos en el  $[Ca^{2+}]_i$  que muchas veces van seguidos de oscilaciones (Hamada et al., 1997). Estas oscilaciones de calcio suelen mantenerse durante algunos minutos dependiendo de la intensidad del estímulo y se les atribuye un papel de mantenimiento del estímulo adrenérgico en el tiempo (Thomas et al., 1996; Meyer y Stryer, 1991). Sustancias como la endotelina-1 o la bradikina inducen en las células trabeculares un incremento rápido del  $[Ca^{2+}]_i$  que no recupera los niveles basales hasta pasados algunos minutos (Kageyama et al., 1996; Llobet et al., 1999). Este tipo de sustancias parecen inducir una entrada sostenida de calcio durante algunos minutos y nunca van acompañados de oscilaciones. Este tipo de movilización de calcio es sustancialmente diferente de las mobilizaciones inducidas por agonistas adrenérgicos, ATP, etc. en otros sistemas (Jacob, 1991; Cobbold et al., 1991; Schöfl et al., 1993; Hamada et al., 1997).

En el músculo liso vascular, los incrementos del  $[Ca^{2+}]_i$  se asocian a activación del sistema contráctil de estas células. Así, la unión del calcio a la calmodulina induce la activación del sistema actina/miosina provocando la contracción celular. De esta manera, los efectos  $\alpha$ -adrenérgicos se asocian a vasoconstricción, mientras que los efectos  $\beta$ -adrenérgicos inducen vasodilatación. El sistema contráctil de las células del endotelio vascular es menos importante que en las células del músculo liso y los aumentos del  $[Ca^{2+}]_i$  se asocian a otro tipo de procesos como exocitosis, proliferación, liberación de sustancias vasodilatadoras o vasoconstrictoras, etc. (Vanhoutte y Mombouli, 1996).

#### 1.8.1.2. El AMPc

La adenilato ciclasa, enzima que sintetiza el AMPc a partir de ATP, se ha identificado en las células trabeculares humanas y bovinas, (Busch et al., 1993). La participación del AMPc en la fisiología celular de la red trabecular se ha estudiado tras la aplicación de diferentes agonistas como la EPI o el isoproterenol (Koh y Yue, 1988; Tripathi et al., 1989; Erickson y Nathanson, 1992; Crawford et al., 1996; Friedman et al., 1999), la dopamina (Karnezis et al., 1989), la  $PGE_1$  (Koh y Yue, 1988; Dijkstra et al., 1999), la adenosina (Koh y Yue, 1988), el VIP (Koh y Yue, 1988) o análogos del mismo AMPc (Kaufman, 1987). Los efectos de la epinefrina sobre el AMPc se asocian a la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Erickson y Nathanson,

1992) o a la síntesis y liberación de prostaglandinas en las células trabeculares tras ser estimuladas con epinefrina (Erickson et al., 1994; Crawford et al., 1996). Estos estudios muestran, en todos los casos, un incremento de la concentración intracelular de AMPc que se asocia con un aumento en la evacuación del humor acuoso por la vía convencional. También se ha descrito el efecto contrario (disminución de la concentración de AMPc) tras la estimulación selectiva de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Stamer et al., 1996). Finalmente, se ha descrito la síntesis de AMPc por parte de las células endoteliales del canal de Schlemm tras ser sometidas a presión hidráulica (Stamer et al., 1999).

### 1.8.1.3. El GMPc

En los últimos años y tras establecer la relación del GMPc con el óxido nítrico (NO) como mediador de sus efectos, numerosos estudios han relacionado los efectos de este segundo mensajero en las células trabeculares con la regulación de la evacuación del humor acuoso. Diferentes agonistas como la endotelina-1, CNP, BNP, ANP o los donantes de NO, incrementan la concentración intracelular de GMPc en las células trabeculares (Takashima et al., 1996, 1998; Pang et al., 1994, 1996; Wiederholt et al., 1994; Chang et al., 1996; Haque et al., 1998). Estos efectos se asocian con un efecto hipotensor ( $\downarrow$ IOP) debido a un incremento de la evacuación del humor acuoso (Kee et al., 1994; Takashima et al., 1996). Por otra parte, también se han relacionado los efectos del GMPc con la relajación de la red trabecular (Wiederholt et al., 1994) y con la activación específica de canales de potasio (Stumpff et al., 1997).

### 1.8.1.4. El IP<sub>3</sub>

Los efectos de algunos agonistas sobre las células trabeculares son mediados por la síntesis de IP<sub>3</sub> tras la activación de la fosfolipasa C, el cual se asocia a movilizaciones del  $[Ca^{2+}]_i$ . Agonistas como la endotelina-1, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , bradikina, takikina, histamina, neuropeptido Y y agonistas muscarínicos incrementan la concentración intracelular de IP<sub>3</sub> en células trabeculares en cultivo (Ohuchi et al., 1992; WoldeMussie y Ruiz, 1992; Pang et al., 1994; Shade et al., 1996; Sharif et al., 1996; Sharif y Xu, 1996; Anthony et al., 1998; Haque et al., 1998). Aunque no se han relacionado directamente los incrementos de IP<sub>3</sub> en las células trabeculares con la evacuación del humor acuoso, los resultados encontrados a nivel celular ( $\uparrow$ [IP<sub>3</sub>]<sub>i</sub>) para diferentes sustancias, se relacionan con disminuciones de la evacuación del humor acuoso por la vía

convencional (Llobet et al., 1999; Wiederholt et al., 1995).

### 1.8.2. Contracción y relajación de la célula trabecular

Desde que Lepple-Wienhues et al. (1991a) describieron las propiedades contráctiles *in vitro* de la red trabecular, diferentes trabajos del mismo grupo han estudiado la posible implicación de estas propiedades en la regulación de la evacuación del humor acuoso en respuesta a diferentes drogas. *In vitro*, pequeñas tiras de tejido de la red trabecular se contraen en respuesta a colinérgicos (acetilcolina, pilocarpina y carbacol; Lepple-Wienhues et al. 1991a; Wiederholt et al., 1996), endotelina-1 (Lepple-Wienhues et al., 1991b), agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (fenilefrina y brimonidina; Wiederholt et al., 1996), agonistas de tromboxanos (U-46619; Krauss et al., 1997). El efecto contrario (relajación) se ha encontrado en respuesta a prostaglandinas ( $PGE_1$ ; Krauss et al., 1997), agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (isoproterenol; Wiederholt et al., 1996), análogos del GMPc y donantes de NO (Wiederholt et al., 1994), tirosina kinasas (Wiederholt et al., 1998) e inhibidores de la protein kinasa C (H7; Thieme et al., 1999). En células trabeculares en cultivo también se han visto contracciones en respuesta a diferentes agonistas como el ácido etacrínico, colchicina, vinblastina y bradikinina (Gills et al., 1998). En otros sistemas se han observado cambios morfológicos en respuesta a bradikinina que podrían ser mediados por la contracción de las células trabeculares (Llobet et al., 1999). Con estos datos se ha sugerido un antagonismo funcional entre la contracción/relajación del músculo ciliar y la red trabecular sobre la evacuación del humor acuoso (Wiederholt, 1998).

Paralelamente, se han descrito diferentes poblaciones de células en la red trabecular según su morfología y sus propiedades electrofisiológicas (Corneo et al., 1991; Lepple-Wienhues et al., 1994). En este sentido, una población celular tendría características similares a las células del músculo liso vascular (más contráctiles) y otra población sería más parecida a células del endotelio vascular.

### 1.8.3.Regulación del volumen celular

En el contexto de la regulación de la evacuación del humor acuoso, durante mucho tiempo se ha centrado la atención en los efectos de diferentes drogas sobre los segundos mensajeros en las células trabeculares o sobre sus características contráctiles. Más recientemente, la regulación del volumen celular se ha estudiado como posible modulador de la evacuación a través de red trabecular. Se observó que la perfusión de agentes sulfidrilo en ojos enucleados que disminuía la evacuación del humor acuoso debido al aumento del volumen celular en la red trabecular y en el endotelio del canal de Schelmm (Freddo et al., 1984). Posteriormente, se implicó el cotransportador Na-K-2Cl, presente en las células trabeculares, en la regulación del volumen celular y en la permeabilidad de las células trabeculares cultivadas en monocapa (O'Donnell et al., 1995). En otro tipo de estudios, se caracterizaron los efectos sobre la evacuación del humor acuoso por la vía convencional producidos por cambios en el volumen celular como respuesta a diferentes osmolaridades del medio de perfusión (Gual et al., 1997). De este modo, los aumentos de volumen celular producidos por soluciones hiposmóticas inducen disminuciones en la evacuación del humor acuoso, mientras que las disminuciones del volumen celular por soluciones hiperosmóticas producen el efecto contrario sobre la evacuación del humor acuoso. Estos resultados, se han relacionado con la actividad del cotransportador Na-K-2Cl en el estudio de Al-Aswad et al. (1999). Sustancias que estimulan la actividad del cotransportador (vasopresina), disminuyen la evacuación del humor acuoso, mientras que sustancias que lo inhiben (bumentanida; AMPc) producen un aumento de la evacuación. La actividad de este cotransportador es regulada por diferentes sustancias, como ya se ha mencionado, y por la concentración de ion Cl<sup>-</sup> en las células trabeculares (Putney et al., 1999a). Recientemente se ha observado que la expresión y la actividad del cotransportador está disminuida en células trabeculares de pacientes con glaucoma comparado con células trabeculares de individuos normales y, además, el volumen celular es mayor en el caso de las células trabeculares glaucomatosas (Putney et al., 1999b). Estos estudios han sugerido que el volumen celular sería un importante modulador de la función de la red trabecular y por tanto de la evacuación del humor acuoso (Brandt y O'Donnell, 1999).



# **OBJETIVOS**

---



## 2. OBJETIVOS

Uno de los fármacos que se sigue utilizando en el tratamiento del glaucoma es la EPI, debido a su acción hipotensora ( $\downarrow$  IOP). Los efectos de la EPI han sido estudiados en diferentes preparaciones tanto *in vitro* como *in vivo* y se ha descrito en detalle su mecanismo de acción a nivel de la formación del humor acuoso. Sin embargo, se desconoce su mecanismo de acción sobre la evacuación del humor acuoso. Es necesario, por tanto, estudiar los efectos de la EPI sobre la evacuación del humor acuoso y caracterizar los mecanismos celulares específicos activados por la EPI.

A pesar de que se han identificado diferentes tipos de receptores adrenérgicos en las células trabeculares no se conocen los subtipos farmacológicos implicados. Cabe suponer que cada subtipo de receptor adrenérgico ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ) puede tener funciones diferentes en la regulación de la evacuación del humor acuoso. Por ello, deben establecerse los subtipos de receptores adrenérgicos presentes en las células trabeculares y cuáles de éstos están implicados en la evacuación del humor acuoso.

La activación de los receptores adrenérgicos de las células trabeculares debe, al igual que en otros tipos celulares, iniciar diferentes vías de señalización intracelular. Queda por estudiar en estas células, que vías intracelulares se activan por los adrenérgicos, que modificaciones producen sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso, y cuáles son los segundos mensajeros implicados.

Se ha establecido que la estimulación adrenérgica modula, en las células trabeculares y en otros tipos celulares, los niveles de AMPc, aunque se desconocen los efectos de este segundo mensajero sobre evacuación del humor acuoso. En consecuencia, deben caracterizarse los efectos del AMPc sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso.

Cabe esperar que la estimulación simpática libere catecolaminas directamente en las estructuras de la red trabecular y del endotelio del canal de Schlemm. Además, la estimulación del sistema nervioso simpático aumenta el nivel de catecolaminas en las cámaras oculares, de modo que estos neurotransmisores pueden alcanzar la red trabecular y el canal de Schlemm vía humor acuoso. Sin embargo, no se conoce si la inervación adrenérgica tiene algún papel sobre la evacuación del humor acuoso.

Frente a estas cuestiones se han elaborado los siguientes *Objetivos concretos*

1. Estudiar y caracterizar el efecto de la epinefrina sobre la evacuación del humor acuoso
2. Establecer, si es el caso, los tipos y subtipos de receptores adrenérgicos implicados en la modulación de humor acuoso activada por la epinefrina
3. Correlacionar los efectos celulares de la epinefrina con los efectos sobre la facilidad de evacuación
4. Estudiar y caracterizar los efectos del AMPc sobre la evacuación del humor acuoso
5. Valorar, a la luz de los resultados obtenidos, la participación del sistema nervioso simpático sobre la evacuación del humor acuoso.





# **MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Animales de experimentación, obtención y condiciones de conservación

Los estudios sobre la fisiología y la fisiopatología del globo ocular han utilizado clásicamente diferentes especies animales: conejos, gatos, ratas, ratones, primates y bovinos. También se han utilizado ojos humanos, pero la utilización de animales como modelos experimentales para estudiar la fisiología de los ojos humanos, es más útil por diferentes circunstancias: son de fácil obtención, tienen un coste más bajo y se pueden obtener en condiciones de conservación adecuadas para la experimentación.

En este estudio se han utilizado ojos de ternera por sus semejanzas, tanto fisiológicas como anatómicas, con las estructuras del ojo humano y por su facilidad de obtención en condiciones adecuadas de conservación para su utilización.

Se utilizaron ojos de ternera de 3 a 6 meses de edad, que se enuclearon en el matadero de Barcelona (Mercabarna) entre 1 y 3 horas después del sacrificio del animal. Los ojos se sumergieron inmediatamente en solución salina (PBS, Phosphate Buffered Saline) a 4°C y pH 7.42, al cual se le añadieron antibióticos para evitar contaminaciones bacterianas y fúngicas (penicilina 50 UI/ml, estreptomicina 50 µg/ml y anfotericina B 5 µg/ml).

#### 3.2. Disección

El globo ocular, tras la enucleación, se diseccionó para el montaje de la preparación *in vitro* o para la extracción de tejido trabecular para el cultivo primario. Se eliminó tanto la conjuntiva como los músculos oculares externos del globo ocular y se biseccionó ecuatorialmente, desechando la parte posterior.

El humor vítreo, el cuerpo ciliar, el iris y el cristalino se diseccionaron del segmento anterior ocular, dejando únicamente los tejidos que participan en la evacuación del humor acuoso situados en el límite esclero-corneal. El pigmento procedente del iris y de la esclera se limpió, así como los restos de tejido diseccionado para que no obstruyeran las vías de evacuación del humor acuoso.

El segmento anterior disecado se sumergió en medio de cultivo (DMEM, Dulbecco's Modified Eagles Medium) para lavar los restos de pigmento.

### 3.3. Cultivo primario de células trabeculares

El cultivo primario de células trabeculares (BTM) se realizó mediante la modificación de la técnica descrita por Stamer *et al.* (1995b). Tras la disección del globo ocular bovino, se extrajeron pequeñas tiras de tejido de la red trabecular. Estas se lavaron 3 veces durante 10 minutos en solución salina (PBS) con antibióticos (100 U.I./mL penicilina-estreptomicina y 2.5 mg/mL amfotericina-B (Bio-Whitaker, Barcelona)). Posteriormente, se realizó la digestión enzimática de las tiras de tejido trabecular (2mg/mL colagenasa tipo I (Sigma, Madrid) y 0.5 mg/mL albúmina sérica bovina (BSA)) a 37°C durante 2 h. Tras la digestión mecánica con pipetas *Pasteur* de diferentes calibres, se recogió el sobrenadante en solución de albúmina (6 mg/mL en PBS) para detener la digestión enzimática. El sedimento resultante de la centrifugación (10 min a 1000 r.p.m.) y se resuspendió en medio de cultivo (DMEM) con 10% suero bovino fetal, antibióticos y 100 mg/mL L-glutamina (Sigma, Madrid). Tras el cultivo de dicha solución en frasco o placa en condiciones de cultivo celular (37°C y 5% CO<sub>2</sub>), el crecimiento de células trabeculares se observó entre los 2 y 4 días posteriores. Pasados de 12 a 15 días las células llegaron a confluencia. Los diferentes pases del cultivo se realizaron con Trypsina-EDTA (Bio-Whitaker, Barcelona) y las células se utilizaron entre el 1º y el 3º pase.

### 3.4. Registro del calcio intracelular

Para los experimentos de registro del calcio intracelular, las células trabeculares se cultivaron en cubreobjetos de 25 mm de diámetro (VWR Scientific Inc., Philadelphia, PA) en las condiciones explicadas anteriormente durante 48-72h. Este tiempo es suficiente para que las células se peguen y se expandan correctamente. Previamente al montaje del cubreobjeto en la cámara de registro, se lavaron las células con el tampón de incubación (121 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM glucosa y 1.8% BSA a pH 7.4) y se incubaron a 37°C durante 25 min con Fura-2 acetoxymethyl ester (5x10<sup>-6</sup>M) (Calbiochem, San Diego, CA). Se lavó el Fura-2 no incorporado con tampón de incubación modificado (0.01% BSA y 2 mM CaCl<sub>2</sub>) y se montó la cámara en un microscopio invertido de epifluorescencia. Durante el registro se utilizó un objetivo de inmersión (40x) de fluor (Nikon, Tokyo, Japan) que junto con la cámara y el estativo del microscopio se mantuvo a

37°C. Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron con una cámara CCD CH250 (Photometrics, Tucson, AZ), se digitalizaron y se almacenaron en un ordenador Apple Machintosh 840AV (Fig. 3.1).

Los pares de imágenes se obtuvieron cada 4 segundos (en condiciones basales y tras la estimulación de las células) a las longitudes de onda ( $\lambda$ ) de excitación de 380 y 340 nm (filtro de ancho de banda de 10 nm) para registrar las formas de  $\text{Ca}^{2+}$  libre y  $\text{Ca}^{2+}$  unido al colorante, respectivamente. El tiempo de integración de cada imagen fue de 100 ms y los *pixels* individuales fueron convertidos en *superpixels* de 2x2 en la salida del detector CCD para mejorar el ruido de la señal.

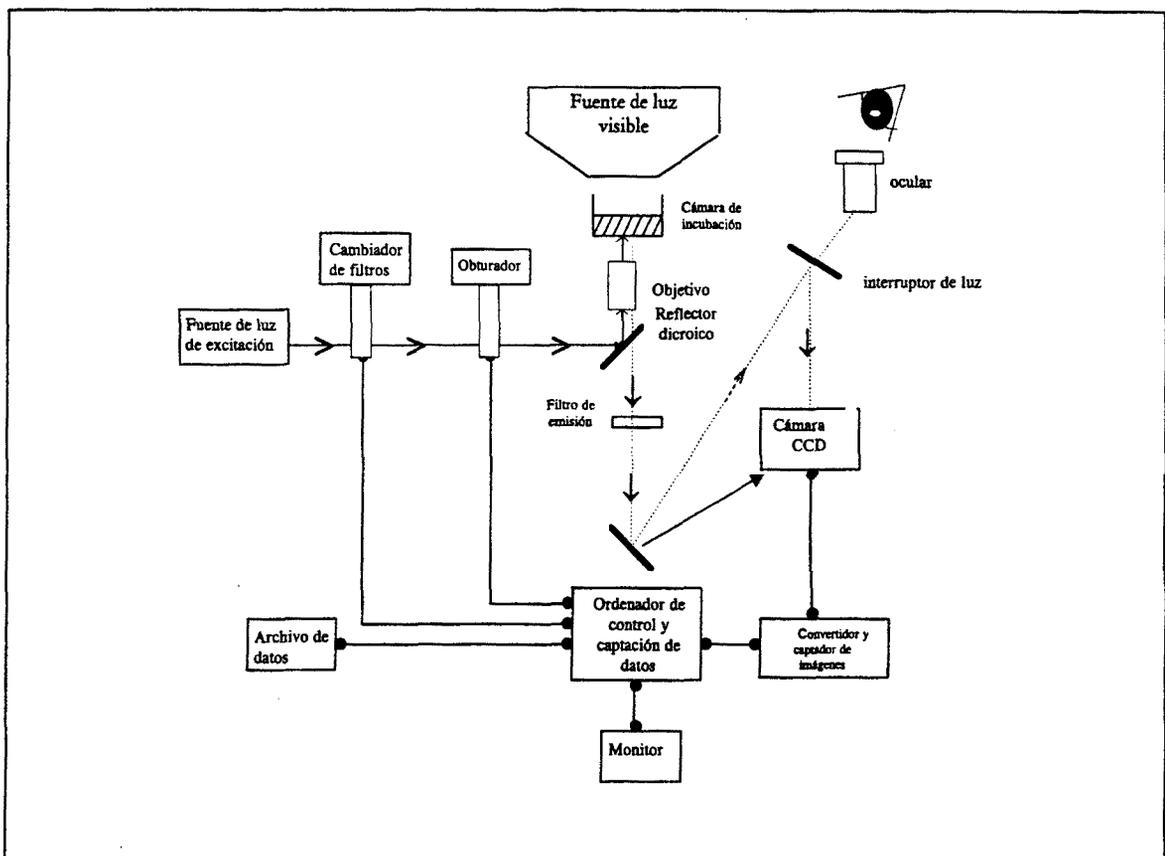
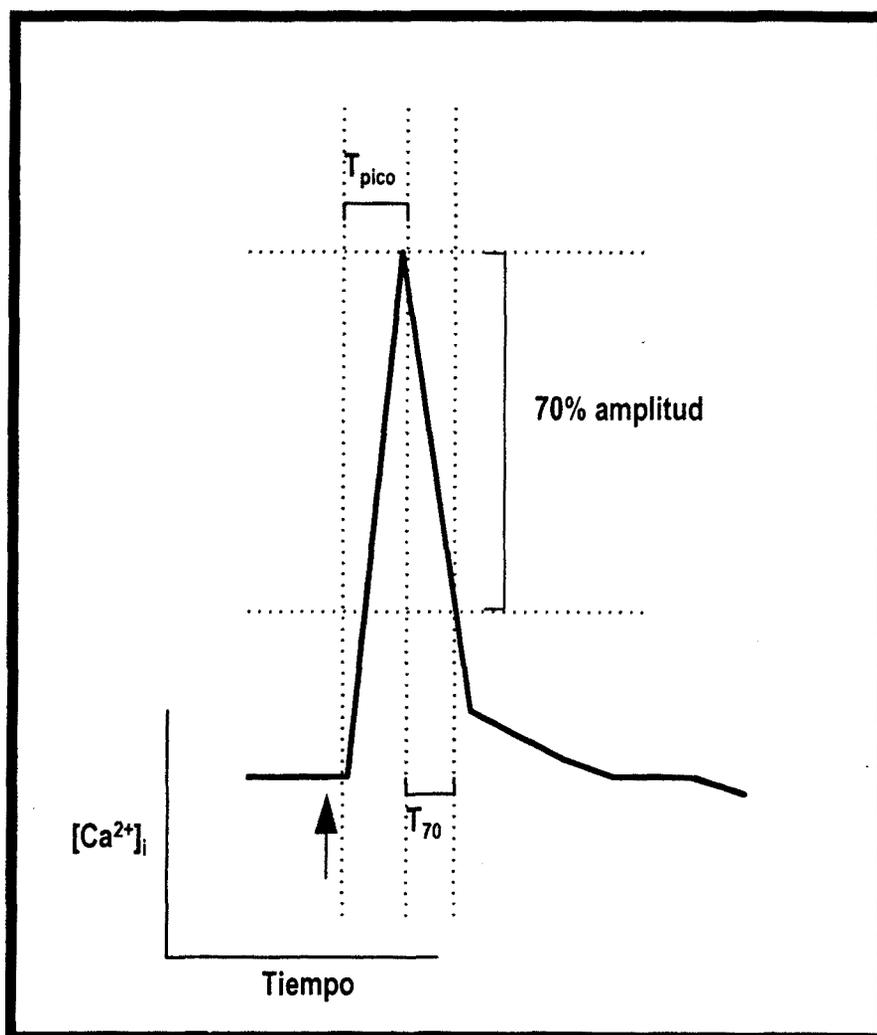


Fig. 3.1 Esquema del sistema de registro del calcio intracelular y los cambios de forma celular.

Los valores de  $[Ca^{2+}]_i$  fueron calculados individualmente en cada célula a partir de la relación de los valores de fluorescencia a las  $\lambda$  de 340 to 380 nm. En cada experimento, el calcio en condiciones basales se registró durante el primer minuto. Tras la aplicación de la sustancia a evaluar, se registraron los niveles de calcio hasta un tiempo máximo de 24 minutos. Los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  en cada célula se consideraron significativos cuando el incremento era de más del 100% del nivel basal. En los experimentos con antagonistas, estos se incubaron 30 minutos antes del inicio del experimento.

En estos experimentos se evaluó el porcentaje de respuesta a cada droga, la amplitud del incremento de  $[Ca^{2+}]_i$  y la presencia de oscilaciones de calcio. Las características de los incrementos de calcio se analizaron mediante el cálculo del tiempo transcurrido desde la aplicación de la droga hasta el pico de calcio ( $T_{pico}$ ) y el tiempo desde el pico hasta la recuperación del 70% del valor basal de calcio ( $T_{70}$ ). Estos datos se muestran como la media y la desviación estándar de la media ( $media \pm SEM$ ).

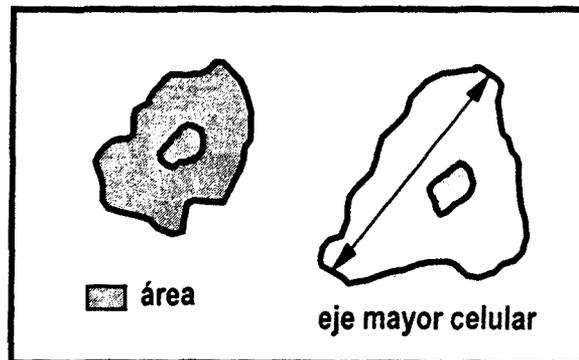


**Fig. 3.2:** Parámetros analizados en el estudio de la cinética de los incrementos de calcio.  $T_{pico}$ : tiempo transcurrido desde la aplicación de la droga hasta el pico de calcio.  $T_{70}$ : tiempo desde el pico hasta la recuperación del 70% del valor basal de calcio.

### 3.5. Morfometría de las células trabeculares

Las variaciones en la morfología celular tras la estimulación con un agonista se evaluaron mediante los cambios en el área y el eje mayor de cada célula trabecular. Los diferentes parámetros se midieron en las imágenes obtenidas a 380 nm utilizando un programa específico de análisis de imagen (NIH Image, Bethesda, MD). Los diferentes parámetros se obtuvieron de las imágenes en condiciones basales y tras 23 minutos de exposición al agonista, ya que transcurrido este tiempo (23 min), los experimentos controles no mostraron cambios

aparentes en la morfología celular. Los cambios en la morfología celular no interfirieron con el registro del calcio intracelular debido a que éstos son mucho más lentos que el tiempo entre los pares de imágenes utilizadas para calcular la concentración de calcio intracelular. El cálculo de la relación entre las dos longitudes de onda utilizadas compensa cualquier alteración en la distribución del colorante dentro de la célula provocada por los cambios de la forma celular. Los resultados se expresaron como el porcentaje de cambio en el parámetro evaluado respecto a los valores basales en la misma célula. Para establecer los valores controles en el estudio morfométrico se realizaron experimentos con células trabeculares *estimuladas* con medio de incubación y se estudió la morfología celular en condiciones basales (primer minuto,  $n=86$ ) y al final del protocolo experimental (23 min). El porcentaje de variación del área celular en los experimentos controles fué del  $5.4 \pm 2.2\%$  y en el eje mayor del  $1.26 \pm 0.59$  unidades arbitrarias (u.a.). A la vista de los datos, se definió como cambios morfológicos significativos las variaciones en el área celular mayores al 10% y reducciones mayores a 2.5 u.a. en el eje mayor celular. Estos valores son mayores que la  $\text{media} \pm 2\text{SD}$  de los valores encontrados en los experimentos controles.



**Fig. 3.3:** Parámetros analizados en el estudio de la morfología celular.

### 3.6. Perfusión de segmentos anteriores *in vitro*

La preparación utilizada está basada en la que describieron Erickson et al. (1988; 1991), aunque se ha modificado para mejorar la perfusión y sobretodo, el registro de los datos (Fig. 3.4). Se perfundieron los segmentos oculares, en condiciones de cultivo de órganos, con medio de cultivo. El medio de cultivo DMEM que contiene 4.5 mg/ml de glucosa se complementó con 50 UI/ml penicilina, 50 µg/ml estreptomicina y 5 µg/ml de anfotericina B. El pH del medio se ajustó a 7.42 a la temperatura de 36°C, y a 300 mOs/Kg.

Los segmentos anteriores, situados en la cámara de perfusión, se sujetaron en su sitio mediante un anillo que inmoviliza el segmento anterior ocular y forma un sello por compresión de la esclera perilimbal con la base de la cámara de perfusión, imposibilitando la salida de medio de perfusión por este sitio. De esta manera, las vías fisiológicas de evacuación del humor acuoso son las únicas que permiten la salida de éste.

La cámara de perfusión está especialmente construida para el tamaño de los ojos de ternera y consiste, básicamente, en una plataforma circular tallada de una esfera donde se sitúa el segmento anterior ocular. Mediante dos canalículos centrales en la base, se conecta con un tubo de polietileno a un reservorio lleno de medio de perfusión que, situado a la altura óptima, mantiene una presión constante de 10 mmHg. Es importante la utilización del tubo de polietileno por su permeabilidad al CO<sub>2</sub>, parámetro importante para un buen mantenimiento de la homeostasis celular.

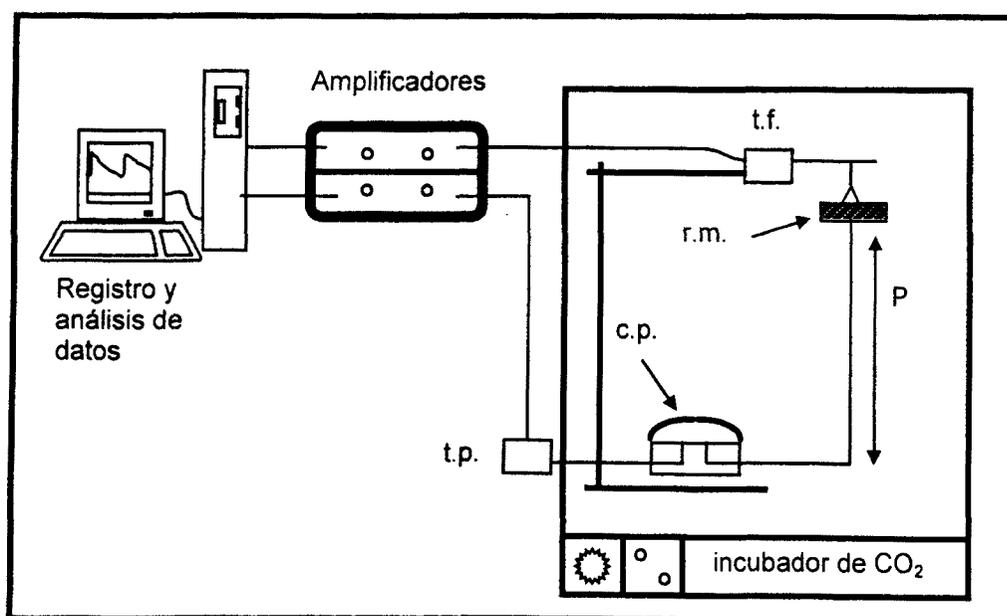
El peso del reservorio con medio se determinó con un transductor de tensión (Lética), que conectado a través de un amplificador a una terminal de ordenador IBM-PC, calcula el flujo de entrada de medio en la cámara de perfusión. Este parámetro es directamente proporcional al flujo de salida del medio de perfusión del segmento anterior ocular a través de las vías de evacuación del humor acuoso (Fig. 3.4).

La perfusión del segmento anterior tuvo lugar en un incubador de CO<sub>2</sub> (Selecta, 4000602, España) a 36°C de temperatura en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

La composición del medio de perfusión que contiene el reservorio puede ser modificado en cualquier momento del experimento, permitiendo evaluar la acción de diferentes sustancias o

fármacos, así como los cambios en parámetros físico-químicos como la osmolaridad o el pH. En la misma preparación también se puede modificar la altura del reservorio de perfusión y, por tanto, la presión de perfusión, lo que permite evaluar el efecto de diferentes presiones sobre la evacuación del medio de perfusión.

Para el registro se utilizó un ordenador de tipo PC con el *software* adecuado (Lética) que toma una muestra cada 5 segundos (Fig. 3.4). Para cada experimento se equilibró el amplificador y se calibró el sistema de registro, dato que permitió al programa calcular automáticamente los parámetros que registra.



**Fig. 3.4:** Esquema del sistema de registro de la facilidad de evacuación del humor acuoso. t.f.: transductor de fuerza; r.m.: reservorio de medio de perfusión; P: presión de perfusión (10 mmHg); c.p.: cámara de perfusión con segmento anterior ocular.; t.p.: transductor de presión.

Durante estos experimentos el parámetro que se registra es el que se conoce como *facilidad de evacuación*, que consiste en la relación entre el flujo en  $\mu\text{l}/\text{min}$  y la presión de perfusión. El flujo se mide mediante el transductor de tensión y la altura del reservorio determina la presión de perfusión que es constante. Con estos dos parámetros se pudo calcular en todo momento la facilidad de evacuación.

*Protocolos experimentales.*

En los estudios realizados se han utilizado dos tipos de protocolos (Fig. 3.5). Todos los experimentos realizados con esta técnica requieren, previamente al estudio de los efectos de diferentes fármacos, una serie de experimentos control para determinar la validez de la técnica, y a su vez, la estabilidad de la preparación en el tiempo, en las condiciones de perfusión utilizadas.

*a. Protocolo Control*

Para determinar la funcionalidad de la preparación en el tiempo y la estabilidad de la misma, se utilizó un protocolo control que consiste en la perfusión con medio de cultivo DMEM durante un periodo de 5 horas.

Esta perfusión control, está precedida por un periodo, de aproximadamente 30 minutos, de estabilización de la perfusión en las condiciones experimentales. Tras este periodo se perfundieron los segmentos anteriores oculares durante las 5 horas anteriormente mencionadas para determinar la facilidad de evacuación basal y la estabilidad de la misma en el tiempo.

*b. Protocolo experimental tipo 1*

Todos los protocolos descritos en este estudio se inician con un periodo de aproximadamente 30 minutos de estabilización de la perfusión en las condiciones experimentales. A partir de este punto empieza verdaderamente el protocolo experimental (Fig. 3.5).

El protocolo experimental de tipo 1 consiste en tres periodos de 90 minutos cada uno; periodo basal, periodo de perfusión con droga y periodo de retorno a las condiciones de perfusión basal.

*Periodo basal:* 90 minutos de perfusión con medio de cultivo DMEM únicamente. Con este periodo se calculó la facilidad de evacuación basal ( $C_0$ ).

*Periodo de perfusión con droga:* en este periodo, se añadió al medio de perfusión (DMEM) la droga a evaluar a la concentración deseada. Durante este periodo (90 minutos) se obtuvo la facilidad de evacuación en presencia de droga ( $C_d$ ).

*Periodo de retorno a las condiciones de perfusión basal:* tras el periodo de perfusión con droga se retornó a las condiciones de perfusión iniciales para determinar posibles variaciones respecto a la facilidad basal. Durante los 90 minutos de perfusión se obtuvo la facilidad de evacuación post-droga ( $C_{pd}$ ).

En algunos grupos experimentales, en los que se quiso evaluar la inhibición de los efectos producidos por ciertos agonistas, se añadió al medio de cultivo un antagonista y se mantuvo durante los tres periodos del protocolo. Previamente, en todos los casos se realizaron perfusiones controles con el antagonista para comprobar que el antagonista, por si mismo, no modificaba la facilidad de evacuación basal.

### *c. Protocolo experimental tipo 2*

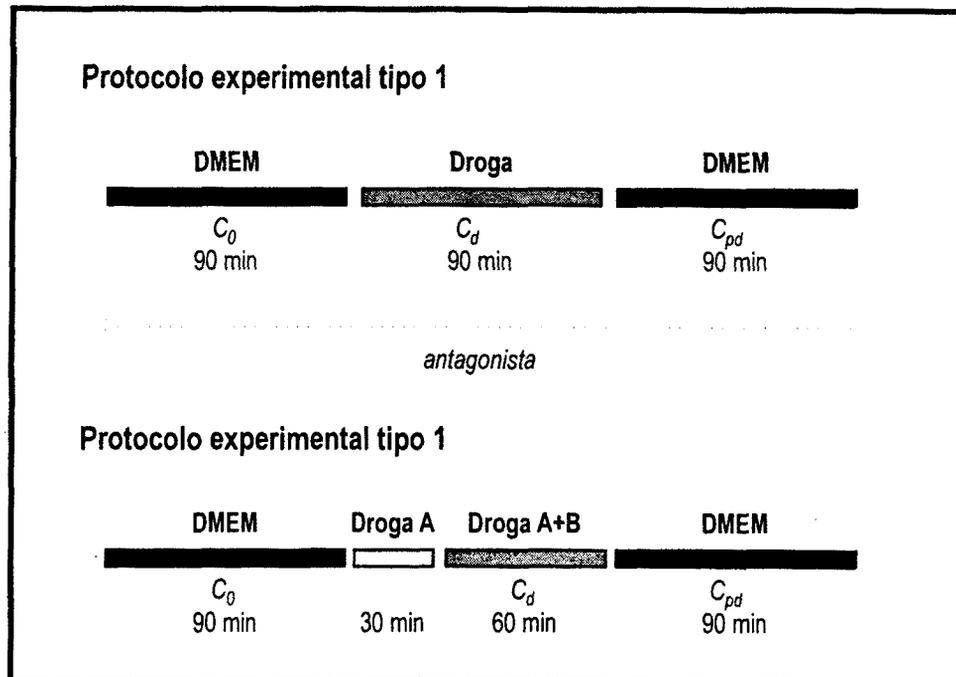
Este protocolo siendo similar al de tipo 1, se diferencia principalmente en el segundo periodo. En este caso el periodo de perfusión con droga está subdividido en dos etapas, aunque el tiempo total de perfusión fué el mismo (Fig. 3.5).

*Periodo basal:* consiste en 90 minutos de perfusión con medio de cultivo (DMEM). Durante este periodo se calculó la facilidad de evacuación basal ( $C_0$ ).

*Periodo de perfusión con droga A:* en este periodo se añadió al medio de perfusión la droga A. Normalmente, se utilizó este periodo de 30 minutos para perfundir una droga antagonista.

*Periodo de perfusión con droga A más droga B:* durante 60 minutos, se mantuvo la perfusión con la droga A y, además se añadió la droga (B) para determinar los efectos de las dos drogas juntas (normalmente agonista+antagonista). En este periodo se obtuvo la facilidad de evacuación en presencia de droga ( $C_d$ ) igual que en el protocolo de tipo 1.

*Periodo de retorno a las condiciones de perfusión basal:* como en el protocolo anterior, tras el periodo de perfusión con la droga se retorna a las condiciones de perfusión iniciales. Durante los 90 minutos de este periodo se obtuvo la facilidad de evacuación post-droga ( $C_{pd}$ ).



**Fig. 3.5:** Esquema de los protocolos experimentales utilizados en el estudio de la facilidad de evacuación del humor acuoso.

### *Facilidad de evacuación*

La facilidad de evacuación ( $C$ ) se calculó como la relación aritmética entre el flujo de entrada de medio de perfusión en el segmento anterior ocular ( $\mu\text{l}/\text{min}$ ) y la presión de perfusión (mm de Hg). Los valores de  $C$  se registraron cada 5 segundos (0.2 Hz) de manera automática con el sistema informático. Estos valores se promediaron en intervalos de 15 minutos para el análisis estadístico y la representación gráfica de los mismos. Los primeros 6 subperiodos de 15 minutos se promediaron para establecer la  $C$  basal ( $C_0$ ). Para validar cada experimento, se establecieron dos criterios durante el periodo basal: los valores de  $C$  de los subperiodos de 15

minutos debían estar entre 0.4 y 1.3  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mmHg}$  y, además, las diferencias entre los diferentes valores no debían sobrepasar un  $\pm 10\%$  de variación. La adición de las drogas se realizó mediante el cambio de medio de perfusión por otro con la droga a la concentración deseada. Tras abrir una vía de salida en la cámara de perfusión, se perfundió por gravedad el nuevo medio hasta que se perfundió un 200% del volumen de la cámara anterior. El registro de la C se reanudó tras la nueva estabilización del flujo.

### *Medios de cultivo y soluciones*

En este estudio se utilizaron principalmente dos tipos de medio, uno para la conservación de los ojos enucleados y otro para los experimentos propiamente dichos como medio de perfusión.

Tras la enucleación del ojo, este se sumergió en PBS (17-512F, Bio-Whittaker), a pH 7.42, al cual se le habían añadido previamente antibióticos: penicilina 50 UI/ml (A-2213, Seromed-Biochrom), estreptomina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (A-2213, Seromed-Biochrom) y anfotericina B 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (295876, Boehringer mannheim). Los ojos enucleados se mantuvieron a 4°C hasta llegar al laboratorio donde se realizó la disección en condiciones estériles.

El medio utilizado para la perfusión fue DMEM (12-733F, Bio-Whittaker) para cultivo de células, ajustado a un pH de 7.42 y a una osmolalidad de 300 mOs/Kg. También se le añadieron los antibióticos anteriormente mencionados: penicilina 50 UI/ml (A-2213, Seromed-Biochrom), estreptomina 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (A-2213, Seromed-Biochrom) y anfotericina B 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (295876, Boehringer mannheim).

### Análisis de los datos

El parámetro utilizado en este estudio es la *facilidad de evacuación (C)*, que representa la relación entre el flujo en  $\mu\text{l}/\text{min}$  y la presión de perfusión ( $\approx 10 \text{ mmHg}$ ).

$$\text{Facilidad de evacuación (C)} = \frac{\mu\text{l medio filtrados / minuto}}{\text{presión de perfusión (mm Hg)}}$$

Tomando como  $C$  basal ( $C_0$ ) el promedio de los valores que se obtuvieron en el periodo de perfusión basal, en cada experimento individual, se calcularon la relación entre  $C_0$  y la facilidad en presencia de droga ( $C_d$ ) o en el periodo de retorno a las condiciones iniciales ( $C_{pd}$ ). Con esto se obtuvieron las relaciones  $C_d/C_0$  y  $C_{pd}/C_0$  que se utilizan para la representación gráfica de los datos.

La utilización de la relación entre los valores de facilidad en lugar de la propia facilidad de evacuación para realizar los promedios y las comparaciones estadísticas permite minimizar las diferencias interindividuales entre los diferentes animales y obtener datos que permiten comparar grupos con distintos tratamientos.

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM

Otro parámetro utilizado para el análisis de los datos fue el Area Bajo la Curva (AUC). En este caso, el cálculo de este parámetro para el periodo de perfusión con droga permitió comparar los efectos de diferentes agonistas/antagonistas. Los resultados se expresan como el porcentaje respecto a la perfusión control (100%).

### 3.7. Fármacos y sustancias utilizadas

Los fármacos o drogas utilizadas en este estudio se muestran en la tabla adjunta, así como su modo de acción y su obtención.

Tabla 3.1 *Fármacos y drogas utilizadas*

Droga	acción	concentraciones utilizadas	referencia	obtención
<i>Agonistas</i>				
Epinefrina	No selectivo	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-4</sup> M	E-4375	Sigma Co.
Norepinefrina	No selectivo	10 <sup>-8</sup> -10 <sup>-4</sup> M	A-9512	Sigma Co.
Metoxamina	α <sub>1</sub>	10 <sup>-8</sup> y 10 <sup>-6</sup> M	M-6524	Sigma Co.
Fenilefrina	α <sub>1</sub>	10 <sup>-4</sup> M	P-6126	Sigma Co.
Dexmedetomidina	α <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup> y 10 <sup>-4</sup> M	-	Orion Pharma
Isoproterenol	β <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup> M	I-5927	Sigma Co.
Procaterol	β <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup> y 10 <sup>-4</sup> M	P-9180	Sigma Co.
Prostaglandina E <sub>2</sub>	E <sub>1</sub> y E <sub>2</sub>	10 <sup>-8</sup> M	P-4172	Sigma Co.
<i>Antagonistas</i>				
Prazosin	α <sub>1</sub>	10 <sup>-5</sup> M	P-7791	Sigma Co.
Yohimbina	α <sub>2</sub>	10 <sup>-5</sup> M	Y-3125	Sigma Co.
Indometacina	COX	10 <sup>-6</sup> M	I-7378	Sigma Co.
<i>Mediadores intracelulares</i>				
Forskolina	Activador AC	10 <sup>-6</sup> y 10 <sup>-5</sup> M	F-6886	Sigma Co.
Isobutimetilxantina (IBMX)	Inhibidor PDE	10 <sup>-6</sup> M	I-5879	Sigma Co.
dibutiril-cAMP	análogo cAMP	10 <sup>-7</sup> y 10 <sup>-6</sup> M	D-0627	Sigma Co.

Abreviaciones: α<sub>1</sub>=receptor α<sub>1</sub> adrenérgico; α<sub>2</sub>=receptor α<sub>2</sub> adrenérgico; β<sub>2</sub>=receptor β<sub>2</sub> adrenérgico; E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>=receptores de prostaglandinas E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>; COX=ciclooxigenasa; AC=adenilato ciclasa; PDE=fosfodiesterasa; cAMP=adenosin monofosfato ciclico.

### *Otras sustancias utilizadas*

En este estudio se utilizaron disolventes como el etanol (983, Merck) o el dimetilsulfóxido (DMSO) (D-5879, Sigma España) para mejorar la disolución de algunas drogas previamente a su disolución final en el medio en el que se realizaron los experimentos.

### 3.8. Métodos estadísticos

El análisis estadístico se realizó mediante varios tipos de pruebas:

Para las comparaciones estadísticas entre puntos, dentro del mismo protocolo, se utilizó un test de análisis de la varianza (ANOVA) para datos apareados y se aplicó la corrección de Bonferroni. Las diferencias significativas se establecieron en p<0.05 (\*), p<0.01 (\*\*) y p<0.001 (\*\*\*).

Para las comparaciones estadísticas entre puntos homólogos de dos protocolos diferentes, se utilizó un test de análisis de la varianza (ANOVA) ordinario al que se aplicó la corrección de Bonferroni. Las diferencias significativas se establecieron en  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*).

En los experimentos de registro del calcio intracelular, de los cambios morfométricos celulares, o en los casos en que se compararon únicamente dos parámetros, se utilizaron los tests de Fisher o de la *t* de Student, como se detalla en las tablas de resultados. Las significaciones se establecieron en los mismos valores que los anteriores.



# **RESULTADOS**

---



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efectos adrenérgicos sobre las vías de evacuación del humor acuoso

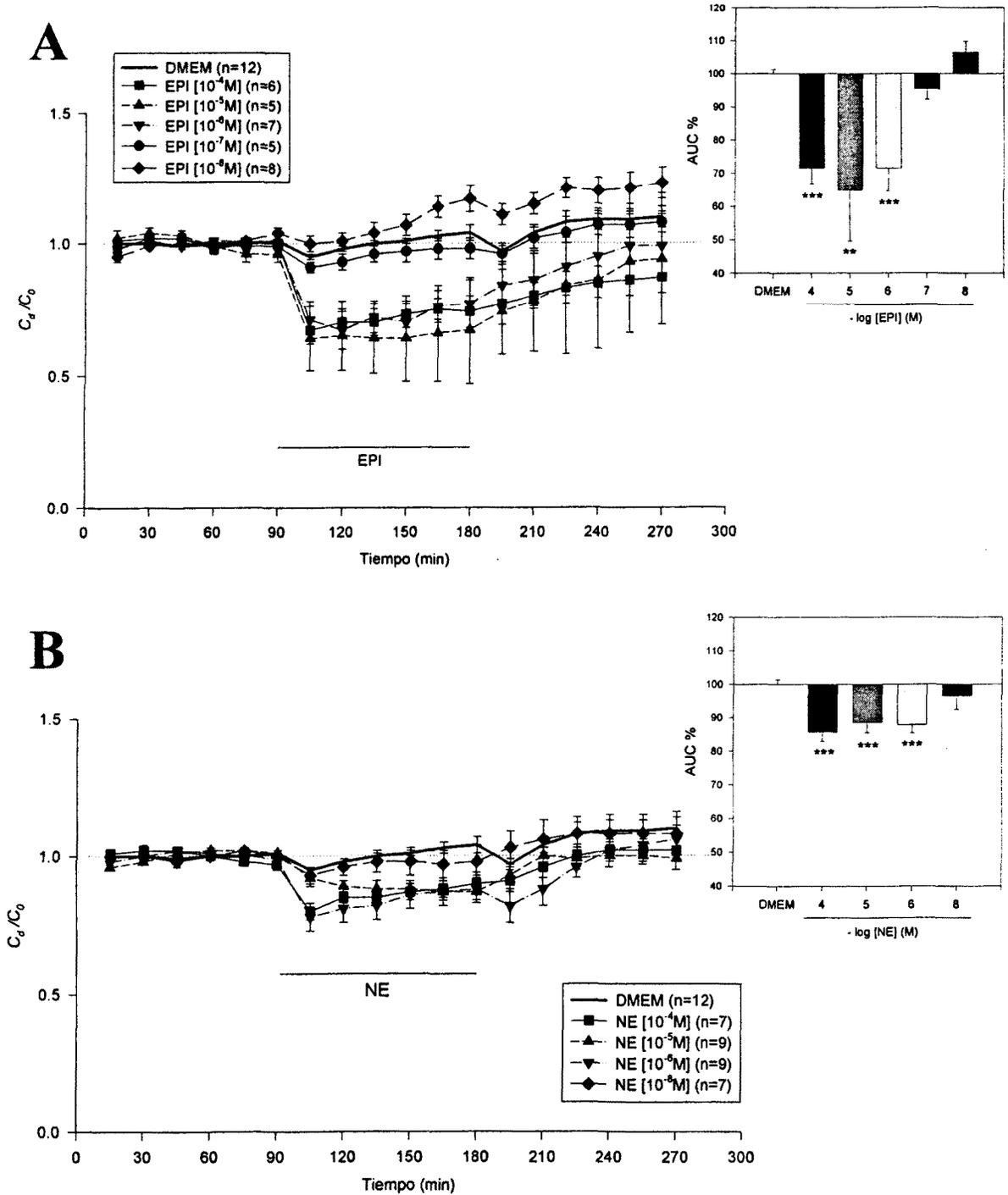
#### 4.1.1. Efectos sobre la facilidad de evacuación

Para establecer las condiciones control, se realizó un grupo de experimentos en los que se utilizó el mismo protocolo experimental pero se mantuvo el medio de perfusión (DMEM) durante todo el protocolo (Tabla 4.1 y Fig. 4.1). En este grupo no se observaron modificaciones significativas en la facilidad de evacuación (*C*) a lo largo del protocolo.

##### 4.1.1.1. Epinefrina y Norepinefrina

EPI y NE entre  $10^{-7}$  y  $10^{-4}$ M disminuyeron la *C* en los segmentos anteriores bovinos perfundidos *in vitro* de manera dosis dependiente (Tabla 4.1 y Fig. 4.1A y B). La NE no mostró efectos significativos sobre la *C* a concentraciones inferiores a  $10^{-6}$ M, obteniéndose la máxima reducción de la *C* a  $10^{-4}$  M (Tabla 4.1 y Fig. 4.1B). La EPI indujo la máxima reducción en la *C* a  $10^{-5}$ M. Por otra parte, la concentración menor de EPI ( $10^{-8}$ M) produjo un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) en la *C* (Tabla 4.1 y Fig. 4.1A) tanto en el periodo en presencia de la droga (17%) como en el periodo post droga (23%).

Las disminuciones en la *C* observadas tras la EPI o la NE mostraron cinéticas similares en todos los grupos experimentales (Fig. 4.1A y B). La *C* mostró una reducción rápida del 20-30% del nivel basal tras 15 minutos de perfusión con la droga. Los valores basales se recuperaron progresivamente tras finalizar el periodo con droga. El análisis del *área bajo la curva* (AUC) para el periodo de la droga se muestra en las gráficas insertadas en la figura 4.1A y 4.1B. Cuando se compararon los valores de AUC a las diferentes concentraciones de EPI y NE ( $10^{-4}$  a  $10^{-6}$ M) con el mismo periodo en el grupo control, se encontraron diferencias estadísticamente significativas. A concentraciones menores a las anteriores, ni EPI ni NE mostraron diferencias respecto al grupo control.



**Fig 4.1** Efecto de las diferentes concentraciones de EPI (A) y NE (B) sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso. En ordenadas se muestra la relación entre la facilidad de evacuación en cada punto ( $C_d$ ) y la facilidad de evacuación basal ( $C_0$ ). En abscisas se muestra el tiempo en minutos. Las gráficas insertadas muestran el área bajo la curva (AUC) para cada concentración respecto al control (DMEM; 100%) y las diferencias estadísticas respecto a la perfusión control.

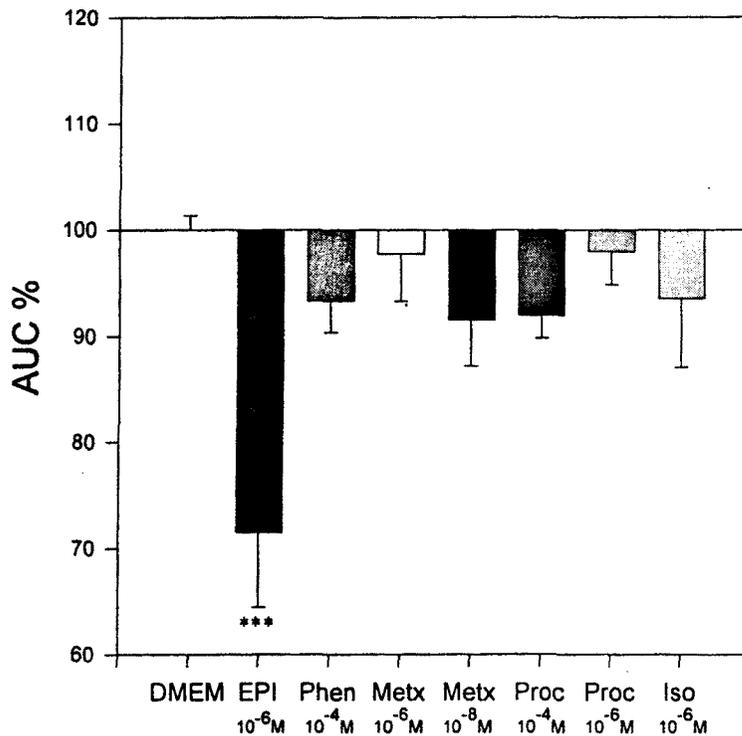
**Tabla 4.1 Efectos de Epinefrina (EPD) y Norepinefrina (NE) sobre la facilidad de evacuación.**

Droga y concentración	n	Basal ( $C_0$ ) Media	periodo con droga ( $C_d$ )			Periodo post droga ( $C_{pd}$ )	
			15	60	90	90	(Min)
Control (DMEM)	12	0.83±0.001 (100%)	0.79±0.08 (95%)	0.84±0.08 (101%)	0.86±0.08 (104%)	0.90±0.09 (110%)	
EPI 10 <sup>-8</sup> M	8	0.70±0.008 (100%)	0.70±0.08 (100%)	0.76±0.10 (107%)	0.83±0.12 (117%) <sup>†</sup>	0.88±0.13 (123%) <sup>†</sup>	
EPI 10 <sup>-7</sup> M	5	0.79±0.005 (100%)	0.72±0.13 (91%) <sup>†</sup>	0.77±0.14 (97%)	0.78±0.15 (98%)	0.86±0.16 (108%) <sup>*</sup>	
EPI 10 <sup>-6</sup> M	7	0.72±0.005 (100%)	0.49±0.04 (71%) <sup>†,§</sup>	0.50±0.06 (70%) <sup>†,  </sup>	0.55±0.07 (77%) <sup>†,  </sup>	0.72±0.11 (99%)	
EPI 10 <sup>-5</sup> M	5	0.71±0.007 (100%)	0.40±0.06 (64%) <sup>*</sup>	0.40±0.08 (64%) <sup>§</sup>	0.42±0.10 (67%) <sup>§</sup>	0.64±0.19 (94%)	
EPI 10 <sup>-4</sup> M	6	0.93±0.006 (100%)	0.63±0.11 (67%) <sup>†,  </sup>	0.66±0.12 (73%) <sup>†,  </sup>	0.70±0.14 (74%) <sup>†,  </sup>	0.81±0.15 (87%) <sup>*,  </sup>	
NE 10 <sup>-8</sup> M	7	0.66±0.003 (100%)	0.61±0.07 (93%)	0.64±0.08 (98%)	0.63±0.08 (98%)	0.70±0.08 (108%)	
NE 10 <sup>-6</sup> M	9	0.78±0.004 (100%)	0.58±0.06 (78%) <sup>†,§</sup>	0.64±0.07 (86%) <sup>†</sup>	0.66±0.07 (88%) <sup>*,§</sup>	0.79±0.08 (106%)	
NE 10 <sup>-5</sup> M	9	0.82±0.008 (100%)	0.74±0.09 (92%)	0.71±0.10 (88%) <sup>†,§</sup>	0.71±0.11 (87%) <sup>†,  </sup>	0.82±0.13 (99%)	
NE 10 <sup>-4</sup> M	7	0.63±0.006 (100%)	0.50±0.06 (80%) <sup>†,§</sup>	0.55±0.07 (87%) <sup>†,§</sup>	0.57±0.08 (90%) <sup>†,§</sup>	0.65±0.09 (102%)	

$C_0$  = facilidad de evacuación basal;  $C_d$  = facilidad de evacuación en presencia de droga;  $C_{pd}$  = facilidad de evacuación post droga. Los datos se muestran como media±SEM; n = número de ojos. El promedio de la relación  $C_d/C_0$  o  $C_{pd}/C_0$  se muestra en paréntesis. Para todos los grupos se realizó el análisis de la varianza con la corrección de Bonferroni entre  $C_0$  y  $C$  cada 15 minutos. Las significaciones se establecieron a: (†) p<0.05, (‡) p<0.01 y (§) p<0.001. Además, las comparaciones entre las relaciones  $C_d/C_0$  y  $C_{pd}/C_0$  en los grupos tratados vs. los mismos parámetros ( $C_d/C_0$  y  $C_{pd}/C_0$ ) para el grupo control (DMEM) se realizaron mediante el test de la t de Student despareado con la corrección Bonferroni. La significación se estableció en: (‡) p<0.05, (†) p<0.01 y (§) p<0.001.

4.1.1.2. Agonistas  $\beta_2$ 

La perfusión con Isoproterenol o Procatrol (ambos a  $10^{-6}M$ ) no modificó la C ni en el periodo con droga ni en el periodo post droga (Tabla 4.2 y Fig. 4.2). Tampoco la perfusión con Procatrol a la concentración  $10^{-4}M$  (para inducir un posible efecto máximo) modificó la C significativamente.



**Fig 4.2** Efecto de los diferentes agonistas  $\beta_2$  y  $\alpha_1$ -adrenérgicos sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso. Se muestra el área bajo la curva (AUC) para cada concentración respecto al control (DMEM; 100%). Se ha añadido el efecto de la EPI con finalidad comparativa. Phen=fenilefrina; Metx=metoxamina; Proc=procatrol; Iso=isoproterenol.

**Tabla 4.2 Efectos de los agonistas  $\beta_2$  y  $\alpha_1$  adrenérgicos sobre la facilidad de evacuación.**

Droga y concentración	n	Periodo con droga ( $C_d$ )			Periodo post droga ( $C_{pd}$ )	
		Basal ( $C_0$ ) Media	15	60	90	90 (Min)
<b>Agonistas <math>\beta_2</math>-adrenérgicos</b>						
Procaterol $10^{-6}$ M	9	0.85±0.003 (100%)	0.74±0.08 (90%)	0.85±0.10 (100%)	0.85±.11 (101%)	0.89±0.12 (104%)
Procaterol $10^{-4}$ M	7	0.95±0.007 (100%)	0.85±0.06 (91%)	0.87±0.07 (92%)	0.89±0.07 (93%)	1.06±0.09 (112%)
Isoproterenol $10^{-6}$ M	6	0.66±0.004 (100%)	0.61±0.05 (93%)	0.60±0.06 (91%)	0.67±0.06 (103%)	0.69±0.06 (106%)
<b>Agonistas <math>\alpha_1</math>-adrenérgicos</b>						
Fenilefrina $10^{-4}$ M	5	0.66±0.006 (100%)	0.61±0.05 (92%)	0.61±0.06 (92%)	0.63±0.05 (96%)	0.67±0.04 (102%)
Metoxamina $10^{-8}$ M	4	0.62±0.01 (100%)	0.59±0.09 (96%)	0.60±0.11 (94%)	0.59±0.11 (92%)	0.59±0.09 (95%)
Metoxamina $10^{-6}$ M	12	0.61±0.005 (100%)	0.64±0.06 (107%)	0.59±0.06 (97%)	0.59±0.07 (96%)	0.56±0.06 (93%) <sup>§</sup>

$C_0$  = facilidad de evacuación basal;  $C_d$  = facilidad de evacuación en presencia de droga;  $C_{pd}$  = facilidad de evacuación post droga. Los datos se muestran como media±SEM; n = número de ojos. El promedio de la relación  $C_d/C_0$  o  $C_{pd}/C_0$  se muestra en paréntesis. Las comparaciones entre las relaciones  $C_d/C_0$  y  $C_{pd}/C_0$  en los grupos tratados vs. los mismos parámetros ( $C_d/C_0$  y  $C_{pd}/C_0$ ) para el grupo control (DMEM) se realizaron mediante el test de la t de Student desapareado con la corrección Bonferroni. La significación se estableció en: (<sup>§</sup>) p<0.05.

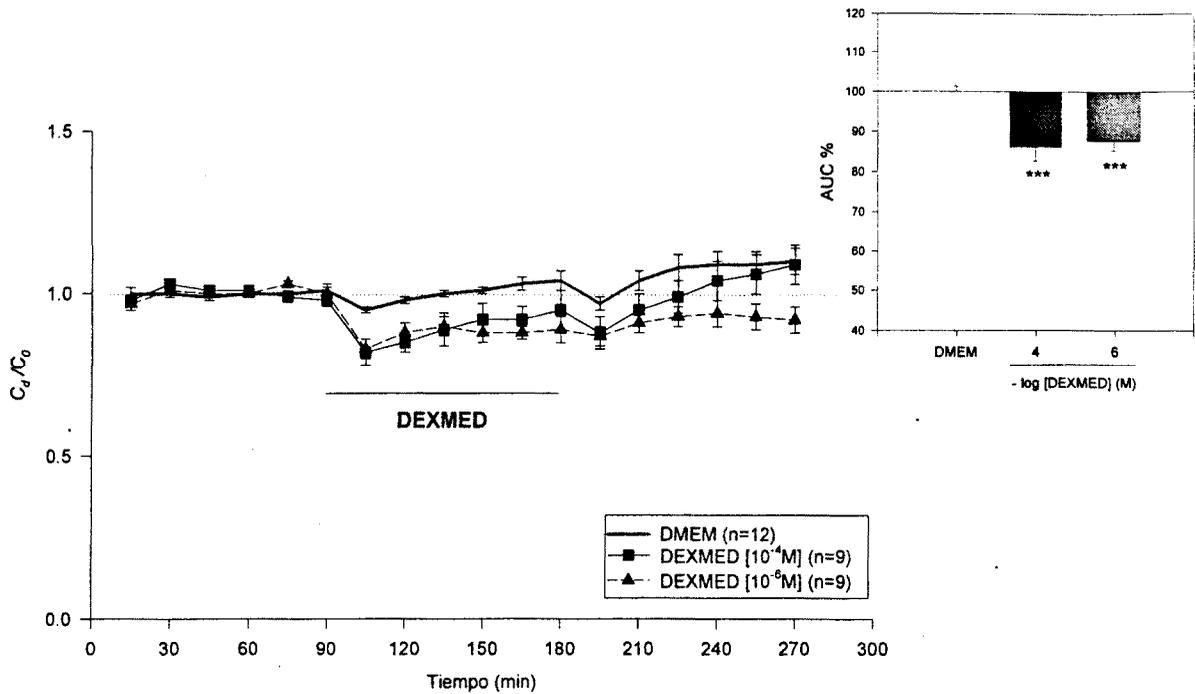
#### 4.1.1.3. Agonistas $\alpha_1$

Igual que en el caso anterior, la metoxamina (METX) ( $10^{-8}$  y  $10^{-6}$ M) no modificó significativamente la C basal durante el periodo de la droga (Tabla 4.2 y Fig. 4.2). Solamente al final del periodo post droga, la METX a la concentración de  $10^{-6}$ M disminuyó significativamente la C ( $p < 0.05$ ). Como la METX puede tener una baja afinidad por los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, se utilizó la fenilefrina (PHEN) que tiene una selectividad mayor por los agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos. PHEN se utilizó a la concentración de  $10^{-4}$ M para inducir un posible efecto máximo pero no se observaron cambios significativos en la C ni durante el periodo con la droga ni en el periodo de retorno a las condiciones basales (Tabla 4.2 y Fig. 4.2).

#### 4.1.1.4. Agonistas $\alpha_2$

En este estudio se utilizó la dexmedetomidina (DEXMED) como agonista selectivo de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos a las concentraciones de  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$ M (Tabla 4.3 y Fig. 4.3). Tras 15 minutos de perfusión con DEXMED ( $10^{-6}$ M) la C disminuyó al 83% ( $p < 0.001$ ) del nivel basal (100%). Durante todo el periodo con droga y también durante el periodo post droga, la C permaneció por debajo de los valores del grupo control ( $p < 0.001$ ). Para inducir un efecto máximo se utilizó la DEXMED a la concentración de  $10^{-4}$ M. Para esta concentración no se obtuvieron diferencias significativas respecto a la concentración de  $10^{-6}$ M y se observó una reducción de la C similar (Tabla 4.3 y Fig. 4.3). Los valores de AUC para ambas concentraciones de DEXMED en el periodo con droga comparados con el valor control se muestran en la gráfica insertada en la figura 4.3. La AUC para las dos concentraciones de DEXMED fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) cuando se comparó con la perfusión control.

Tanto el Prazosin (PRAZ;  $10^{-5}$ M; antagonista adrenérgico  $\alpha_1/\alpha_2$ ) como la Yohimbina (YOH;  $10^{-5}$ M; antagonista selectivo  $\alpha_2$ ) bloquearon el efecto inducido por DEXMED  $10^{-6}$ M (Fig. 4.4). Los efectos sobre la C de PRAZ + DEXMED o YOH + DEXMED comparados con la DEXMED  $10^{-6}$ M se muestran como AUC en la gráfica insertada en la figura 4.4 ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$  respectivamente). No se encontraron diferencias significativas cuando se compararon estos grupos con el grupo control.

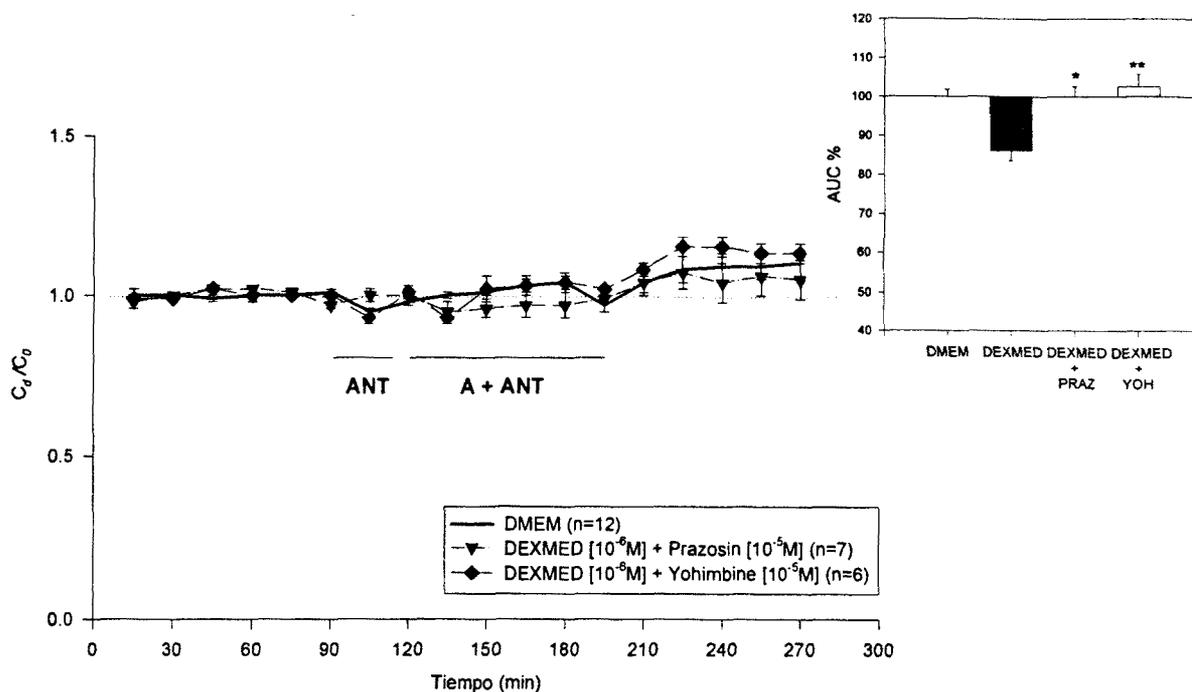


**Fig 4.3** Efecto del agonista selectivo  $\alpha_2$ -adrenérgico dexmedetomidina (DEXMED) sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso. En ordenadas se muestra la relación entre la facilidad de evacuación en cada punto ( $C_d$ ) y la facilidad de evacuación basal ( $C_0$ ). En abcisas se muestra el tiempo en minutos. La gráfica insertada muestra el área bajo la curva (AUC) para cada concentración respecto al control (DMEM; 100%) y las diferencias estadísticas respecto a la perfusión control.

Tabla 4.3 Efectos de los agonistas  $\alpha_2$  adrenérgicos sobre la facilidad de evacuación.

Droga y concentración	n	Periodo con droga ( $C_d$ )			Periodo post droga ( $C_{pd}$ )	
		Basal ( $C_0$ )	15	60	90	90 (Min)
<b>Agonistas <math>\alpha_2</math>-adrenérgicos</b>						
DEXMED $10^{-6}$ M	9	0.63±0.006 (100%)	0.51±0.05 (83%) <sup>†</sup>	0.55±0.06 (88%) <sup>†,§</sup>	0.56±0.07 (89%) <sup>†,  </sup>	0.58±0.08 (92%) <sup>†</sup>
DEXMED $10^{-4}$ M	9	0.65±0.006 (100%)	0.53±0.08 (82%) <sup>†,  </sup>	0.59±0.07 (92%)	0.61±0.09 (95%)	0.69±0.08 (109%) <sup>*</sup>

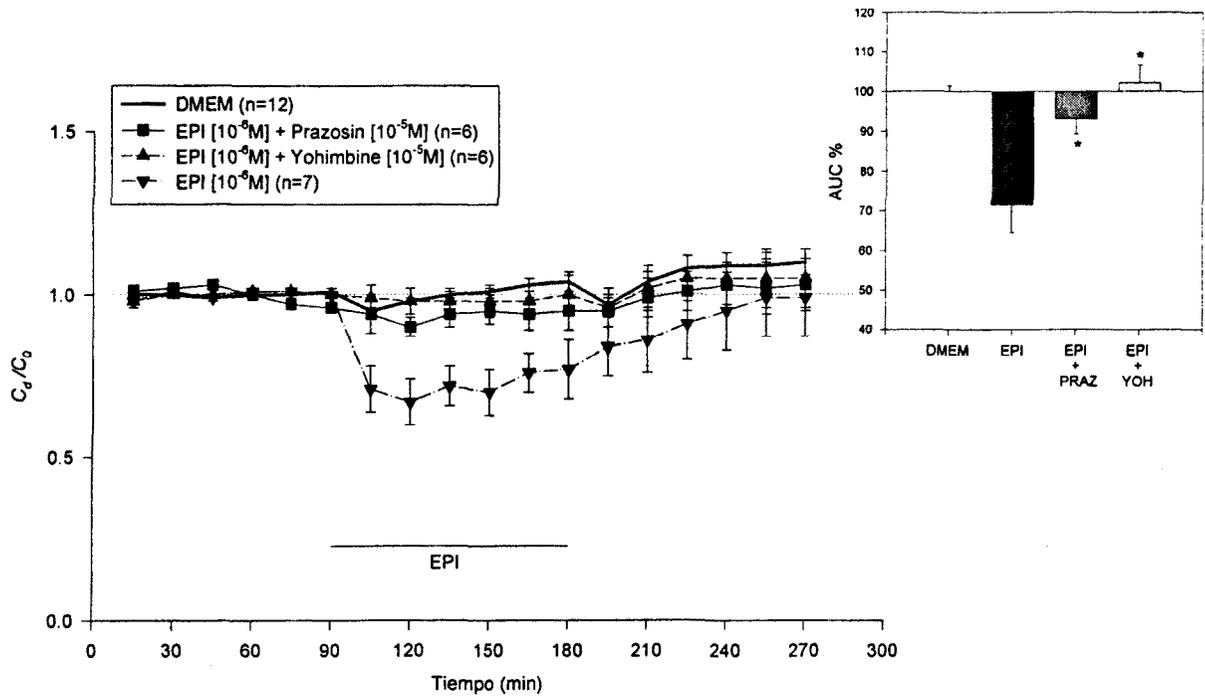
$C_0$  = facilidad de evacuación basal;  $C_d$  = facilidad de evacuación en presencia de droga;  $C_{pd}$  = facilidad de evacuación post droga. Los datos se muestran como media±SEM; n = número de ojos. El promedio de la relación  $C_d/C_0$  o  $C_{pd}/C_0$  se muestra en paréntesis. Para todos los grupos se realizó el análisis de la varianza con la corrección de Bonferroni entre  $C_0$  y C cada 15 minutos. Las significaciones se establecieron a: (†)  $p < 0.05$ , (†)  $p < 0.01$  y (†)  $p < 0.001$ . Además, las comparaciones entre las relaciones  $C_d/C_0$  y  $C_{pd}/C_0$  en los grupos tratados vs. los mismos parámetros ( $C_d/C_0$  y  $C_{pd}/C_0$ ) para el grupo control (DMEM) se realizaron mediante el test de la t de Student desapareado con la corrección Bonferroni. La significación se estableció en: (‡)  $p < 0.05$ , (‡)  $p < 0.01$  y (‡)  $p < 0.001$ . DEXMED = Dexmedetomidina



**Fig 4.4** Bloqueo de los efectos del agonista selectivo  $\alpha_2$ -adrenérgico dexmedetomidina (DEXMED) sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso. En ordenadas se muestra la relación entre la facilidad de evacuación en cada punto ( $C_d$ ) y la facilidad de evacuación basal ( $C_0$ ). En abcisas se muestra el tiempo en minutos. A=agonista (DEXMED); ANT=antagonista. La gráfica insertada muestra el área bajo la curva (AUC) para cada grupo respecto al control (DMEM; 100%) y las diferencias estadísticas respecto a la perfusión control. Se ha añadido el efecto de la DEXMED con finalidad comparativa.

#### 4.1.1.5. Bloqueo de los efectos de Epinefrina

Se utilizó la concentración de  $10^{-6}M$  de EPI ya que fue la concentración más baja capaz de inducir un efecto máximo en la C. Ni PRAZ ni YOH modificaron la C basal por si mismos cuando se añadieron a la perfusión desde el inicio. Igual que en el estudio anterior, tanto PRAZ como YOH (ambas a  $10^{-5}M$ ) bloquearon completamente el efecto inducido por EPI  $10^{-6}M$  (Fig. 4.5). Los efectos sobre la C de PRAZ + EPI o YOH + EPI comparados con la EPI  $10^{-6}M$  se muestran como AUC en la gráfica insertada en la figura 4.5 ( $p < 0.05$  en ambos casos). No se encontraron diferencias significativas cuando se compararon estos grupos con el grupo control.



**Fig 4.5** Bloqueo de los efectos de la EPI sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso. En ordenadas se muestra la relación entre la facilidad de evacuación en cada punto ( $C_d$ ) y la facilidad de evacuación basal ( $C_o$ ). En abscisas se muestra el tiempo en minutos. La gráfica insertada muestra el área bajo la curva (AUC) para cada grupo respecto al control (DMEM; 100%) y las diferencias estadísticas respecto a la perfusión con EPI. Se ha añadido el efecto de la EPI con finalidad comparativa.

#### 4.1.2. Efectos sobre el calcio intracelular de la célula trabecular

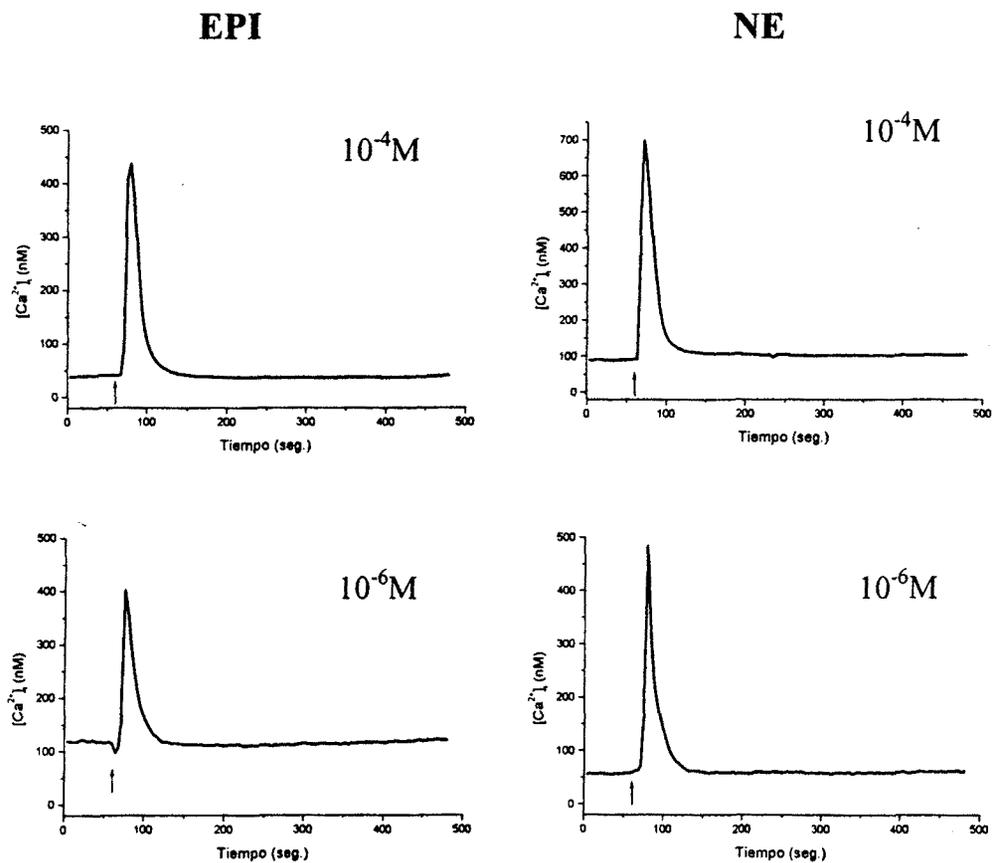
En un total de 140 células tomadas como grupo control, se evaluaron los efectos de la aplicación de un *bolus* (20 $\mu$ l) de tampón de incubación en la cámara de registro con el fin de establecer la respuesta espontánea debido a las manipulaciones propias de la preparación. Los niveles basales de  $[Ca^{2+}]_i$  en las células trabeculares bovinas fue de  $76\pm 7$  nM (media $\pm$ SD; n= 140). Con este procedimiento, el porcentaje de respuesta espontánea fue del 4%, obteniéndose respuestas significativas en 6 de las 140 células estudiadas (Tabla 4.4).

##### 4.1.2.1. Epinefrina y Norepinefrina

Los efectos de EPI y NE se estudiaron en un rango de concentraciones desde  $10^{-8}$ M a  $10^{-4}$ M. Mientras que no se obtuvieron respuestas significativas a la concentración de  $10^{-8}$ M en ninguno de los dos casos, el porcentaje de respuesta de las células trabeculares a las concentraciones de EPI y NE (de  $10^{-6}$  M a  $10^{-4}$  M) estuvo entre el 12% ( $10^{-6}$ M;  $p<0.05$ ) y el 42% ( $10^{-4}$ M;  $p<0.001$ ) (Tabla 4.4). La figura 4.6 muestra los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  típicos encontrados en el estudio. La amplitud de los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  varió entre 346 y 430 nM para la EPI y entre 323 a 601 nM para la NE (Tabla 4.4).

El porcentaje de respuesta positiva a la NE fue mayor que para la EPI a la misma concentración (Tabla 4.4). Además, la amplitud de los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a NE  $10^{-4}$ M fueron mayores que para EPI (Tabla 4.4). La Figura 4.6 muestra las movilizaciones del  $[Ca^{2+}]_i$  inducidas tras la aplicación de NE,  $10^{-4}$ M ( $601\pm 46$  nM; media $\pm$ SD) y  $10^{-6}$ M ( $323\pm 16$  nM).

Durante el tiempo en el que se registró el  $[Ca^{2+}]_i$  tras la aplicación de la droga, algunas células trabeculares mostraron un patrón de  $[Ca^{2+}]_i$  oscilatorio. Estas oscilaciones de calcio se observaron a todas las concentraciones de EPI y NE en las que se obtuvo una respuesta significativa a la aplicación de la droga (Fig. 4.7). El porcentaje de oscilaciones estuvo entre el 11 y el 41% según la concentración de la droga utilizada. Es de interés observar que, mientras el porcentaje de células con patrón oscilatorio incrementó de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  M, éste fue menor a  $10^{-4}$ M tanto para la EPI como para la NE (Tabla 4.4). Este efecto probablemente se debe a una desensibilización del receptor. En todos los casos, el número de oscilaciones incrementó al aumentar la concentración de la droga (Fig. 4.7).

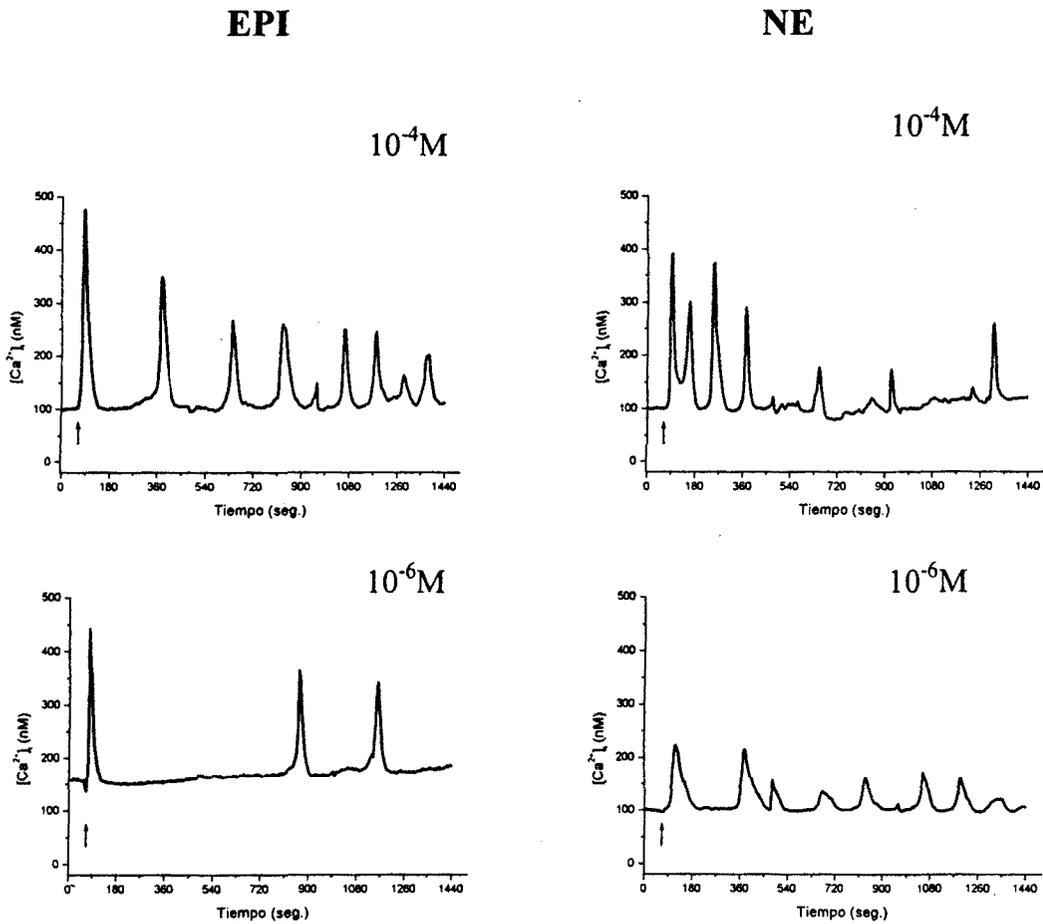


**Fig 4.6** Mobilizaciones del  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a diferentes concentraciones de EPI y NE en células trabeculares. En ordenadas se muestra la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  en nM y en abscisas el tiempo en segundos. La flecha en cada una de las gráficas muestra el punto de aplicación de la droga

**Tabla 4.4 Efectos de Epinefrina y Norepinefrina sobre el  $[Ca^{2+}]_i$  en células trabeculares en cultivo.**

Droga y Concentración	No. Respuestas/ células analizadas	% respuesta	$[Ca^{2+}]_i$ basal (nmol/L)	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)	Células que mostraron respuesta	
					$2^\circ \Delta [Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)	Oscilaciones de calcio % 2 <sup>os</sup> picos
Control (tampón)	6/140	4%	76±7	248±13	---	---
EPI 10 <sup>-8</sup> M	2/58	3%	83±12	219±24	---	---
EPI 10 <sup>-6</sup> M	17/140*	12%	86±11	346±44	299±22	29%
EPI 10 <sup>-5</sup> M	22/96 <sup>†,§</sup>	23%	88±4	426±43 <sup>  </sup>	362±56	41%
EPI 10 <sup>-4</sup> M	45/126 <sup>†,  </sup>	36%	87±9	430±21 <sup>  </sup>	302±74	12%
NE 10 <sup>-8</sup> M	2/64 <sup>†</sup>	3%	90±24	151±40 <sup>  </sup>	---	---
NE 10 <sup>-6</sup> M	63/213 <sup>†</sup>	30%	77±10	323±16	285±3 <sup>‡</sup>	11%
NE 10 <sup>-5</sup> M	49/183 <sup>†</sup>	27%	82±14	416±55	229±19	41%
NE 10 <sup>-4</sup> M	41/98 <sup>†,§</sup>	42%	73±2	601±46 <sup>‡</sup>	197±12	15%

Los datos se muestran como media±SEM. EPI = epinefrina; NE = norepinefrina. Los símbolos (\*) p<0.05 y (†) p<0.001 muestran las significaciones para las comparaciones entre cada grupo y el grupo control. Los símbolos (‡) p<0.05, (¶) p<0.001 muestran las significaciones entre la EPI a cada concentración y la EPI a la concentración de 10<sup>-6</sup>M o entre las diferentes concentraciones de NE y la concentración de 10<sup>-6</sup>M. Las comparaciones se realizaron mediante el test de Fisher. Los símbolos (¶) p<0.05 y (†) p<0.01 muestran las comparaciones entre los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  de cada grupo y el grupo control. Las comparaciones se realizaron mediante el test de la *t* de Student despareado. La presencia de oscilaciones de calcio fue evaluada durante los 7 minutos posteriores a la aplicación de la droga.



**Fig 4.7** Oscilaciones del  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a diferentes concentraciones de EPI y NE. en células trabeculares En ordenadas se muestra la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  en nM y en abcisas el tiempo en segundos. La flecha en cada una de las gráficas muestra el punto de aplicación de la droga

*Cinética de los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$* 

En todas las concentraciones estudiadas, tanto para la EPI como para la NE, los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  mostraron perfiles similares. En todos los casos, la movilización del  $[Ca^{2+}]_i$  mostró una fase de incremento rápido hasta alcanzar un pico máximo en pocos segundos. Posteriormente, los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$  recuperaron los valores basales de manera gradual (ver Figuras 4.6 y 4.7). Para estudiar la cinética de los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  se calculó el tiempo desde los valores de calcio basal hasta el pico de calcio ( $T_{pico}$ ) y el tiempo desde el pico hasta que se recuperó el 70% del valor basal de  $[Ca^{2+}]_i$  ( $T_{70}$ ) (Tabla 4.5). Los valores de  $T_{pico}$  para la EPI ( $n=60$ ) y la NE ( $n=41$ ) a  $10^{-4}M$  fueron de  $17.5\pm 1.2$  s y  $15.8\pm 1.7$  s respectivamente, mientras que los valores de  $T_{70}$  fueron  $21.7\pm 1.2$  s y  $25.8\pm 3.4$  s (media $\pm$ SEM). A la concentración de  $10^{-5}M$ , se obtuvieron valores similares de  $T_{70}$  tanto para EPI ( $22.4\pm 2.8$  s;  $n=22$ ) como para NE ( $30.9\pm 2.9$  s;  $n=49$ ). En cambio, comparando con los valores a la concentración de  $10^{-4}M$ , los valores de  $T_{pico}$  para EPI y NE a  $10^{-5}M$  fueron mayores:  $52.7\pm 7.0$  s y  $28.1\pm 6.0$  s.

**Tabla 4.5 Características de los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por Epinefrina y Norepinefrina.**

<b>Droga</b>	<b>Concentración</b>	<b><i>n</i></b>	<b><math>T_{pico}</math> (s)</b>	<b><math>T_{70}</math> (s)</b>
Epinefrina	$10^{-5}M$	22	$52.7\pm 7.0$	$22.4\pm 2.8$
Epinefrina	$10^{-4}M$	60	$17.5\pm 1.2$	$21.7\pm 1.2$
Norepinefrina	$10^{-5}M$	49	$28.1\pm 6.0$	$30.9\pm 2.9$
Norepinefrina	$10^{-4}M$	41	$15.8\pm 1.7$	$25.8\pm 3.4$

Los datos se muestran como media $\pm$ SEM;  $n$  = número de células analizadas.  $T_{pico}$ =tiempo transcurrido desde la aplicación de la droga hasta el pico de calcio;  $T_{70}$ =tiempo desde el pico hasta la recuperación del 70% del valor basal de calcio.

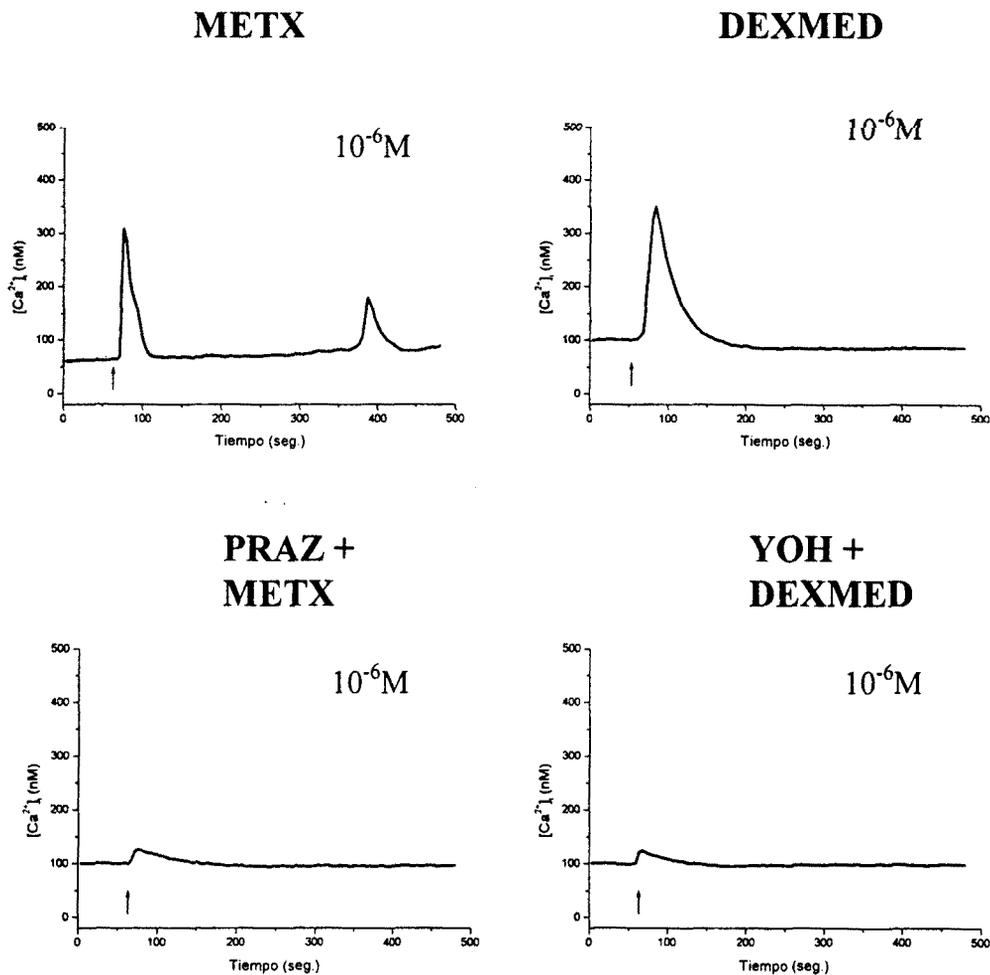
#### 4.1.2.2. Agonistas $\beta_2$

Aunque, teóricamente, los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos están ligados a la síntesis de AMPc y no modifican los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$ , se ensayó la estimulación con procaterol  $10^{-6}M$  en las células trabeculares en cultivo. El valor de  $[Ca^{2+}]_i$  basal medio de los experimentos realizados fue de  $72 \pm 16$  nM (media  $\pm$  SD; n=55). La estimulación con procaterol no produjo incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  significativos en ninguna de las 55 células estudiadas. En ninguno de los experimentos se encontraron cambios de la forma celular significativos. Los resultados muestran que los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos no movilizan el  $[Ca^{2+}]_i$  o no están presentes en las células trabeculares bovinas.

#### 4.1.2.3. Agonistas $\alpha_1$ y $\alpha_2$

La cinética de los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  que se encontraron tras la estimulación de las células trabeculares con METX y DEXMED fue similar a la encontrada anteriormente para la EPI y la NE. Ambas drogas, a la concentración de  $10^{-6}M$ , produjeron incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  en el 55% (49 de 89 células) y el 49% (31 de 63 células) de las células trabeculares, respectivamente. (Tabla 4.5 y Fig. 4.8). La media de los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  para los experimentos con METX fue de  $313 \pm 18$  nM (calcio basal,  $56 \pm 5$  nM) y para los experimentos con DEXMED fue de  $260 \pm 10$  nM (calcio basal,  $71 \pm 9$  nM) (Tabla 4.6). Ambas drogas indujeron oscilaciones de calcio en las células trabeculares. Este patrón en el  $[Ca^{2+}]_i$  se observó en el 43% de las células que respondieron significativamente a METX y en el 30% de las que respondieron a DEXMED (Fig. 4.9).

Los efectos de ambas drogas fueron bloqueados con la incubación previa de un agonista específico (Tabla 4.6 y Fig. 4.8). La incubación con PRAZ  $10^{-5} M$  (n=30 células) durante 30 minutos bloqueó totalmente los efectos inducidos por METX  $10^{-6}M$ . Del mismo modo, la incubación con YOH  $10^{-5} M$  (n=26 células) bloqueó selectivamente los efectos de DEXMED  $10^{-6}M$ .

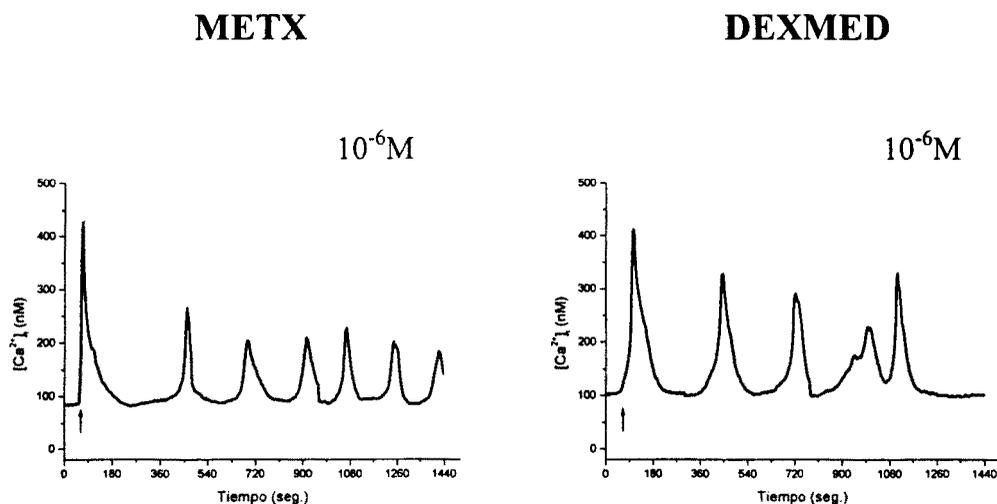


**Fig 4.8** Mobilizaciones del  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a metoxamina (METX) y dexmedetomidina (DEXMED) en células trabeculares. Los efectos de estos agonistas son bloqueados en presencia del antagonista específico. PRAZ=prazosin; YOH=yohimbina. En ordenadas se muestra la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  en nM y en abcisas el tiempo en segundos. La flecha en cada una de las gráficas muestra el punto de aplicación de la droga. La concentración del agonista es la que se muestra en la gráfica, mientras que la del antagonista fue siempre de  $10^{-5}M$ .

**Tabla 4.6 Efectos de los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos sobre el  $[Ca^{2+}]_i$  en células trabeculares en cultivo.**

Droga y Concentración	No. Respuestas/ células analizadas	% respuesta	$[Ca^{2+}]_i$ basal (nmol/L)	$\Delta [Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)	Células que mostraron respuesta		
					$2^\circ \Delta [Ca^{2+}]_i$ (nmol/L)	% $2^{os}$ picos	Oscilaciones de calcio
Control (tampon)	6/140	4%	76 $\pm$ 7	248 $\pm$ 13	---	---	---
METX $10^{-6}M$	49/89 <sup>†</sup>	55%	56 $\pm$ 5	313 $\pm$ 18	164 $\pm$ 9	43%	43%
DEXMED $10^{-6}M$	31/63 <sup>†</sup>	49%	71 $\pm$ 9	260 $\pm$ 10	208 $\pm$ 7	30%	30%
PRAZ+METX ( $10^{-5}/10^{-6}M$ )	0/30	0%	81 $\pm$ 13	---	---	---	---
YOH+DEXMED ( $10^{-5}/10^{-6}M$ )	0/26	0%	58 $\pm$ 9	---	---	---	---

Los datos se muestran como media $\pm$ SEM. METX = metoxamina; DEXMED = Dexmedetomidina; PRAZ = Prazosin; YOH = Yohimbina. El símbolo (<sup>†</sup>)  $p < 0.001$  muestra las significaciones para las comparaciones entre cada grupo y el grupo control. La presencia de oscilaciones de calcio fue evaluada durante los 7 minutos posteriores a la aplicación de la droga.



**Fig 4.9** Oscilaciones del  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a metoxamina (METX) y dexmedetomidina (DEXMED) en células trabeculares. En ordenadas se muestra la concentración de  $[Ca^{2+}]_i$  en nM y en abscisas el tiempo en segundos. La flecha en cada una de las gráficas muestra el punto de aplicación de la droga.

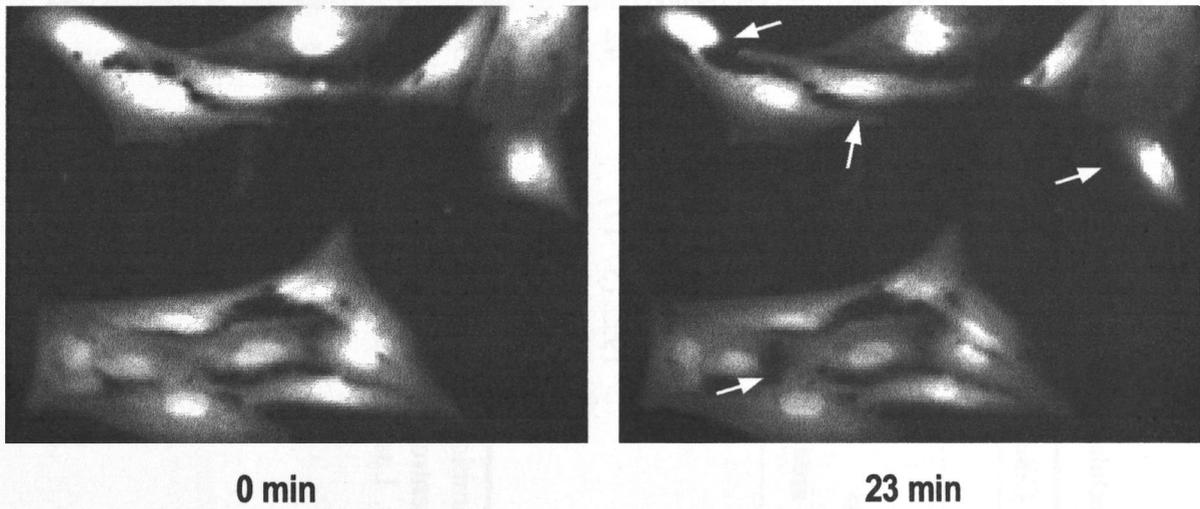
### 4.1.3. Efectos sobre la morfología de la célula trabecular

Los efectos de EPI ( $10^{-4}$ M), NE ( $10^{-4}$ M), METX ( $10^{-6}$ M) y DEXMED ( $10^{-6}$ M) sobre la forma celular se estudiaron mediante los cambios en el área y en el eje mayor celular. Como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos, los cambios en la morfología celular se consideraron significativos cuando fueron superiores al 10% para el área o a 2.5 u.a. para el eje celular mayor. Las tablas 4.7 y 4.8 muestran los valores encontrados para cada grupo estudiado.

#### 4.1.3.1. Epinefrina y Norepinefrina

De las células que respondieron significativamente (40%) a la aplicación de EPI ( $10^{-4}$ M) con un incremento en el  $[Ca^{2+}]_i$ , el 64% mostraron además una reducción significativa en el área celular ( $p < 0.001$ ; Tabla 4.7 y Fig. 4.10). Del mismo modo, en el 42% de las células con respuesta de calcio positiva se observó una disminución significativa del eje mayor celular ( $p < 0.001$ ). La reducción media del área celular fue de  $19 \pm 2\%$  mientras que en el eje mayor fue de  $5.1 \pm 0.6$  u.a. El 36% restante de células que respondieron a la EPI con un incremento del  $[Ca^{2+}]_i$  no mostraron cambios significativos en la morfología celular. Ninguna de las células que no respondió a la EPI mostró cambios significativos en la forma celular.

En presencia de NE ( $10^{-4}$ M), del 45% de células con respuesta positiva de  $[Ca^{2+}]_i$ , el 58% mostró una reducción significativa del área celular y el 40% en el eje mayor celular ( $p < 0.001$  en ambos casos; Tabla 4.7). La reducción media del área celular fue del  $19 \pm 1\%$  mientras que en el eje mayor fue del  $6.5 \pm 0.8$  u.a. Ni el 42% restante de las células que incrementaron el  $[Ca^{2+}]_i$  ni las células que no respondieron a la NE, mostraron cambios significativos en la morfología celular.



**Fig 4.10** Efecto de EPI  $10^{-4}M$  sobre la morfología de las células trabeculares. *Izquierda*: morfología celular al inicio del experimento antes de la aplicación de EPI. *Derecha*: morfología celular 23 min después de la aplicación de EPI. Las flechas indican las células que modificaron su morfología tras incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$ ; significativos.

**Tabla 4.7. Efectos de Epinefrina y Norepinefrina sobre la morfología celular en células trabeculares en cultivo**

Droga y Concentración	No. células respuesta/ analizadas (%)	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> incremento respecto basal (%)	Células que mostraron respuesta					
			% células cambios área	% células cambios eje mayor celular	% cambios área (rango)	% células cambios eje mayor celular	% células cambios eje mayor cel. (rango)	
Control (tampón)	4/86 (5)	354±38	0	<10 (-)	0	<2.5 (-)		
EPI 10 <sup>-4</sup> M	40/100 (40)*	506±41	64*	19±2 (37-11)	42*	5.1±0.6 (9-3)		
NE 10 <sup>-4</sup> M	34/76 (45)*	402±23	58*	19±1 (31-11)	40*	6.5±0.8 (14-4)		

EPI = epinefrina; NE = norepinefrina. Se consideraron significativos los cambios en el área celular >10% y en el eje mayor celular >2.5 u.a. (control; media±2SD) (ver Materiales y Métodos). Las comparaciones entre el % de respuesta y los cambios en el % área o en el eje mayor celular vs. el grupo control se realizaron mediante el test de Fisher. Las significaciones fueron: (\*) p<0.001. No se encontraron diferencias entre los diferentes grupos de sustancias.

#### 4.1.3.2. Agonistas $\alpha_1$ y $\alpha_2$

EL agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico METX ( $10^{-6}$ M) redujo el área celular en el 46% de las células que incrementaron la  $[Ca^{2+}]_i$  en un  $18\pm 1\%$  ( $p < 0.001$ ). El mismo porcentaje de células experimentó una reducción media del eje mayor celular del  $6.2\pm 0.7$  u.a. ( $p < 0.001$ ; Tabla 4.8). Por su parte, DEXMED ( $10^{-6}$ M) indujo una reducción media del  $14\pm 1\%$  ( $p < 0.001$ ) del área celular en el 48% de las células que respondieron a la droga. El mismo porcentaje de células también redujeron el eje mayor celular en  $5.1\pm 0.8$  u.a.

Tabla 4.8 Efectos de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos sobre la morfología celular en células trabeculares en cultivo

Droga y Concentración	No. células respuesta/ analizadas (%)	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> incremento respecto basal (%)	Células que mostraron respuesta			
			% células cambios área	% células cambios eje mayor celular	% células cambios eje mayor celular	% células cambios eje mayor cel. (rango)
Control (tampón)	4/86 (5)	354±38	0	<10 (-)	0	<2.5 (-)
METX 10 <sup>-6</sup> M	49/89 (55)*	510±26	46*	18±1 (28-11)	46*	6.2±0.7 (15-3)
DEXMED 10 <sup>-6</sup> M	31/63 (49)*	353±26	48*	14±1 (21-11)	48*	5.1±0.8 (11-3)

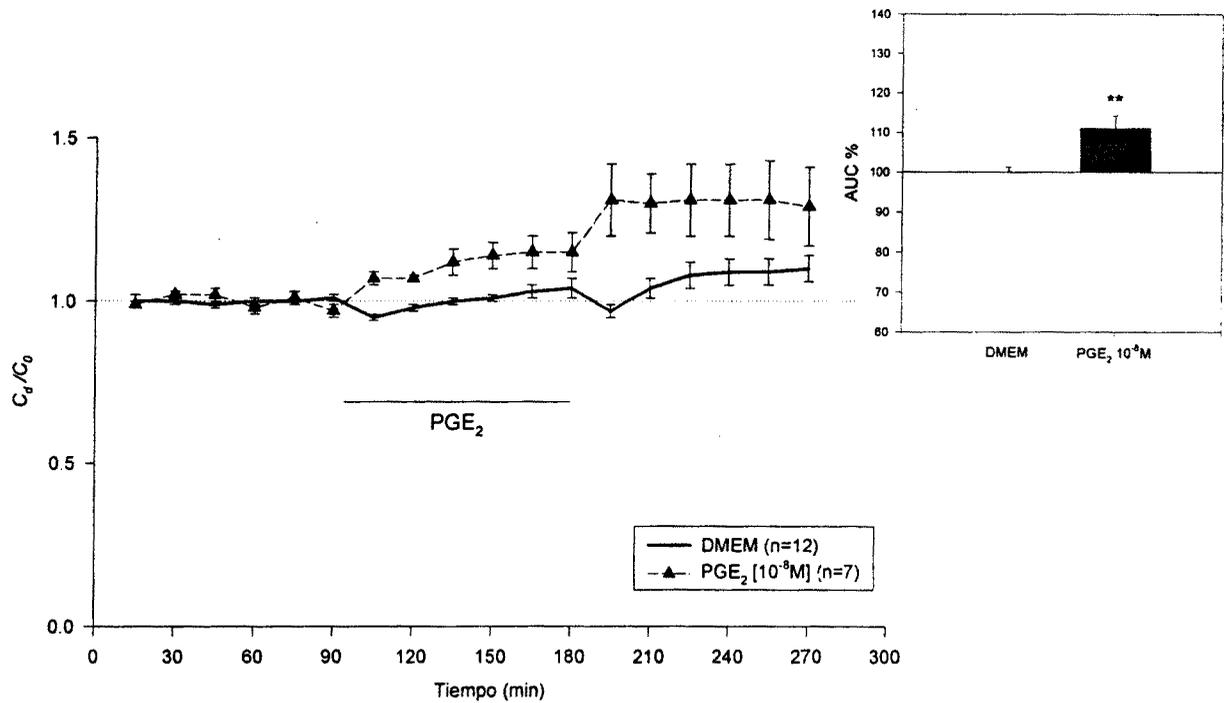
METX= metoxamina; DEXMED= dexmedetomidina. Se consideraron significativos los cambios en el área celular >10% y en el eje mayor celular >2.5 u.a. (control; media±2SD) (ver Materiales y Métodos). Las comparaciones entre el % de respuesta y los cambios en el % área o en el eje mayor celular vs. el grupo control se realizaron mediante el test de Fisher. Las significaciones fueron: (\*) p<0.001. No se encontraron diferencias entre los diferentes grupos de sustancias.

## 4.2. Efecto de las prostaglandinas sobre la evacuación del humor acuoso

### 4.2.1. Efectos sobre la facilidad de evacuación

#### 4.2.1.1. Prostaglandina E<sub>2</sub>

Tras la adición de PGE<sub>2</sub> 10<sup>-8</sup>M al medio de perfusión en el minuto 90 del protocolo, la C incrementó de manera gradual hasta el final del periodo con droga (15%) (Tabla 4.9 y Fig. 4.11). En el retorno a las condiciones basales, la C continuó incrementando hasta alcanzar un valor máximo (31%) al final del protocolo experimental. Cuando se compararon los valores de AUC para PGE<sub>2</sub> y el grupo control se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) como se muestra en la gráfica insertada en la figura 4.11.



**Fig 4.11** Efectos de la PGE<sub>2</sub> sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso. En ordenadas se muestra la relación entre la facilidad de evacuación en cada punto ( $C_d$ ) y la facilidad de evacuación basal ( $C_0$ ). En abcisas se muestra el tiempo en minutos. La gráfica insertada muestra el área bajo la curva (AUC) para la PGE<sub>2</sub> respecto al control (DMEM; 100%) y las diferencias estadísticas respecto a la perfusión control.

**Tabla 4.9 Efectos de la prostaglandina E<sub>2</sub> sobre la facilidad de evacuación.**

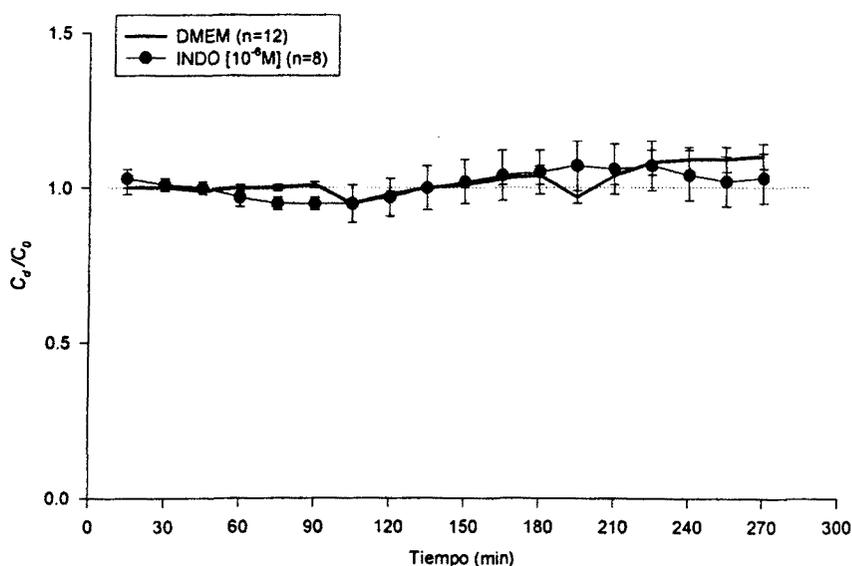
Droga y concentración	Basal (C <sub>0</sub> )		Periodo con droga (C <sub>d</sub> )			Periodo post droga (C <sub>pd</sub> )		
	n	Media	15	60	90	15	60	90 (Min)
Control (DMEM)	12	0.83±0.001 (100%)	0.79±0.08 (95%)	0.84±0.08 (101%)	0.86±0.08 (104%)			0.90±0.09 (110%)
PGE <sub>2</sub> 10 <sup>-8</sup> M	7	0.48±0.004 (100%)	0.51±0.04 (107%)	0.54±0.05 (115%)	0.55±0.05 (115%)*§			0.58±0.07 (129%) <sup>‡  </sup>

C<sub>0</sub> = facilidad de evacuación basal; C<sub>d</sub> = facilidad de evacuación en presencia de droga; C<sub>pd</sub> = facilidad de evacuación post droga. Los datos se muestran como media±SEM; n = número de ojos. El promedio de la relación C<sub>d</sub>/C<sub>0</sub> o C<sub>pd</sub>/C<sub>0</sub> se muestra en paréntesis. Para todos los grupos se realizó el análisis de la varianza con la corrección de Bonferroni entre C<sub>0</sub> y C cada 15 minutos. Las significaciones se establecieron a: (\*) p<0.05, (†) p<0.01 y (‡) p<0.001. Además, las comparaciones entre las relaciones C<sub>d</sub>/C<sub>0</sub> y C<sub>pd</sub>/C<sub>0</sub> en los grupos tratados vs. los mismos parámetros (C<sub>d</sub>/C<sub>0</sub> y C<sub>pd</sub>/C<sub>0</sub>) para el grupo control (DMEM) se realizaron mediante el test de la t de Student despareado con la corrección Bonferroni. La significación se estableció en: (§) p<0.05, (¶) p<0.01 y (||) p<0.001. PGE<sub>2</sub> = Prostaglandina E<sub>2</sub>

## 4.2.1.2. Indometacina

Debido a que en algunos estudios se han relacionado las prostaglandinas con los efectos de EPI sobre la C, se estudiaron los efectos de la adición de Indometacina (INDO) en los experimentos con EPI.

INDO, presente en el medio de perfusión desde el inicio del protocolo, no modificó de manera significativa la C por si misma (Tabla 4.10 y Fig. 4.12). En presencia de INDO, EPI  $10^{-6}$ M disminuyó la C en un 76% (Tabla 4.10 y Fig. 4.13A). Este efecto fue similar al encontrado en la perfusión de EPI sola. Los efectos de INDO + EPI comparados con EPI  $10^{-6}$ M se muestran como AUC en la gráfica insertada en la figura 4.13A. No se encontraron diferencias estadísticas entre los dos grupos ( $p > 0.24$ ). En cambio, la presencia de INDO en el medio de perfusión, bloqueó el efecto inducido por EPI  $10^{-8}$  M (Tabla 4.10 y Fig. 4.13B). Los efectos de INDO + EPI comparados con EPI  $10^{-8}$ M son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) como se muestra en la gráfica insertada en la figura 4.13B.



**Fig 4.12** Efectos de la indometacina (INDO) sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso. En ordenadas se muestra la relación entre la facilidad de evacuación en cada punto ( $C_d$ ) y la facilidad de evacuación basal ( $C_0$ ). En abscisas se muestra el tiempo en minutos.

**Tabla 4.10 Efectos de la Epinefrina en presencia de Indometacina, sobre la facilidad de evacuación.**

Droga y concentración	n	Periodo con droga ( $C_d$ )			Periodo post droga ( $C_{pd}$ )		
		Basal ( $C_0$ )	15	60	90	90	(Min)
INDO $10^{-6}$ M	12	0.55±0.09 (100%)	0.53±0.10 (94%)	0.56±0.11 (100%)	0.59±0.11 (104%)	0.58±0.09 (102%)	
EPI $10^{-6}$ γ +INDO	5	0.54±0.003 (100%)	0.40±0.04 (76%) <sup>†  </sup>	0.45±0.05 (86%) <sup>†</sup>	0.43±0.05 (83%) <sup>†  </sup>	0.44±0.05 (84%) <sup>†  </sup>	
EPI $10^{-8}$ M+INDO	5	0.43±0.006 (100%)	0.40±0.05 (93%)	0.41±0.06 (94%)	0.39±0.06 (90%) <sup>§</sup>	0.36±0.04 (84%) <sup>†  </sup>	

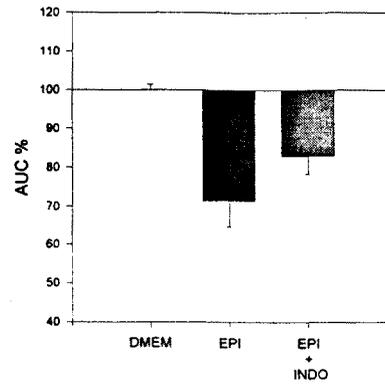
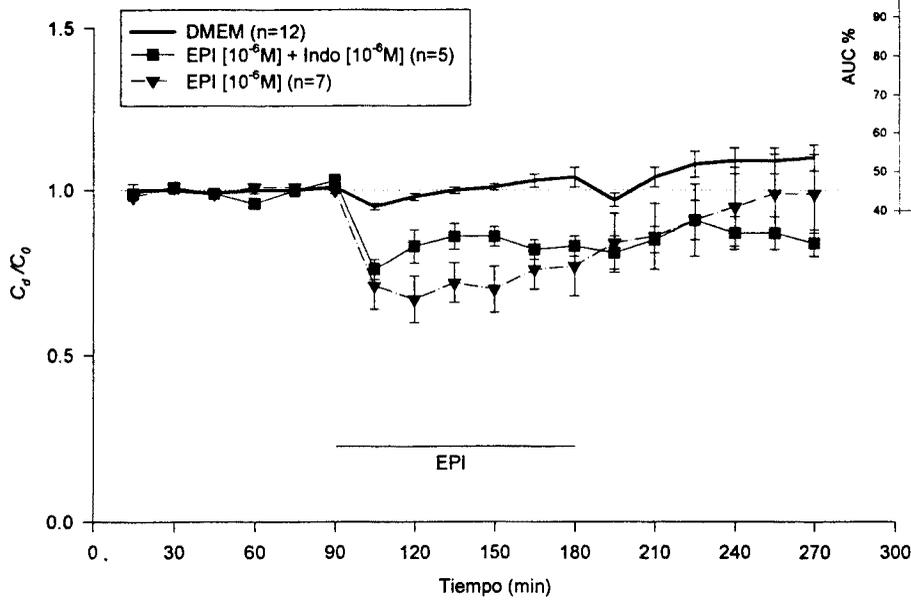
$C_0$  = facilidad de evacuación basal;  $C_d$  = facilidad de evacuación en presencia de droga;  $C_{pd}$  = facilidad de evacuación post droga. Los datos se muestran como media±SEM; n = número de ojos. El promedio de la relación  $C_d/C_0$  o  $C_{pd}/C_0$  se muestra en paréntesis. Para todos los grupos se realizó el análisis de la varianza con la corrección de Bonferroni entre  $C_0$  y C cada 15 minutos. Las significaciones se establecieron a: (†)  $p < 0.05$ , (†)  $p < 0.001$ . Además, las comparaciones entre las relaciones  $C_d/C_0$  y  $C_{pd}/C_0$  en los grupos tratados vs. los mismos parámetros ( $C_d/C_0$  y  $C_{pd}/C_0$ ) para el grupo control (DMEM) se realizaron mediante el test de la t de Student despareado con la corrección Bonferroni. La significación se estableció en: (§)  $p < 0.05$ , (||)  $p < 0.01$  y (†)  $p < 0.001$ . EPI = Epinefrina; INDO = Indometacina

#### 4.2.2 Efectos sobre el calcio intracelular de la célula trabecular

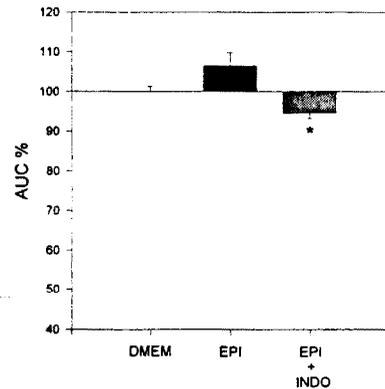
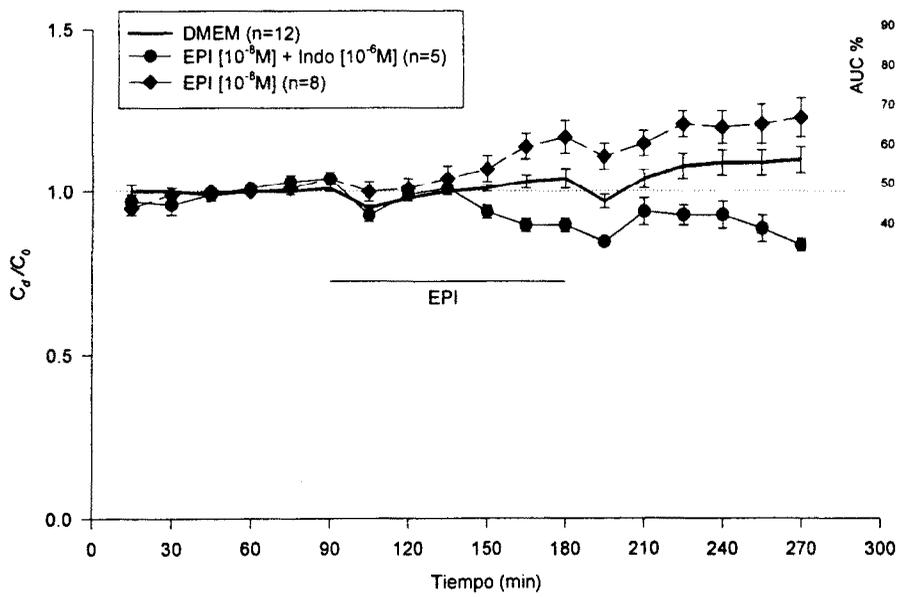
Igual que en el caso de los agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos, la  $PGE_2$  activa el receptor  $EP_2$  que estimula la síntesis de AMPc y no modifica los niveles de  $[Ca^{2+}]_i$ . Para comprobar que la estimulación con  $PGE_2$   $10^{-8}M$  no modifica el  $[Ca^{2+}]_i$ , se estudiaron sus efectos en las células trabeculares. El valor de  $[Ca^{2+}]_i$  basal medio de los experimentos realizados fue de  $77 \pm 12$  nM (media  $\pm$  SD;  $n=122$ ). La estimulación con  $PGE_2$  produjo incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  significativos en 7 células de 122 estudiadas. El porcentaje de respuesta encontrado (5.7%) no es significativamente diferente de valor encontrado en los experimentos controles. En este caso tampoco se observaron cambios significativos en la forma celular. Los resultados encontrados confirman que la estimulación con  $PGE_2$  no es mediada por el  $Ca^{2+}$  en las células trabeculares.

**Fig 4.13** (Página siguiente) **A:** Efecto de la EPI  $10^{-6}M$  sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso en presencia o en ausencia de indometacina (INDO) en el medio de perfusión. Los efectos de la EPI a esta concentración no se modifican significativamente en presencia de INDO. **B:** Efecto de la EPI  $10^{-8}M$  sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso en presencia o en ausencia de INDO en el medio de perfusión. El incremento de la facilidad de evacuación producido por la EPI  $10^{-8}M$  es bloqueado en presencia de INDO. En ordenadas se muestra la relación entre la facilidad de evacuación en cada punto ( $C_d$ ) y la facilidad de evacuación basal ( $C_0$ ). En abcisas se muestra el tiempo en minutos. Las gráficas insertadas muestran el área bajo la curva (AUC) para cada grupo experimental respecto al control (DMEM; 100%) y las diferencias estadísticas respecto a la perfusión con EPI en cada caso.

**A**



**B**

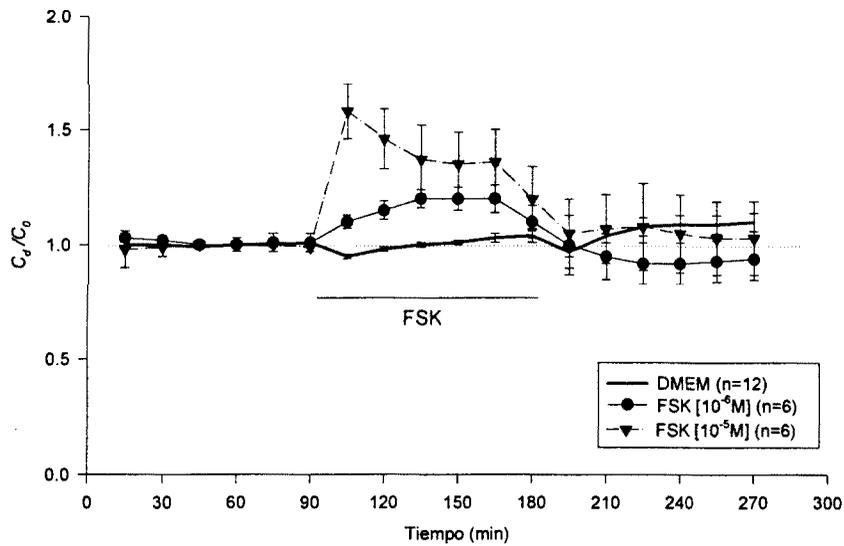


### 4.3. Participación del AMPc en la evacuación del humor acuoso

En este estudio se utilizaron drogas que actúan en diferentes puntos de la cascada de señalización intracelular del AMPc. Así, en cualquiera de los casos, la droga incrementó la concentración intracelular de AMPc bien favoreciendo su síntesis (forskolina), bien inhibiendo su degradación (isobutilmetilxantina) o mediante un análogo del propio AMPc (dibutiril-AMPc).

#### 4.3.1. Forskolina

La forskolina (FSK) actúa activando de manera reversible la adenilato ciclasa. La perfusión con FSK  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ M incrementó en ambos casos la C basal (Tabla 4.11 y Fig. 4.14). Para la concentración de  $10^{-6}$ M, se obtuvieron incrementos de la C del 20% ( $p < 0.05$ ) 30 minutos después del inicio de perfusión con la droga. Tras el retorno a las condiciones basales, la C recuperó los valores del periodo de perfusión basal. El aumento de la C fue mayor a la concentración de  $10^{-5}$ M, siendo ya del 57% a los 15 minutos ( $p < 0.01$ ). A partir de este punto, los valores permanecieron elevados (36%;  $p < 0.01$ ) durante el periodo con droga para recuperarse lentamente en el periodo de retorno a las condiciones basales (103%). En ambos casos, como se muestra en la tabla 4.11, durante el periodo con droga, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar dichos valores con el grupo control.



**Fig 4.14** Efecto de diferentes concentraciones de forskolina (FSK) sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso. En ordenadas se muestra la relación entre la facilidad de evacuación en cada punto ( $C_d$ ) y la facilidad de evacuación basal ( $C_0$ ). En abscisas se muestra el tiempo en minutos.

**Tabla 4.11 Efectos de drogas que incrementan la [AMPc]<sub>i</sub> sobre la facilidad de evacuación.**

Droga y concentración	Basal ( $C_0$ )	periodo con droga ( $C_d$ )			Periodo post droga ( $C_{pd}$ )	
		Media	15	60	90	90 (Min)
Control (DME) <sup>1)</sup>	12 0.83±0.001 (100%)	0.79±0.08 (95%)	0.84±0.08 (101%)	0.86±0.08 (104%)	0.90±0.09 (110%)	
FSK 10 <sup>-6</sup> M	6 1.17±0.24 (100%)	1.25±0.25 (110%)	1.33±0.27 (120%) <sup>*§</sup>	1.39±0.28 (120%) <sup>*§</sup>	1.18±0.31 (93%)	
FSK 10 <sup>-5</sup> M	6 0.92±0.19 (100%)	1.42±0.28 (157%) <sup>†¶</sup>	1.16±0.16 (136%) <sup>†¶</sup>	1.14±0.18 (135%) <sup>†¶</sup>	0.95±0.18 (103%)	
IBMX 10 <sup>-6</sup> M	8 0.61±0.14 (100%)	0.72±0.16 (114%) <sup>*  </sup>	0.77±0.16 (127%) <sup>†  </sup>	0.70±0.14 (118%) <sup>†  </sup>	0.72±0.14 (125%) <sup>†  </sup>	
IBMX+FSK 10 <sup>-6</sup> /10 <sup>-5</sup> M	6 1.48±0.50 (100%)	1.55±0.52 (110%)	2.10±0.57 (154%) <sup>*¶</sup>	2.20±0.52 (173%) <sup>*¶</sup>	2.11±0.56 (166%) <sup>*¶</sup>	
db-cAMP 10 <sup>-7</sup> M	6 0.89±0.14 (100%)	1.14±0.18 (132%) <sup>*¶</sup>	1.16±0.16 (143%) <sup>*¶</sup>	1.28±0.23 (148%) <sup>†¶</sup>	1.05±0.15 (125%) <sup>¶</sup>	
db-cAMP 10 <sup>-6</sup> M	6 0.83±0.18 (100%)	1.14±0.28 (127%) <sup>†  </sup>	1.35±0.33 (151%) <sup>†  </sup>	1.31±0.35 (143%) <sup>†  </sup>	1.30±0.31 (142%) <sup>¶</sup>	

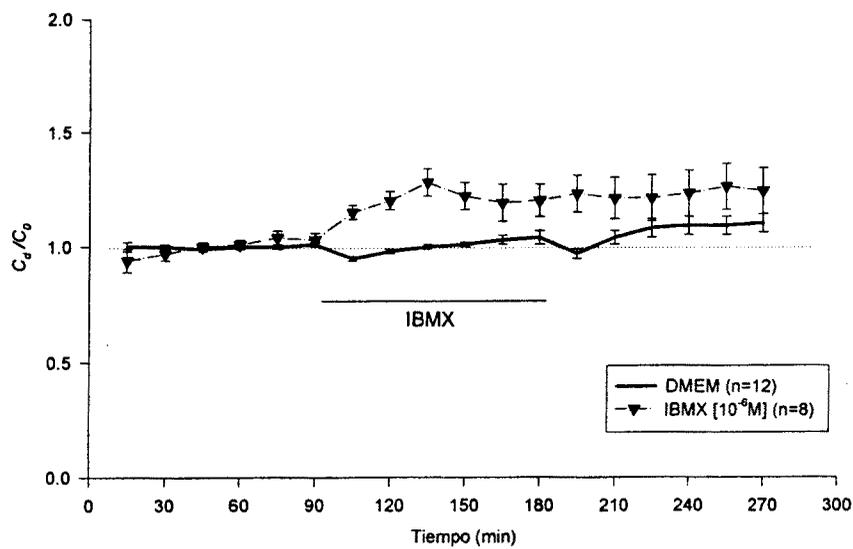
$C_0$  = facilidad de evacuación basal;  $C_d$  = facilidad de evacuación en presencia de droga;  $C_{pd}$  = facilidad de evacuación post droga. Los datos se muestran como media±SEM;  $n$  = número de ojos. El promedio de la relación  $C_d/C_0$  o  $C_{pd}/C_0$  se muestra en paréntesis. Para todos los grupos se realizó el análisis de la varianza con la corrección de Bonferroni entre  $C_0$  y  $C$  cada 15 minutos. Las significaciones se establecieron a: (•)  $p<0.05$ , (†)  $p<0.01$  y (††)  $p<0.001$ . Además, las comparaciones entre las relaciones  $C_d/C_0$  y  $C_{pd}/C_0$  en los grupos tratados vs. los mismos parámetros ( $C_d/C_0$  y  $C_{pd}/C_0$ ) para el grupo control (DMEM) se realizaron mediante el test de la  $t$  de Student despareado con la corrección Bonferroni. La significación se estableció en: (•)  $p<0.05$ , (†)  $p<0.01$  y (††)  $p<0.001$ . FSK = Forskolina; IBMX = Isobutylmetixantina; db-cAMP = dibutiril AMPc.

### 4.3.2. Isobutilmetilxantina (IBMX)

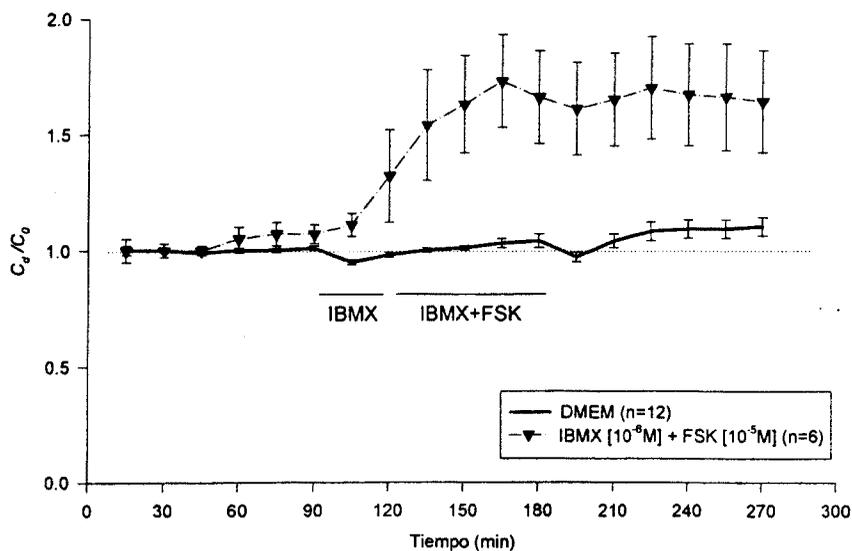
La isobutilmetilxantina (IBMX) actúa inhibiendo el enzima que degrada el AMPc (fosfodiesterasa) favoreciendo su acumulación en el interior celular. La perfusión con IBMX ( $10^{-6}$ M) incrementó la C de manera progresiva durante los primeros 60 minutos de perfusión con la droga, siendo este incremento del 14% ( $p < 0.05$ ) a los 15 minutos y del 27% ( $p < 0.01$ ) a los 60 minutos (Tabla 4.11 y Fig. 4.15A). Tras el retorno a las condiciones basales, la C continuó elevada respecto a los niveles basales (25%;  $p < 0.01$ ). Como se muestra en la tabla 4.11, se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar este grupo con el grupo control.

En otro grupo de experimentos se evaluaron los posibles efectos aditivos sobre la C de la perfusión con IBMX ( $10^{-6}$ M) y FSK ( $10^{-5}$ M). Los primeros 30 minutos de perfusión con droga se realizaron únicamente con IBMX y los 60 minutos restantes con ambas drogas a la vez. Si bien durante los primeros 30 minutos con IBMX la C empezó a aumentar, el incremento máximo se encontró en presencia de ambas drogas a la vez (Tabla 4.11 y Fig. 4.15B). 30 minutos después de añadir las dos drogas, la facilidad fue un 54% superior al nivel basal ( $p < 0.05$ ) y 60 minutos después un 73% superior ( $p < 0.05$ ). En el periodo post droga, los niveles de C disminuyeron ligeramente pero no recuperaron los niveles basales. En todos los puntos con IBMX + FSK y en los puntos del periodo post droga, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ) respecto a la perfusión control.

**A**



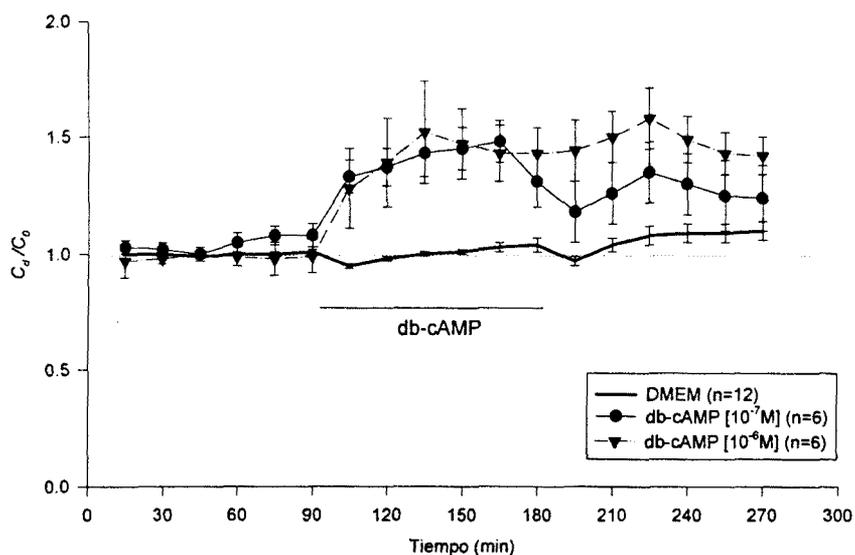
**B**



**Fig 4.15 A:** Efecto de la isobutilmetilxantina (IBMX) sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso. **B:** Efecto del IBMX junto con la forskolina (FSK) sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso. En ordenadas se muestra la relación entre la facilidad de evacuación en cada punto ( $C_d$ ) y la facilidad de evacuación basal ( $C_0$ ). En abcisas se muestra el tiempo en minutos.

### 4.3.3. dibutilil-AMPc

El dibutilil-AMPc (db-AMPc) es un análogo del AMPc capaz de penetrar en la célula y hacer las mismas funciones que este segundo mensajero. Las dos concentraciones ( $10^{-7}M$  y  $10^{-6}M$ ) de db-AMPc utilizadas incrementaron la facilidad de evacuación de manera significativa (Tabla 4.11 y Fig. 4.16). La concentración inferior incrementó la C un 32% a los 15 minutos ( $p<0.05$ ) que permaneció elevada hasta un máximo del 48% ( $p<0.01$ ) a los 90 minutos. En el periodo post droga, la facilidad disminuyó ligeramente sin llegar a recuperar totalmente los valores basales (25%). La perfusión con db-AMPc  $10^{-6}M$  siguió un perfil similar, aumentando la C hasta un 51% ( $p<0.01$ ) a los 60 minutos de perfusión. Igual que en la concentración anterior, la C no recuperó los valores basales en el periodo post droga (42%). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.01$  o  $p<0.001$ ) al comparar cada uno de los grupos con la perfusión control (Tabla 4.11).



**Fig 4.16** Efecto de diferentes concentraciones de dibutilil-cAMP (db-cAMP) sobre la facilidad de evacuación del humor acuoso. En ordenadas se muestra la relación entre la facilidad de evacuación en cada punto ( $C_d$ ) y la facilidad de evacuación basal ( $C_0$ ). En abscisas se muestra el tiempo en minutos.



# **DISCUSIÓN**

---



## 5. DISCUSIÓN

Desde hace algunos años, la red trabecular ha ganado importancia como estructura con un papel funcional en la regulación de la evacuación del humor acuoso (Wiederholt y Stumpff, 1998; Al-Aswad *et al.*, 1999; Brandt y O'Donnell, 1999; Wordinger y Clark, 1999). Diversos grupos han estudiado las características de las células trabeculares, su relación con la IOP y el tratamiento del glaucoma, ya que son de gran interés los fármacos selectivos que aumentan la evacuación del humor acuoso sin afectar a otros parámetros del organismo (ej. secreción del humor acuoso, acomodación, etc.) (Camras *et al.*, 1999; Coleman, 1999; Stewart, 1999). Inicialmente, muchos trabajos prestaron más atención a los efectos del tono del músculo ciliar en la evacuación del humor acuoso (Kaufman, 1984; Lütjen-Drecoll y Rohen, 1989) que a la participación de la red trabecular. Los fármacos colinérgicos estudiados, contraen el músculo ciliar abriendo los espacios intercelulares de la red trabecular con lo que aumentan la evacuación (Rohen *et al.*, 1981; Grierson *et al.*, 1978). Además si experimentalmente se desinserta el músculo ciliar de la red trabecular, el efecto desaparece (Kaufman y Bárány, 1976; Kaufman *et al.*, 1984). Estos estudios sobre la evacuación del humor acuoso atribuyeron a la red trabecular un papel totalmente pasivo.

En los últimos años, diferentes autores han caracterizado las propiedades de las células de la red trabecular y su respuesta a diferentes fármacos (Tripathi *et al.*, 1992). Además se han identificado en la red trabecular numerosos receptores, cotransportadores, canales iónicos y segundos mensajeros que participan en diferentes procesos (ver Tabla 2.3). Ciertas preparaciones han permitido de manera específica estudiar como responde la red trabecular en respuesta a diferentes agonistas o condiciones experimentales. La preparación desarrollada por el grupo de Erickson (Erickson *et al.*, 1988, 1990, 1991; Erickson y Nathanson, 1992) permite evaluar de forma específica los efectos de agonistas sobre la evacuación del humor acuoso por la vía convencional, lo que ha ayudado a entender la fisiología de la red trabecular. En este sentido, se han descrito los efectos sobre la evacuación por la vía convencional de agonistas adrenérgicos, (Erickson y Nathanson, 1992; Erickson *et al.*, 1994; Wiederholt *et al.*, 1995), antagonistas del calcio (Erickson *et al.*, 1995), ácido etacrínico (Liang *et al.*, 1992), endotelina-1 (Wiederholt *et al.*, 1995) y donantes de NO (Schuman *et al.*, 1994). Por otra parte, mediante esta preparación se ha descrito que el volumen de las células trabeculares es fundamental para el paso del humor acuoso a través de la red trabecular (Gual *et al.*, 1997; Al-Aswad *et al.*, 1999).

Paralelamente, el grupo de Wiederholt desarrolló una preparación de tiras de tejido de la red trabecular *in vitro* en la que es posible evaluar sus propiedades contráctiles en respuesta a diferentes sustancias (Lepple-Wienhues et al., 1991a, 1991b, 1992; Wiederholt et al., 1994, 1996; 1997, 1998; Krauss et al., 1997; Wiederholt y Stumpff, 1998).

Los resultados descritos sobre la funcionalidad de la red trabecular han llevado a una nueva visión de sus propiedades dándole un papel activo en cuanto a la regulación de la evacuación del humor acuoso.

Existen varios motivos por los que los efectos de agonistas adrenérgicos y en particular de la epinefrina sobre la vía de evacuación convencional tienen especial interés: como se ha descrito en la Introducción, los fármacos adrenérgicos se han utilizado desde hace muchos años en el tratamiento del glaucoma de manera empírica y los únicos efectos descritos son en el músculo ciliar (Kaufman y Bárány, 1976, 1981). Por otra parte, se ha descrito inervación adrenérgica en la red trabecular (ver apartado 2.6.3. de la Introducción) que debe de tener alguna función específica sobre la red trabecular, aunque hasta la fecha no se ha descrito. Además, se han encontrado, en el humor acuoso, concentraciones de catecolaminas, especialmente norepinefrina, superiores a las del plasma (Cooper et al., 1984) que aumentan si se estimula el sistema nervioso simpático (Gallar y Liu, 1993). Estas catecolaminas pueden tener una influencia directa en la red trabecular al atravesarla junto con el humor acuoso.

En este trabajo se ha utilizado la perfusión de segmentos anteriores bovinos, en condiciones de cultivo de órganos, como modelo para el estudio de los efectos de diferentes agonistas. El modelo de ojo bovino es de gran utilidad por su fácil obtención, bajo coste y, además, comparte numerosas similitudes anatómicas con el ojo humano. Los resultados encontrados en ojos bovinos son comparables a los encontrados en ojos humanos y por este motivo se utiliza habitualmente en fisiología ocular (Bartels, 1984). Por otra parte, se han utilizado las células trabeculares en cultivo como una aproximación celular de los estudios realizados en órgano. Este método ha permitido caracterizar los efectos celulares de diferentes agonistas sobre el  $[Ca^{2+}]_i$  y la morfología celular.

Los resultados sobre la evacuación del humor acuoso encontrados en este trabajo describen una disminución de la facilidad de evacuación para EPI y NE a concentraciones entre  $10^{-6}$  y  $10^{-4}M$ . Esta disminución de la evacuación del humor acuoso se asocia a un efecto a través

de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. El estudio con diferentes agonistas específicos muestra como el componente más importante del efecto es mediado por los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. Los efectos encontrados para la EPI y la DEXMED se bloquearon en presencia del antagonista específico para los receptores  $\alpha_2$  (YOH), pero también por el antagonista  $\alpha_1$ , PRAZ. Aunque el PRAZ se utiliza como antagonista  $\alpha_1$ , también tiene cierta actividad antagonista  $\alpha_2$  (Alexander y Peters, 1999). En este estudio no se han encontrado efectos significativos cuando se han estudiado los efectos de agonistas  $\alpha_1$ -adrenérgicos (METX o PHEN) o de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Por otra parte, se ha encontrado un aumento de la evacuación del humor acuoso para EPI  $10^{-8}$ M, lo que sugiere que según la concentración utilizada, la EPI podría activar diferentes receptores y, por lo tanto, diferentes mecanismos en la red trabecular. Estos resultados son similares a los encontrados por otros autores en preparaciones parecidas. Wiederholt et al. (1995) describieron un efecto parecido para la EPI en segmentos anteriores perfundidos *in vitro*. En su trabajo, las concentraciones superiores a  $10^{-6}$ M de EPI, así como otras sustancias como la endotelina-1, inducen disminuciones de la facilidad de evacuación, mientras que las concentraciones de EPI inferiores a  $10^{-6}$ M se asocian a ligeros aumentos en la facilidad de evacuación. Por otra parte, los estudios de Erickson y Nathanson (1992) describen incrementos de la facilidad de evacuación con EPI  $10^{-6}$ M que se correlacionan con aumentos en la concentración de AMPc. Los incrementos descritos tienen un tiempo de latencia de  $\approx 1$  hora antes de encontrar efecto alguno lo que, debido a pequeñas diferencias en las condiciones experimentales, sería semejante a los resultados del presente estudio para la concentración de  $10^{-8}$ M. En ninguno de los trabajos se ha caracterizado de manera específica el subtipo de receptor adrenérgico que participa en la regulación del humor acuoso.

La modulación adrenérgica de la evacuación del humor acuoso se ha estudiado en numerosos trabajos desde los años 60 y, tanto los receptores  $\alpha$  como los  $\beta$ -adrenérgicos, se han implicado en la regulación de la evacuación (Sears y Bárány, 1960; Eakins y Ryan, 1964; Bill, 1970; Erickson y Nathanson, 1992). Algunos estudios han sugerido la implicación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos en los aumentos de la facilidad de evacuación por EPI (Bill, 1970; Erickson y Nathanson, 1992) asociada a aumentos en el AMPc en las células trabeculares. En este sentido, cabe destacar que estos receptores se han identificado en la red trabecular humana (Nathanson, 1980; Mittag y Tormay, 1985; Wax y Molinoff, 1987) y su estimulación produce un aumento de la concentración intracelular de AMPc en células trabeculares humanas en cultivo (Busch et al., 1993). En cambio, en bovinos, el sistema de la adenilato ciclasa no

parece acoplado al receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Busch et al., 1993), sí es que éste está presente en la red trabecular de esta especie. Por otra parte, los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos se han identificado en las células trabeculares (Stamer et al., 1996), mientras que no se han descrito receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos. Los estudios funcionales sobre la participación de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos en la red trabecular son escasos. Stamer et al. (1996) describieron los efectos celulares de la activación de estos receptores. La estimulación de la síntesis de AMPc con FSK se inhibe en un 90% en presencia de DEXMED, agonista selectivo  $\alpha_2$ . Además, la activación de este tipo de receptores está asociada a la estimulación de la proliferación celular por MAP kinasas. Los resultados sobre la evacuación del humor acuoso en respuesta a agonistas  $\alpha_2$  son dispares. Toris et al. (1995b) describieron un aumento de la facilidad de evacuación en humanos tras la administración de apraclonidina, mientras que los efectos de brimonidina se relacionaron con el aumento de la evacuación a través de la vía uveoescleral (Toris et al., 1995a; 1999). En estos estudios, los efectos se evaluaron de manera crónica (varios días), por lo que es difícil comparar estos resultados con los del presente trabajo o los encontrados por Stamer et al. (1996).

Paralelamente a los estudios sobre la evacuación del humor acuoso, los estudios en células trabeculares en cultivo han mostrado incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a agonistas adrenérgicos. A la máxima concentración utilizada, alrededor de un 50% de las células trabeculares responden con movilizaciones de  $[Ca^{2+}]_i$ . Estos resultados son parecidos a los encontrados en estudios similares (Tanihara et al., 1991). Los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por EPI y NE son similares, en cuanto a su cinética (incrementos rápidos con rápida recuperación de los niveles basales), aunque hay un mayor porcentaje de respuesta para NE que para EPI a la misma concentración. Tanto METX (agonista  $\alpha_1$ ) como DEXMED (agonista  $\alpha_2$ ) inducen movilizaciones de  $[Ca^{2+}]_i$  en un porcentaje de células similar. Este efecto resulta sorprendente por la falta de respuesta de los agonistas  $\alpha_1$  en la evacuación del humor acuoso. La METX tiene una mayor afinidad para los receptores  $\alpha_1$  que para los  $\alpha_2$  (Alexander y Peters, 1999) pero no se descarta su acción sobre los  $\alpha_2$  en algunos casos, especialmente en ausencia de los  $\alpha_1$ . Los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  inducidos por METX y DEXMED son similares a los encontrados para EPI y NE, lo que sugiere un mismo mecanismo intracelular. Los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, para cualquiera de sus subtipos, están acoplados a la proteína  $G_{i/o}$  que inhibe la adenilato ciclasa ( $\downarrow$  AMPc) pero que también puede activar la fosfolipasa C y aumentar el  $[Ca^{2+}]_i$  (Morris y Malbon, 1999; Alexander y Peters, 1999). De hecho, otros agonistas, como el

neuropéptido Y, que activan receptores unidos al mismo tipo de proteína G, también producen incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  en las células trabeculares (Ohuchi et al., 1992).

Los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  en respuesta a agonistas adrenérgicos difieren sustancialmente de los descritos previamente para otras sustancias. La bradikina (Llobet et al., 1999), endotelina-1 (Kohmoto et al., 1994; Kageyama et al., 1996) o carbacol (Kageyama et al., 1996) inducen incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  mayores en amplitud y en duración, mostrando una cinética rápida desde el punto de estimulación hasta el incremento máximo ( $T_{pico}$ ) y un retorno lento de varios minutos hasta alcanzar las concentraciones basales. Esta cinética se explica por la generación de  $IP_3$  y la salida de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico, lo cual produce el incremento inicial del  $[Ca^{2+}]_i$  que no depende de la entrada de  $Ca^{2+}$  por canales de  $Ca^{2+}$  voltaje dependientes (Kageyama et al., 1996; Llobet et al., 1999). Se sugiere una entrada sostenida de  $Ca^{2+}$  por otros tipos de canales durante el periodo de recuperación. En el caso de los incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  producidos por los agonistas adrenérgicos, la cinética es parecida a la descrita en células endoteliales, en el músculo liso vascular y en hepatocitos, y se asocia únicamente a la generación de  $IP_3$  y liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico (Jacob, 1991; Cobbold et al., 1991; Hamada et al., 1997; Tordjmann et al., 1997). El 30-40% de las células trabeculares que respondieron con incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  adoptaron un patrón de  $[Ca^{2+}]_i$  oscilatorio. Estas oscilaciones se han descrito en otras células como oscilaciones basales (*baseline oscillations*; Jacob, 1991; Cobbold et al., 1991; Thomas et al., 1996) y se asocian a liberación rítmica de  $Ca^{2+}$  del retículo endoplásmico por acción del  $IP_3$  como consecuencia de la activación de la fosfolipasa C. Estas oscilaciones no dependen de la actividad eléctrica de la membrana y se han encontrado tanto en células excitables como en no excitables (Thomas et al., 1996). Las implicaciones funcionales de las oscilaciones de calcio son múltiples: a nivel celular se ha hipotetizado que podrían ser un mecanismo para evitar la desensibilización de las vías de señalización intracelular al ser incrementos de  $[Ca^{2+}]_i$  cortos que evitan la activación de los mecanismos de inactivación (Jacob, 1991; Thomas et al., 1996). También se ha sugerido que algunos sistemas como el de la calmodulina/calmodulina-kinasa podrían ser más sensibles a la frecuencia de las oscilaciones que a la amplitud, lo cual tiene claras ventajas en cuanto a la selectividad del estímulo. De esta manera, la información en forma de señales de  $Ca^{2+}$  puede ser codificada y detectada en un espectro más amplio de niveles de señalización que en forma de grandes incrementos sostenidos de  $[Ca^{2+}]_i$  (Thomas et al., 1996). En este sentido, recientemente se ha descrito la capacidad de la calmodulina kinasa II de decodificar la frecuencia de las oscilaciones de  $Ca^{2+}$  y modular su actividad kinasa dependiendo del tipo de estímulo (De

Koninck y Schulman, 1998). La frecuencia de las oscilaciones depende sustancialmente de la concentración del agonista, aumentando la frecuencia de las oscilaciones al aumentar la concentración de éste. De todas formas, como se ha encontrado en este estudio, a concentraciones muy elevadas de agonista ( $10^{-4}\text{M}$ ) existe un incremento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  inicial mayor con ausencia de oscilaciones, lo que se asocia a un proceso de desensibilización del sistema (Meyer y Stryer, 1991). Así, bajas concentraciones de agonista durante largos periodos de tiempo (ej. hormonas), pueden producir señales en forma de oscilaciones y activar diferentes mecanismos celulares como la expresión de distintos genes. Otras funciones descritas de las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  son el control de la permeabilidad vascular mediante pequeñas contracciones sincrónicas del endotelio, el control del tono vascular mediante la liberación de factores vasodilatadores (ej. óxido nítrico) (Jacob, 1991), exocitosis, respuestas quimiotácticas, propagación de las señales de  $\text{Ca}^{2+}$ , transcripción de genes o plasticidad sináptica (Jacob, 1991; Meyer y Stryer, 1991; Thomas et al., 1996; Berridge et al., 1998). Finalmente, cabe destacar que el criterio utilizado en este estudio para considerar como positivas las respuestas del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ( $\Delta [\text{Ca}^{2+}]_i > 100\%$  valor basal) es bastante restrictivo y las respuestas más pequeñas pueden haber pasado desapercibidas, consideradolas como no significativas. Es posible que, con un criterio menos restrictivo, el porcentaje de respuesta y de oscilaciones aumentara.

Junto a los estudios del  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y con la misma técnica, se han estudiado los cambios morfológicos inducidos en las células trabeculares por los agonistas adrenérgicos. Un 58-64% de las células que incrementaron el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en respuesta a EPI y NE también modificaron su forma celular. Estos cambios de forma se observaron como retracciones del citoplasma de la célula que, aparentemente, no afectaban al núcleo celular. En general, se observaron reducciones del área celular del 19%. Se obtuvieron valores similares para la METX y la DEXMED, aunque el porcentaje de respuesta fue ligeramente menor (48%). Debido a las limitaciones de la técnica utilizada, no se pueden diferenciar las posibles contracciones celulares de los cambios de volumen celular. Tripathi y Tripathi (1984b) describieron cambios en la morfología de las células trabeculares en cultivo tratadas con EPI. En este estudio, los cambios inducidos por EPI no se limitaron a la morfología si no que, a concentraciones mayores o iguales a  $10^{-5}\text{M}$ , las células disminuyeron sus movimientos citocinéticos, su actividad mitótica, fagocítica y en muchos casos degeneraron. A concentraciones menores, también se observaron algunos cambios, pero estos fueron más moderados y reversibles. Por otra parte, también se han observado retracciones citoplasmáticas en respuesta a bradikinina (Llobet et al., 1999) o a otros agonistas (Zadunaisky y Spring, 1995). Gills et al. (1998) describieron propiedades contráctiles de las células trabeculares

en un sustrato de silicona polimerizada en respuesta a bradikinina, colchicina, ácido etacrínico y vinblastina. Las implicaciones funcionales de la contracción de las células trabeculares y/o regulación de volumen se discuten más adelante.

Diversos estudios han sugerido la participación de las prostaglandinas como mediadores de los efectos de la EPI. Se ha descrito que, los efectos hipotensores de la EPI, pueden ser inhibidos por la indometacina, un inhibidor de la ciclooxigenasa (Bhattacharjee y Hammond, 1977; Camras et al., 1985; Anderson y Wilson, 1990; Erickson et al., 1994; Crawford et al., 1996). Algunos estudios han relacionado la norepinefrina y otros agonistas adrenérgicos con la síntesis endógena de prostaglandinas (Waitzman et al., 1979; Nebigil y Malik, 1993). En este sentido, se ha descrito la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> por la subunidad  $\beta\gamma$  de las proteínas G (Morris y Malbon, 1999). Los efectos encontrados en el presente estudio muestran un incremento progresivo de la facilidad de evacuación con EPI 10<sup>-8</sup>M, siendo este incremento similar al encontrado para la PGE<sub>2</sub>. La inhibición del efecto de EPI 10<sup>-8</sup>M por la indometacina sugiere que este efecto es mediado por la síntesis y liberación de prostaglandinas. La hipótesis propuesta se basa en la síntesis de PGE<sub>2</sub>, la cual tras la activación de su receptor (EP<sub>2</sub>) produciría un incremento de la evacuación del humor acuoso por síntesis de AMPc en las células trabeculares. La presencia de receptores para prostanoides (Zhao et al., 1995; Anthony et al., 1998) en la red trabecular, la síntesis de estos compuestos por las células de este tejido (Weinreb et al., 1983; Gerritsen et al., 1986) y sus efectos sobre la contractibilidad del tejido (Krauss et al., 1997), sugieren un papel activo de las prostaglandinas en la regulación de la evacuación del humor acuoso.

Por otra parte, se ha demostrado que la estimulación simpática produce la liberación de NE (Gallar y Liu, 1993; Jumblatt et al., 1993) y prostaglandinas al humor acuoso procedentes del iris y del cuerpo ciliar (Engstrom y Dunham, 1982; Yousufzai y Abdel-Latif, 1983; Yohai y Danon, 1987; Yousufzai et al., 1988; Abdel-Latif, 1989). En los estudios citados, la síntesis de prostaglandinas es mediada por NE. Cabe esperar que, en la red trabecular, pueda existir un proceso similar y exista liberación de prostaglandinas mediada por adrenérgicos, ya sea debida a estimulación simpática o derivada de la acción sobre la red trabecular de la NE presente en el humor acuoso.

Si bien el efecto de EPI 10<sup>-8</sup>M puede ser inhibido por la presencia de INDO, la disminución de la facilidad de evacuación encontrada para concentraciones elevadas de EPI no

se inhibe por INDO. Este resultado apoya la idea de que, la disminución de la facilidad inducida por EPI ( $\geq 10^{-6}$ M), es mediada por la activación de otras vías que no implican la síntesis de prostaglandinas.

Tanto los efectos de EPI a bajas concentraciones, como los efectos de PGE<sub>2</sub> pueden ser mediados por la síntesis de AMPc en las células trabeculares. La estimulación con diferentes agonistas como el VIP, PGE<sub>1</sub> (Koh y Yue, 1988), dopamina (Kamezis et al., 1989) o agonistas adrenérgicos (Koh y Yue, 1988; Friedman et al., 1999) induce la síntesis de AMPc en células trabeculares en cultivo. En el presente estudio, los efectos de diferentes drogas (FSK, db-AMPc, IBMX), que implican un aumento de la concentración intracelular de AMPc, producen incrementos de la facilidad de evacuación en segmentos anteriores perfundidos. De los resultados se puede deducir que los niveles de AMPc en la célula trabecular son directamente proporcionales a la facilidad de evacuación, ya que cuando se combinan dos drogas como FSK ( $\uparrow$  AMPc) y IBMX (inhibe la degradación del AMPc) que tienen efectos aditivos sobre la concentración intracelular de AMPc, la facilidad de evacuación es mayor que para las drogas por separado. Los resultados encontrados sugieren que los agonistas que estimulan la síntesis de AMPc en las células trabeculares producen incrementos en la evacuación del humor acuoso. En este sentido, otros autores han mostrado resultados en la misma línea. Tanto la administración de EPI o FSK (Erickson y Nathanson, 1992; Crawford et al., 1996) como de PGE<sub>1</sub> (Dijkstra et al., 1999) aumentaron la concentración de AMPc y, paralelamente, se observó un incremento en la evacuación. Los resultados de este estudio, junto con los de otros autores, sugieren una regulación de la evacuación del humor acuoso a través de la vía convencional mediada por los niveles de AMPc en las células trabeculares.

En diferentes tipos celulares, la estimulación de la adenilato ciclasa activa la vía del AMPc-PKA (proteína kinasa A)-CREB (proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc) (Morris y Malbon, 1999). La síntesis de AMPc y la activación de su vía de transducción de la señal modula la actividad de diferentes canales de membrana como los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L o los canales de K<sup>+</sup> (Brayden, 1996; Beech, 1997; Standen y Quayle, 1998). En particular, en otros tipos de células, se ha descrito la activación del canal de potasio dependiente de calcio de alta conductancia (BK<sub>Ca</sub>) por el AMPc (Brayden, 1996; Standen y Quayle, 1998). Este canal se ha identificado en las células trabeculares y podría ser una diana para los agonistas que estimulan la síntesis de AMPc. En el músculo liso vascular se asocia la activación de la vía del AMPc con la relajación celular y la disminución del tono muscular (Nelson et al., 1990; Standen y Quayle,

1998). Si la contractibilidad de la red trabecular fuese un factor importante en la regulación de la evacuación del humor acuoso tal y como se ha propuesto (Wiederholt y Stumpff, 1998), la vía del AMPc podría estar asociada a la relajación de la red trabecular y al aumento de la evacuación del humor acuoso por esta vía.

A la vista de los resultados encontrados en este estudio y los descritos por otros autores, se puede deducir que la regulación de la evacuación del humor acuoso por la vía convencional se encuentra regulada por los niveles de diferentes segundos mensajeros en la célula trabecular. Los agonistas que activan la fosfolipasa C y generan DAG e IP<sub>3</sub> junto con incrementos de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, mediarían disminuciones de la evacuación, mientras que los agonistas que activan la vía del AMPc (y posiblemente del GMPc) mediarían incrementos de la evacuación (Fig. 5.1). En este sentido, diferentes datos apoyan esta hipótesis. Los agonistas que disminuyen la evacuación como la endotelina-1 (Wiederholt et al., 1995), bradikinina (Llobet et al., 1999);  $\alpha_2$ -adrenérgicos (presente trabajo) y muscarínicos (Wiederholt et al., 1995) inducen la síntesis de IP<sub>3</sub>, movilizaciones de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> o disminuciones de AMPc en las células trabeculares en cultivo (Tanihara et al., 1991; Kohmoto et al., 1994; Kageyama et al., 1996; Stamer et al., 1996; Tao et al., 1998; Llobet et al., 1999). Por otra parte, los agonistas que incrementan la evacuación del humor acuoso como la EPI a bajas concentraciones (Erickson y Nathanson, 1992; Wiederholt et al., 1995; Crawford et al., 1996), PGE<sub>1</sub> (Dijkstra et al., 1999), PGE<sub>2</sub> y FSK (presente trabajo), adenosina (Crosson y Petrovich, 1999) o VIP (Nilsson et al., 1986) inducen incrementos de AMPc en las células trabeculares (Koh y Yue, 1988; Erickson y Nathanson, 1992; Crawford et al., 1996; Friedman et al., 1999).

Aceptando la hipótesis anterior como cierta, algunos de los fármacos antiglaucomatosos utilizados actualmente como la EPI, podrían activar diferentes vías simultáneamente. Los fármacos no selectivos, como la EPI, pueden activar las dos vías antes citadas dependiendo de la concentración a la que lleguen a la red trabecular, con lo que el posible efecto terapéutico puede quedar reducido por un efecto secundario a través de otra vía. Del mismo modo, a los efectos terapéuticos producidos por los análogos de la PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  sobre la vía uveoescleral, se les puede añadir un efecto adverso sobre la vía convencional, aunque los estudios hasta la fecha no muestran grandes variaciones de la evacuación por esta vía tras la administración de estos fármacos (Crawford et al., 1987)

En los últimos años se han postulado dos grandes hipótesis para explicar la función de la red trabecular en la regulación de la evacuación del humor acuoso. Como se ha comentado en la Introducción de este trabajo, el grupo de Wiederholt desarrolló una preparación *in vitro* donde se puede estudiar la contracción o relajación de pequeñas tiras de tejido de la red trabecular y describieron las propiedades contráctiles *in vitro* de la red trabecular (Lepple-Wienhues et al., 1991a). Los trabajos de este grupo han estudiado los efectos de diferentes tipos de agonistas sobre la contracción/relajación de la red trabecular. Los agonistas colinérgicos (acetilcolina, pilocarpina y carbacol; Lepple-Wienhues et al. 1991a; Wiederholt et al., 1996), endotelina-1 (Lepple-Wienhues et al., 1991b), agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos (fenilefrina y brimonidina; Wiederholt et al., 1996) y agonistas de tromboxanos (U-46619; Krauss et al., 1997) inducen contracciones en la red trabecular. Los agonistas colinérgicos (acetilcolina, pilocarpina y carbacol) junto con los tromboxanos son los que inducen contracciones mayores en la red trabecular, seguidos en un orden de potencia menor por la endotelina-1 y los agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos (brimonidina), mientras que los agonistas  $\alpha_1$  (fenilefrina) y la EPI inducen pequeñas contracciones (Wiederholt y Stumpff, 1998). Por otra parte, los bloqueantes de canales de  $Ca^{2+}$  (nifedipina, verapamil,  $Ni^{2+}$ ), los donantes de NO, el GMPc, los análogos de  $PGE_2$  y el ácido etacrínico son los agentes relajantes más importantes (Wiederholt y Stumpff, 1998). También se han descrito pequeñas relajaciones de la red trabecular en respuesta a isoproterenol y análogos de  $PGE_1$ . Diferentes mediadores intracelulares tales como inhibidores de proteínas tirosin kinasas (Wiederholt et al., 1998) y la proteína kinasa C (Thieme et al., 1999) pueden regular la función contráctil. Los efectos descritos apoyan la hipótesis de que los agonistas que incrementan el AMPc o el NO en las células trabeculares y que, por lo tanto, favorecen la relajación del tejido, incrementarían la evacuación del humor acuoso. En cambio, los agonistas que movilizan  $IP_3$  y  $Ca^{2+}$  y que inducen contracción de la red trabecular, disminuirían la evacuación del humor acuoso por esta vía. En este sentido, la red trabecular actuaría de manera parecida a la función de la musculatura lisa vascular (Nelson et al., 1990; Beech, 1997; Nilsson, 1998) regulando el tono vascular en respuesta a diferentes tipos de agonista. Para esta función, hay que esperar que las células trabeculares tengan la maquinaria celular necesaria para la contracción. Así, se han descrito diferentes poblaciones de células en la red trabecular bovina según su morfología y sus propiedades electrofisiológicas (Coroneo et al., 1991; Lepple-Wienhues et al., 1994). La población con características similares a las células del músculo liso vascular podría ser la responsable de la contracción del tejido. Según el potencial de membrana encontrado, el  $\approx 25\%$  de las células son de este tipo, mientras que el resto serían parecidas a células del endotelio

vascular. La tinción específica de  $\alpha$ -actina de músculo liso muestra un porcentaje similar de células con filamentos contráctiles (Coroneo et al., 1991). En otras especies, el porcentaje de células con  $\alpha$ -actina de músculo liso es similar el encontrado en bovinos, siendo del  $\approx 10\%$  en monos, del  $\approx 20\%$  en humanos (Tamm et al., 1996) y  $< 10\%$  en ratones (Tamm et al., 1999). Tanto el porcentaje de células descrito a través de la electrofisiología como por la inmunocitoquímica son similares y muestran que la población de este tipo de células es pequeña, aunque no se descarta que su capacidad contráctil pueda ser funcionalmente significativa. Las células que son negativas a la tinción de  $\alpha$ -actina de músculo liso y que muestran un potencial de membrana más alto (Coroneo et al., 1991) no tendrían función contráctil y su función específica se desconoce.

Otros grupos han estudiado la regulación de volumen de las células de la red trabecular y su relación con la evacuación del humor acuoso. Los efectos de los cambios de volumen inducidos por la osmolaridad del medio fueron estudiados específicamente en la evacuación del humor acuoso por Gual et al. (1997). En este estudio, los cambios de volumen modifican la facilidad de evacuación de manera que la hipertonicidad ( $\downarrow$  volumen celular) aumenta la evacuación mientras que la hipotonicidad ( $\uparrow$  volumen celular) la disminuye. Por otra parte, el grupo de O'Donnell identificó en las células trabeculares humanas y bovinas el cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  que participa en la regulación del volumen celular (O'Donnell et al., 1995). En este estudio se describe como, los efectos de diferentes sustancias que activan o inhiben el cotransportador, modifican la permeabilidad de las células trabeculares cultivadas en monocapa. La actividad del cotransportador es estimulada por sustancias que aumentan el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y activan la proteína quinasa C como la vasopresina o ionóforos de  $\text{Ca}^{2+}$  (O'Donnell et al., 1995). A la vez, estas sustancias se han relacionado con disminuciones de la evacuación del humor acuoso (Al-Aswad et al., 1999; Brandt y O'Donnell, 1999). Por el contrario, las sustancias que aumentan los nucleótidos cíclicos en las células trabeculares (AMPc y GMPc), como agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (isoproterenol) y análogos de AMPc o GMPc (8-BrAMPc y 8-BrGMPc), inhiben la actividad del cotransportador y aumentan la facilidad de evacuación (O'Donnell et al., 1995; Al-Aswad et al., 1999; presente trabajo). Finalmente, los efectos de la osmolaridad sobre la evacuación del humor acuoso descritos por Gual et al. (1997) se han relacionado con la actividad de este cotransportador en el estudio de Al-Aswad et al. (1999). En condiciones hiperosmóticas, donde el volumen celular se reduce y la facilidad de evacuación aumenta, el cotransportador es estimulado para recuperar el volumen celular normal en condiciones isosmóticas. Si se añade

bumetanida (inhibidor del cotransportador) el volumen celular no se recupera. De manera similar, la bumetanida incrementa la evacuación del humor acuoso por inhibición del cotransportador (Al-Aswad et al., 1999). En contraste, en condiciones hiposmóticas donde el volumen celular aumenta y la facilidad de evacuación disminuye, el cotransportador resta inhibido para recuperar el volumen celular normal. Epstein et al. (1987) describió incrementos de la facilidad de evacuación tras la administración de ácido etacrínico en ojos de primates y bovinos. El ácido etacrínico es un inhibidor del cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  (O'Donnell et al., 1995) por lo que los efectos encontrados apoyan la hipótesis descrita anteriormente.

Cabe la posibilidad de que, los efectos encontrados en el presente trabajo, sean mediados al menos en parte por la estimulación / inhibición del cotransportador  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ , ya que los incrementos de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  producidos por los agonistas adrenérgicos en las células trabeculares pueden estimular la actividad del cotransportador y, los cambios de forma observados, podrían ser cambios del volumen celular debidos a esta estimulación. En este caso, los agentes que aumentan el AMPc en la célula trabecular incrementarían la evacuación del humor acuoso a través de una inhibición del cotransportador.

Por otra parte, se ha observado que la expresión y la actividad del cotransportador está disminuida en células trabeculares de pacientes con glaucoma comparado con células trabeculares de individuos normales y además, el volumen celular es mayor en el caso de las células trabeculares glaucomatosas (Putney et al., 1999b) por lo que se ha postulado una disfunción de este transportador en la fisiopatología del glaucoma (Brandt y O'Donnell, 1999).

A la vista de los datos descritos hasta este momento, es obvio que, la función de la red trabecular está altamente regulada por la acción de numerosas sustancias sobre las células trabeculares y por numerosos factores presentes en el medio como la presión, la osmolaridad, la composición del humor acuoso, el tono del músculo ciliar, etc... Muchos de estos factores dependen, en gran parte, de la acción del sistema nervioso. Tal y como se ha descrito en la Introducción de este trabajo, la estimulación o denervación de diferentes nervios oculares provoca cambios importantes en la IOP, la evacuación del humor acuoso o la producción del mismo (ver apartado 2.6 de la Introducción). Durante muchos años se ha hipotetizado sobre el control de la presión intraocular por parte del sistema nervioso (Stone y Kuwayama, 1989), pero los numerosos estudios no han llegado a conclusiones definitivas.

En cuanto a las estructuras de la vía convencional de evacuación del humor acuoso, si bien la inervación sensorial es la que tiene una presencia más importante, hasta el momento no se ha descrito si juega algún papel en la regulación de la evacuación. Los estudios que han registrado la actividad nerviosa aferente (von Sallmann et al., 1958; Lele y Grimes, 1960; Perkins, 1961; Belmonte et al., 1971; Zuazo et al., 1986) han detectado cambios en la actividad nerviosa en respuesta a cambios en la IOP, lo que sugiere la presencia de algún "sensor" de la IOP a nivel del globo ocular, pero este baroreceptor no se ha descrito con claridad. Algunos de los "sensores" que podrían actuar de esta manera podrían ser los mecanorreceptores identificados en la úvea (Mintzenig et al., 1995) o en otras estructuras de la cámara anterior (Belmonte et al., 1997). Por otra parte se han descrito estructuras a nivel del espón escleral que podrían actuar como baroreceptores (Tamm et al., 1994) o estructuras parecidas a receptores sensoriales en el ángulo iridocorneal de algunos animales (Stone y Kuwayama, 1989). La información sobre estas estructuras, hasta la fecha, se limita a estudios histológicos, con lo que la posible función es desconocida. Por otra parte, la presencia de numerosos neuropéptidos relacionados con la inervación sensorial (sustancia P, CGRP, galanina) sugiere un papel activo de este tipo de inervación en la red trabecular.

La inervación eferente del ojo es muy importante en ciertas estructuras (iris, coroides,...) y su presencia en el ángulo iridocorneal está descrita (Ten Tusscher et al., 1994). Igual que en el caso anterior, numerosos estudios han estimulado el sistema nervioso simpático o parasimpático y han detectado cambios en la IOP y en la evacuación del humor acuoso, pero los resultados son variables por la multitud de parámetros a los que afectan (evacuación y producción del humor acuoso, tono muscular, ...). En cuanto a la inervación simpática, se han descrito terminaciones adrenérgicas en la red trabecular (Ruskell, 1976) sobretodo en la trabécula iridouveal, por lo que se piensa que éstas deben jugar algún papel en la regulación de la evacuación. La presencia de receptores adrenérgicos y los efectos de los fármacos adrenérgicos sugieren un papel funcional de esta inervación. Los diferentes estudios hasta la fecha muestran que la estimulación del sistema simpático produciría disminuciones en la evacuación del humor acuoso de manera aguda (Henderson y Starling, 1904; Greaves y Perkins, 1952; Gallar y Liu, 1993), pero a largo término, se han encontrado aumentos en la evacuación (Henderson y Starling, 1904; Greaves y Perkins, 1952; Bill, 1970). Estos resultados podrían ser debidos a un efecto inicial sobre los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y, posteriormente, un efecto más sostenido sobre los  $\beta$ -adrenérgicos. La presencia de fibras inmunoreactivas a neuropéptido Y en la red trabecular (Stone, 1986b; Stone et al., 1986) sugiere un papel activo de este neuropéptido en la

red trabecular. Es posible que la liberación de neuropéptido Y junto con norepinefrina module el efecto de este neurotransmisor en ciertas situaciones, mientras que en condiciones "basales" los efectos de norepinefrina sean en otro sentido. Hasta la fecha no hay estudios que hayan determinado un papel fisiológico del neuropéptido Y en la red trabecular.

La utilización de diferentes fármacos adrenérgicos en el tratamiento del glaucoma y los estudios sobre los diferentes tipos de receptores, neurotransmisores y neuropéptidos identificados en la red trabecular, sugieren un papel regulador del sistema nervioso simpático en la evacuación del humor acuoso, pero son necesarios más estudios para determinar el papel de las terminaciones adrenérgicas identificadas.

En los últimos años, la red trabecular ha pasado de tener un papel pasivo a mostrar numerosas propiedades en la regulación de la evacuación del humor acuoso. Las similitudes de las células de la red trabecular con células del endotelio vascular o del músculo liso vascular, deberían ayudar a entender la función de este tejido. Como han mostrado algunos trabajos (Coroneo et al., 1991; Lepple-Wienhues et al., 1994), es posible que exista en la red trabecular más de una población de células con propiedades diferentes. Las diferencias morfológicas entre las diferentes partes de la red trabecular hacen pensar en diferentes poblaciones de células en cada una de ellas. Aunque no hay estudios en este sentido, es posible que las células de la trabécula cribiforme y corneoescleral sean más parecidas a las células endoteliales por su proximidad al canal de Schlemm, que no deja de ser un vaso sanguíneo modificado y, además, las capas más internas de la trabécula corneoescleral se continúan con el endotelio de la córnea. Por otra parte, las células de la trabécula iridouveal podrían ser más parecidas al músculo liso vascular y ejercer una regulación del flujo del humor acuoso a través de la contracción celular. Por el momento, es difícil estudiar la función específica de cada una de estas zonas de la red trabecular por su mala accesibilidad y las dificultades técnicas que comportan.

Los estudios de los últimos años nos permiten proponer a la red trabecular y al canal de Schlemm como tejidos altamente regulados y capaces de modificar el flujo del humor acuoso a través de ellos en respuesta a diferentes situaciones, y abandonar la visión de tejidos estructurales y pasivos en la evacuación del humor acuoso.





# **CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

Para una mejor comprensión, se presentan once conclusiones distribuidas en función de los cinco objetivos concretos propuestos (Pag 64).

### *Objetivo nº 1*

1. Los agonistas adrenérgicos no selectivos (EPI y NE) disminuyen la evacuación del humor acuoso a través de la vía convencional (red trabecular y canal de Schlemm) de manera específica y aguda.
2. Sin embargo, la EPI tiene un efecto dual sobre la evacuación del humor acuoso: a concentraciones  $\geq 10^{-6}M$  disminuye la evacuación del humor acuosos mientras que a la concentración de  $10^{-8}M$  la aumenta.

### *Objetivo nº 2*

3. La disminución de la evacuación del humor acuoso producida por los agonistas adrenérgicos es mediada selectivamente por los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos.
4. El aumento de la evacuación del humor acuoso producido por la EPI  $\leq 10^{-8}M$  es mediado por una vía diferente en la que se encuentran implicadas las prostaglandinas.

### *Objetivo nº 3*

5. Los agonistas adrenérgicos que disminuyen la evacuación del humor acuoso, inducen, en las células trabeculares, movilizaciones de  $[Ca^{2+}]_i$ .
6. La estimulación de las células trabeculares con agonistas adrenérgicos produce incrementos del  $[Ca^{2+}]_i$  que recuperan los niveles basales en pocos segundos ( $T_{70}=21-30s$ ). Además el calcio intracelular muestra un patrón oscilatorio en un 40 - 50% de las células dependiendo del agonista adrenérgico utilizado.

7. Las células que responden al estímulo adrenérgico con movilizaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuyen el área celular significativamente mediante retracciones citoplasmáticas. Los cambios en la morfología se asocian a cambios de volumen celular o a contracción celular.
8. La  $\text{PGE}_2$ , que incrementa la evacuación del humor acuoso, no modifica los niveles de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

*Objetivo nº 4*

9. Existe una relación directa entre los niveles de AMPc en las células trabeculares y la evacuación del humor acuoso, de modo que los aumentos de AMPc incrementan la facilidad de evacuación del humor acuoso.
10. La activación de la adenilato ciclasa con forskolina, incrementa la evacuación del humor acuoso.

*Objetivo nº 5*

11. La red trabecular participa activamente en la evacuación del humor acuoso, siendo su función modulada por la acción de las catecolaminas, bien procedentes de la inervación simpática local o bien de otras estructuras (iris, coroides) vía humor acuoso.





# **REFERENCIAS**

---



---

## 7. REFERENCIAS

1. Abdel-Latif AA. **1989**; Regulation of arachidonate release, prostaglandin synthesis, and sphincter constriction in the mammalian iris-ciliary body. *Progress in Clinical & Biological Research* 312 : p.53
2. Ahlquist RP. **1948**; A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol* 153 p.586
3. Al-Aswad LA, Gong H, Lee D, O'Donnell ME, Brandt JD, Ryan WJ, Schroeder A, Erickson KA. **1999**; Effects of Na-K-2Cl cotransport regulators on outflow facility in calf and human eyes in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (8): p.1695
4. Alexander SPH y Peters JA. **1999**; 1999 Receptor & ion channel nomenclature supplement. *Trends Pharmacol Sci* 10th edition
5. Allen RC, Epstein DL. **1986**; Additive effect of betaxolol and epinephrine in primary open angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 104 (8): p.1178
6. Anderson L, Wilson WS. **1990**; Inhibition by indomethacin of the increased facility of outflow induced by adrenaline. *Exp Eye Res* 50 : p.119
7. Anthony TL, Pierce KL, Stamer WD, Regan JW. **1998**; Prostaglandin F2 alpha receptors in the human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 (2): p.315
8. Armaly M. **1959a**; Studies on intraocular effects of the orbital parasympathetic pathway. I. Technique and effects on morphology. *Arch Ophthalmol* 61 : p.14
9. Armaly M. **1959b**; Studies on intraocular effects of the orbital parasympathetic pathway.II. Effects on intraocular pressure. *Arch Ophthalmol* 62 : p.117
10. Armaly M. **1959c**; Studies on intraocular effects of the orbital parasympathetic pathway. III. Effect on steady-state dynamics. *Arch Ophthalmol* 62 : p.817
11. Armaly MF. **1973**; Glaucoma. *Arch Ophthalmol* 90 : p.485

12. Bartels SP. **1984**; Animal models useful in drug testing. *En: Glaucoma: Applied pharmacology in medical treatment*. Drance SM, Neufeld AH, editores. Grune & Stratton, Orlando, FL: p. 215
13. Bárány EH. **1962**; Transient increase in outflow facility after superior ganglionectomy in rabbits. *Arch Ophthalmol* 67 : p.303
14. Bárány EH. **1964**; Simultaneous measurement of changing pressure and outflow facility in the vervet monkey by constant pressure infusion. *Invest Ophthalmol* 3 p.135
15. Beech DJ. **1997**; Actions of neurotransmitters and other messengers on Ca<sup>2+</sup> channels and K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells. *Pharmacology & Therapeutics* 73 (2): p.91
16. Belmonte C, Bartels SP, Liu JHK, Neufeld AH. **1987a**; Effects of stimulation of the ocular sympathetic nerves on IOP and aqueous humor flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : p.1649
17. Belmonte C, Garcia-Hirschfeld J, Gallar J. **1997**; Neurobiology of ocular pain. *Prog Ret Eye Res* 16 (1): p.117
18. Belmonte C y Giraldez F. **1981**; Responses of cat corneal sensory receptors to mechanical and thermal stimulation. *J Physiol (Lond)* 321 : p.355
19. Belmonte C, Perez E, Lopez-Briones LG, Gallar J. **1987b**; Chronic stimulation of ocular sympathetic fibers in unanesthetized rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 (1): p.194
20. Belmonte C, Simon J, Gallego A. **1971**; Effects of intraocular pressure changes on the afferent activity of ciliary nerves. *Exp Eye Res* 12 : p.342
21. Bergmanson JPG. **1977**; The ophthalmic innervation of the uvea in monkeys. *Exp Eye Res* 24 p.225
22. Berman ER. **1991**; Aqueous, iris-ciliary body, and trabeculum. *En: Biochemistry of the eye*. Blakemore C, editor. Plenum press, New York: 4, p. 151

23. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. **1998**; Calcium-a life and death signal. *Nature* 395 (6703): p.645
24. Bhattacharjee P, Hammond BR. **1977**; Effect of indomethacin on the ocular hypotensive action of adrenaline in the rabbit. *Exp Eye Res* 24 : p.307
25. Bill A. **1969**; Early effects of epinephrine on aqueous humor dynamics in vervet monkeys. *Exp Eye Res* 8: p.35
26. Bill A. **1970**; Effects of norepinephrine, isoproterenol and sympathetic stimulation on aqueous humor dynamics in vervet monkeys. *Exp Eye Res* 10 : p.31
27. Bill A y Svedbergh B. **1972**; Scanning electron microscopic studies of the trabecular meshwork and the canal of Schlemm. An attempt to localize the main resistance to outflow of aqueous humor in man. *Acta Ophthalmol* 50 : p.295
28. Bito LZ. **1984**; Prostaglandins, other eicosanoids, and their derivatives as potential anti-glaucoma agents. *En: Glaucoma: Applied pharmacology in medical treatment*. Drance SM, Neufeld AH, editores. Grune & Stratton, Inc. Orlando, Florida: 20, p. 477
29. Brandt JD y O'Donnell ME. **1999**; How does the trabecular meshwork regulate outflow? Clues from the vascular endothelium. *J Glaucoma* 8 (5): p.328
30. Brayden JE. **1996**; Potassium channels in vascular smooth muscle. *Clin & Experiment Pharmacol & Physiol* 23 (12): p.1069
31. Busch MJWM, Kobayashi K, Hoyng PFJ, Mittag TW. **1993**; Adenylyl cyclase in human and bovine trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : p.3028
32. Bylund DB, Chacko DA, Iversen LJ. **1997**; The alpha-2a subtype is the major alpha-2 adrenergic receptor in human ocular tissues. [Abstract] *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: p.s244
33. Camras CB, Feldman SG, Podos SM, Christensen RE, Gardner SK, Fazio DT. **1985**;

Inhibition of the epinephrine induced reduction of intraocular pressure by systemic indomethacin in humans. *Am J Ophthalmol* 100 : p.169

34. Camras CB, Podos SM, Rosenthal JS, Lee PY, Severin CH. **1987**; Multiple dosing of prostaglandin F2 alpha or epinephrine on cynomolgus monkey eyes. I. Aqueous humor dynamics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 (3): p.463
35. Camras CB, Siebold EC, Lustgarten JS, Serle JB, Frisch SC, Podos SM, Bito LZ. **1989**; Maintained reduction of intraocular pressure by prostaglandin F2 alpha-1-isopropyl ester applied in multiple doses in ocular hypertensive and glaucoma patients. *Ophthalmol* 96 (9): p.1329
36. Camras CB, Toris CB, Tamesis RR. **1999**; Efficacy and adverse effects of medications used in the treatment of glaucoma. *Drugs Aging* 15 (5): p.377
37. Caprioli J. **1987**; The ciliary epithelia and aqueous humor. *En: Adler's Physiology of the eye*. 8th ed. Moses RA, Hart WM, editores. Mosby, St. Luis, Missouri: 7, p. 204
38. Casey WJ. **1966**; Cervical sympathetic stimulation in monkeys and the effects on outflow facility and intraocular volume. *Invest Ophthalmol* 5 : p.33
39. Chang AT, Polansky JR, Crook RB. **1996**; Natriuretic peptide receptors on human trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res* 15 (2): p.137
40. Clark AF. **1995**; Steroids, ocular hypertension, and glaucoma. *J Glaucoma* 4 p.354
41. Cobbold PH, Sanchez-Bueno A, Dixon CJ. **1991**; The hepatocyte calcium oscillator. *Cell Calcium* 12 (2-3): p.87
42. Cole DF. **1984**; Ocular fluids. *En: The eye*. 3rd ed. Davson H, editor. Academic press, Inc. Orlando, Florida: 2, p. 269
43. Coleman AL. **1999**; Glaucoma. *Lancet* 354 (9192): p.1803

44. Cooper RL, Constable IJ, Davidson L. **1984**; Aqueous humor catecholamines. *Curr Eye Res* 3 (6): p.809
45. Coroneo MT, Korbmacher C, Flugel C, Stiemer B, Lutjen-Drecoll E, Wiederholt M. **1991**; Electrical and morphological evidence for heterogeneous populations of cultured bovine trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 52 (4): p.375
46. Crawford KS, Gange SJ, Gabelt BT, Heideman W, Robinson JC, Hubbard WC, Kaufman PL. **1996**; Indomethacin and epinephrine effects on outflow facility and cyclic adenosine monophosphate formation in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (7): p.1348
47. Crawford KS y Kaufman PL. **1991**; Dose-related effects of prostaglandin F<sub>2α</sub> isopropylester on intraocular pressure, refraction and pupil diameter in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 : p.510
48. Crawford KS, Kaufman PL, Gabelt BT. **1987**; Effects of topical PGF<sub>2α</sub> on aqueous humor dynamics in cynomolgus monkeys. *Curr Eye Res* 6 : p.1035
49. Crosson CE y Petrovich M. **1999**; Contributions of adenosine receptor activation to the ocular actions of epinephrine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (9): p.2054
50. Davson H. **1984**; The intraocular pressure. *En: The eye*. 3rd ed. Davson H, editor. Academic press, Inc. Orlando, Florida: 3, p. 391
51. De Koninck P y Schulman H. **1998**; Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science* 279 (5348): p.227
52. Dijkstra BG, Schneemann A, Hoyng PF. **1999**; Flow after prostaglandin E1 is mediated by receptor-coupled adenylyl cyclase in human anterior segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (11): p.2622
53. Eakins KE y Ryan SJ. **1964**; The action of sympathomimetic amines on the outflow of aqueous humor from the eye. *Br J Pharmacol* 23 : p.374

54. Ehinger B. **1964**; Adrenergic nerves to the eye and its annexa in rabbit and guinea-pig. *Acta Univ Lund, Section II* 20 : p.1
55. Ehinger B. **1966a**; Ocular and orbital vegetative nerves. *Acta Physiol Scand* 67 : p.1
56. Ehinger B. **1966b**; Adrenergic nerves to the eye and to related structures in man and in cynomolgus monkey (*Macaca irus*). *Invest Ophthalmol* 5 : p. 42
57. Ehinger B. **1971**; A comparative study of the adrenergic nerves to the anterior eye segment of some primates. *Z Zellforsch* 116 : p.157
58. Elena PP, Denis P, Kosina-Boix M, Saraux H, and Lapalus P. **1990**; Beta adrenergic binding sites in the human eye: an autoradiographic study. *J Ocular Pharmacol Ther* 6 (2): p.143
59. Engstrom P y Dunham EW. **1982**; Alpha-adrenergic stimulation of prostaglandin release from rabbit iris-ciliary body in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22 (6): p.757
60. Epstein DL, Freddo TF, Bassett-Chu S, Chung M, Karageuzian L. **1987**; Influence of ethacrynic acid on outflow facility in the monkey and calf eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 (12): p.2067
61. Epstein DL y Rohen JW. **1991**; Morphology of the trabecular meshwork and inner wall endothelium after cationized ferritin perfusion in the monkey eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 : p.160
62. Erickson K, Liang L, Shum P, Nathanson JA. **1994**; Adrenergic regulation of aqueous outflow. *J Ocular Pharmacol* 10 (1): p.241
63. Erickson KA, Schroeder A, Netland PA. **1995**; Verapamil increases outflow facility in the human eye. *Exp Eye Res* 61 (5): p.565
64. Erickson-Lamy K y Nathanson JA. **1992**; Epinephrine increases facility of outflow and cyclic AMP content in the human eye in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33 : p.2672

- 
65. Erickson-Lamy K, Rohen JW, Grant WM. **1988**; Outflow facility studies in the perfused bovine aqueous outflow pathways. *Curr Eye Res* 7 (8): p.799
66. Erickson-Lamy K, Rohen JW, Grant WM. **1991**; Outflow facility studies in the perfused human ocular anterior segment. *Exp Eye Res* 52 (6): p.723
67. Erickson-Lamy K, Schroeder AM, Bassett-Chu S, Epstein DL. **1990**; Absence of time-dependent facility increase ("washout") in the perfused enucleated human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 (11): p.2384
68. Erkilic K, Ekinciler OF, Mirza GE, Dogan H, Cagil N. **1996**; Effects of topically applied prostaglandin F2 alpha on normotensive human eyes. *Ophthalmic Res* 28 (6): p.351
69. Freddo TF, Patterson MM, Scott DR, Epstein DL. **1984**; Influence of mercurial sulfhydryl agents on aqueous outflow pathways in enucleated eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 (3): p.278
70. Friedman Z, Bloom E, and Polansky JR. **1999**; Adrenergic drug effects on cyclic AMP in cultured human trabecular meshwork cells. *Ophthalmic Res* 31 p.53
71. Gabelt BT y Kaufman PL. **1989**; Prostaglandin F2 alpha increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res* 49 (3): p.389
72. Gabelt BT y Kaufman PL. **1990**; The effect of prostaglandin F2 alpha on trabecular outflow facility in cynomolgus monkeys. *Exp Eye Res* 51 (1): p.87
73. Gallar J y Liu JH. **1993**; Stimulation of the cervical sympathetic nerves increases intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 (3): p.596
74. Gerritsen ME, Weinstein BI, Gordon GG, Southren AL. **1986**; Prostaglandin synthesis and release from cultured human trabecular-meshwork cells and scleral fibroblasts. *Exp Eye Res* 43 (6): p.1089
75. Gharagozloo NZ, Larson RS, Kullestrand W, Brubaker RF. **1988**; Terbutaline stimulates

- aqueous humor flow in human during sleep. *Arch Ophthalmol* 106 : p.1218
76. Gharagozloo NZ, Relf SJ, Brubaker RF. **1989**; Aqueous flow is reduced by the alphaadrenergic agonist apraclonidine hydrochloride (ALO 2145). *Ophthalmol* 95 : p.1217
77. Gills JP, Roberts BC, Epstein DL. **1998**; Microtubule disruption leads to cellular contraction in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 (3): p.653
78. Gilmartin B, Hogan RE, Thompson SM. **1984**; The effect of timolol maleate on tonic accommodation, tonic vergence, and pupil diameter. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 : p.763
79. Gloster J. **1961**; Influence of facial nerve on intraocular pressure. *Br J Ophthalmol* 45 : p.513
80. Goh Y, Araie M, Nakajima M, Azuma I, Hayaishi O. **1989**; Effect of topical prostaglandin D2 on the aqueous humor dynamics in rabbits. *Graefes Archive for Clinical & Experimental Ophthalmology* 227 (5): p.476
81. Golding-Wood J. **1964**; The ocular effects of autonomic surgery. *Proc R Soc Med* 57 : p.494
82. Greaves DP y Perkins ES. **1952**; Influence of the sympathetic nervous system on the intraocular pressure and vascular circulation of the eye. *Br J Ophthalmol* 36 : p.258
83. Greaves DP y Perkins ES. **1953**; Influence of the third cranial nerve on intraocular pressure. *Br J Ophthalmol* 37 : p.54
84. Grierson I, Lee WR, Abraham S. **1978**; Effects of pilocarpine on the morphology of the human outflow apparatus. *Br J Ophthalmol* 62 (5): p.302
85. Gual A, Blanco J, Belmonte C, Garcia AG. **1983**; Dopamine  $\beta$ -hydroxylase activity in human aqueous humor. *Exp Eye Res* 37 : p.99
86. Gual A y de Castro FR. **1985**; Effects of ocular blood flow changes on the efferent activity of the cat ciliary nerves. *Ophthalmic Res* 17 : p.230

- 
87. Gual A, Garcia AG, Belmonte C. **1982**; Dopamine  $\beta$ -hydroxylase activity in the aqueous humour: effects of cervical sympathetic stimulation and reserpine. *Exp Eye Res* 34 p.789
88. Gual A, Llobet A, Gilabert R, Borrás M, Pales J, Bergamini MV, Belmonte C. **1997**; Effects of time of storage, albumin, and osmolality changes on outflow facility (C) of bovine anterior segment in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 (10): p.2165
89. Gual A, Mintenig GM, Belmonte C. **1989**; Intraocular pressure effects of water loading and venous compression tests in normal and denervated pigmented rabbits. *Exp Eye Res* 48 : p.365
90. Gupta N, Drance SM, McAllister R, Prasad S, Rootman J, Cynader MS. **1994**; Localization of M3 muscarinic receptor subtype and mRNA in the human eye. *Ophthalmic Res* 26 (4): p.207
91. Hamada H, Damron DS, Hong SJ, Van Wagoner DR, Murray PA. **1997**; Phenylephrine-induced  $Ca^{2+}$  oscillations in canine pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 81 (5): p.812
92. Haque MS, Pang IH, Magnino PE, DeSantis L. **1998**; Activation of phospholipase C and guanylyl cyclase by endothelins in human trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res* 17 (12): p.1110
93. Hara H, Kobayashi S, Sugita K, Tsukahara S. **1982**; Innervation of dog ciliary ganglion. *Histochemistry* 76 p.295
94. Hart WM. **1994**; Presión intraocular. *En: Adler. Fisiología del ojo*. 9th ed. Hart WM, editores. Mosby / Doyma Libros, Madrid: 8, p. 250
95. Hayashi M, Yablonski ME, Bito LZ. **1987**; Eicosanoids as a new class of ocular hypotensive agents. 2. Comparison of the apparent mechanism of the ocular hypotensive effects of A and F type prostaglandins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 (10): p.1639
96. Henderson EE y Starling EH. **1904**; The influence of changes in the intraocular circulation on the intraocular pressure. *J Physiol (Lond)* 31 : p.305
-

97. Holland MG, Von Sallmann L, Collins EM. **1957**; A study of the innervation of the chambre angle. II: The origin of trabecular axons revealed by degeneration experiments. *Am J Ophthalmol* 41 : p.206
98. Howard GC, Roberts BC, Epstein DL, Pizzo SV. **1996**; Characterization of alpha 2-macroglobulin binding to human trabecular meshwork cells: presence of the alpha 2-macroglobulin signaling receptor. *Arch Biochem Biophys* 333 (1): p.19
99. Huang Y, Gil DW, Vanscheeuwijck P, Stamer WD, Regan JW. **1995**; Localization of alpha 2-adrenergic receptor subtypes in the anterior segment of the human eye with selective antibodies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 (13): p.2729
100. Hurvitz LM, Kaufman PL, Robin AL, Weinreb RN, Crawford C, Shaw B. **1991**; New developments in the drug treatment of glaucoma. *Drugs* 41 : p.514
101. Inomata H, Bill A, Smelser GK. **1972**; Aqueous humor pathways through the trabecular meshwork and into Schlemm's canal in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*). An electron microscopy study. *Am J Ophthalmol* 73 : p.760
102. Jacob R. **1991**; Calcium oscillations in endothelial cells. *Cell Calcium* 12 (2-3): p.127
103. Jaffe NS. **1948**; Sympathetic nervous system and intraocular pressure. *Am J Ophthalmol* 31 : p.1597
104. Jampel HP, Lynch MG, Brown RH, Kuhar MJ, De Souza EB. **1987**; Beta-adrenergic receptors in human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 : p.772
105. Jin Y, Verstappen A, Yorio T. **1994**; Characterization of alpha 2-adrenoceptor binding sites in rabbit ciliary body membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 (5): p.2500
106. Johnson DH y Brubaker RF. **1986**; Glaucoma: An overview. *Mayo Clini Proc* 61 : p.59
107. Jumblatt JE, Ohia SE, Hackmiller RC. **1993**; Prejunctional modulation of norepinephrine

- release in the human iris-ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 (9): p.2790
108. Kageyama M, Fujita M, Shirasawa E. **1996**; Endothelin-1 mediated Ca<sup>2+</sup> influx does not occur through L-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in cultured bovine trabecular meshwork cells. *J Ocular Pharmacol Ther* 12 (4): p.433
109. Kanno M, Araie M, Tomita K, Sawanobori K. **1998**; Effects of topical nipradilol, a beta-blocking agent with alpha-blocking and nitroglycerin-like activities, on aqueous humor dynamics and fundus circulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 (5): p.736
110. Kanski JJ. **1996**; Glaucoma. *En: Oftalmología clínica*. 3rd ed. Kanski JJ, editor. Mosby / Doyma libros, Barcelona: 7, p. 148
111. Karnezis TA, Tripathi BJ, Dawson G, Murphy MB, Tripathi RC. **1989**; Effects of dopamine receptor activation on the level of cyclic AMP in the trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 (6): p.1090
112. Kaufman PL. **1984**; Aqueous humor outflow. *Current Topics in Eye Research* 4 : p.97
113. Kaufman PL. **1987**; Adenosine 3',5'-cyclic-monophosphate and outflow facility in monkey eyes with intact and retrodisplaced ciliary muscle. *Exp Eye Res* 44 (3): p.415
114. Kaufman PL. **1989**; Pressure-dependent outflow. *En: The glaucoma*. Ritch F, Shields MB, Krupin T, editors. CV Mosby, St Louis: p. 199
115. Kaufman PL y Bány EH. **1976**; Loss of acute pilocarpine effect on outflow facility following surgical disinsertion and retrodisplacement of the ciliary muscle from the scleral spur in the Cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol* 15 : p.793
116. Kaufman PL y Bány EH. **1981**; Adrenergic drug effects on aqueous outflow facility following ciliary muscle retrodisplacement in the cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20 (5): p.644
117. Kaufman PL y Mittag TW. **1994**; Therapy of glaucoma. Medical therapy of glaucoma. *En:*

*Glaucoma.* ; Kaufman PL, Mittag TW, editores. Mosby-Wolfe, London: 9-II,

118. Kaufman PL, Wiedman T, Robinson JR. **1984**; Cholinergics. *En: Pharmacology of the eye.* Sears ML, editors. Springer-Verlag, Berlin: 4, p. 149
119. Kee C, Kaufman PL, Gabelt BT. **1994**; Effect of 8-Br cGMP on aqueous humor dynamics in monkeys. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 (6): p.2769
120. Koh SWM y Yue BYJT. **1988**; Effects of agonists on the intracellular cyclic AMP concentration in monkey trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res* 7 p.75
121. Kohmoto H, Matsumoto S, Serizawa T. **1994**; Effects of endothelin-1 on  $[Ca^{2+}]_i$  and pHi in trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res* 13 (3): p.197
122. Krauss AH, Wiederholt M, Sturm A, Woodward DF. **1997**; Prostaglandin effects on the contractility of bovine trabecular meshwork and ciliary muscle. *Exp Eye Res* 64 (3): p.447
123. Langham ME y Rosenthal AR. **1966**; Role of cervical sympathetic nerve in regulating intraocular pressure and circulation. *Am J Physiol* 210 : p.786
124. Langham ME y Taylor CB. **1960a**; The influence of pre- and post-ganglionic section of the cervical sympathetic on the intraocular pressure of rabbits and cats. *J Physiol (Lond)* 152 : p.437
125. Langham ME y Taylor CB. **1960b**; The influence of superior cervical ganglionectomy on intraocular dynamics. *J Physiol (Lond)* 152 : p.447
126. Laties A y Jacobowitz D. **1964**; A histochemical study of the adrenergic and cholinergic innervation of the anterior segment of the rabbit eye. *Invest Ophthalmol* 3 p.592
127. Laties A y Jacobowitz D. **1966**; A comparative study of the autonomic innervation of the eye in monkey, cat, and rabbit. *Anat Rec* 156 : p.383
128. Laties AM, Stone RA, Brecha NC. **1981**; Substance P like immunoreactive nerve fibers in

- 
- thr trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21 : p.484
129. Lee DA y Topper JF, Brubaker RF. **1984a**; Effect of clonidine on aqueous humor flow in normal human eyes. *Exp Eye Res* 38 : p.239
130. Lee PY, Podos SM, Severin C. **1984b**; Effect of prostaglandin F2 alpha on aqueous humor dynamics of rabbit, cat, and monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 (9): p.1087
131. Lele PP y Grimes P. **1960**; The role of neural mechanisms in the regulation of intraocular pressure in the cat. *Exp Neurol* 2 : p.199
132. Lepple-Wienhues A, Rauch R, Clark AF, Grassmann A, Berweck S, Wiederholt M. **1994**; Electrophysiological properties of cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 59 (3): p.305
133. Lepple-Wienhues A, Stahl F, Wiederholt M. **1991a**; Differential smooth muscle-like contractile properties of trabecular meshwork and ciliary muscle. *Exp Eye Res* 53 (1): p.33
134. Lepple-Wienhues A, Stahl F, Willner U, Schafer R, Wiederholt M. **1991b**; Endothelin-evoked contractions in bovine ciliary muscle and trabecular meshwork: interaction with calcium, nifedipine and nickel. *Curr Eye Res* 10 (10): p.983
135. Lepple-Wienhues A, Stahl F, Wunderling D, Wiederholt M. **1992**; Effects of endothelin and calcium channel blockers on membrane voltage and intracellular calcium in cultured bovine trabecular meshwork cells. *Ger J Ophthalmol* 1 (3-4): p.159
136. Liang LL, Epstein DL, de Kater AW, Shahsafaei A, Erickson-Lamy KA. **1992**; Ethacrynic acid increases facility of outflow in the human eye in vitro. *Arch Ophthalmol* 110 (1): p.106
137. Lieb WA, Guerry D, Ellis LJ. **1958**; Effects of superior cervical ganglionectomy on aqueous humor dynamics. *Arch Ophthalmol* 60 : p.31
138. Linnér E y Prijot E. **1955**; Cervical sympathetic ganglionectomy and aqueous flow. *Arch Ophthalmol* 54 : p.831
-

139. Linnér E y Prijot E. **1957**; Preganglionic cervical sympathectomy and aqueous flow. *Arch Ophthalmol* 58 : p.77
140. Llobet A, Gual A, Pales J, Barraquer R, Tobias E, Nicolas JM. **1999**; Bradykinin decreases outflow facility in perfused anterior segments and induces shape changes in passaged BTM cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (1): p.113
141. Lütjen-Drecoll E y Rohen JW. **1989**; Morphology of aqueous outflow pathways in normal and glaucomatous eyes. *En: The glaucomas*. Klein EA, editor. C.V. Mosby, St. Louis: p. 89
142. Lütjen-Drecoll E y Rohen JW. **1994a**; The normal anterior segment. Anatomy of aqueous humor formation and drainage. *En: Glaucoma*. Kaufman PL, Mittag TW, editores. Mosby-Wolfe, London: 1
143. Lütjen-Drecoll E y Rohen JW. **1994b**; Specific types of glaucoma. Pathology of the trabecular meshwork in primary open-angle glaucoma. *En: Glaucoma*. ; Kaufman PL, Mittag TW, editores. Mosby-Wolfe, London: 8-V
144. Macri FJ y Cevario SJ. **1975**; Ciliary ganglion stimulation. I. Effects on aqueous humor inflow and outflow. *Invest Ophthalmol* 14: p.28
145. Maepea O y Bill A. **1989**; The pressure in the episcleral veins, Schlemm's canal and the trabecular meshwork in monkeys: Effects of changes in intraocular pressure. *Exp Eye Res* 49: p.645
146. Marfurt CF. **1981**; The somatotopic organization of the cat trigeminal ganglion as determined by the horseradish peroxidase technique. *Anat Rec* 201 (105): p.118
147. Mastropasqua L, Carpineto P, Ciancaglini M, Lobefalo L, Costagliola PE, Gallenga C. **1996**; Effect of dapiprazole, an alpha-adrenergic blocking agent, on aqueous humor dynamics in pigmentary glaucoma. *Ophthalmic Res* 28 (5): p.312
148. Matsuo T y Matsuo N. **1996**; Intracellular calcium response to hydraulic pressure in

- human trabecular cells. *Br J Ophthalmol* 80 (6): p.561
149. Melena J, Zalduegui A, Arcocha P, Santafe J, Segarra J. **1999**; Topical verapamil lowers outflow facility in the rabbit eye. *J Ocular Pharmacol Ther* 15 (3): p.199
150. Meyer T y Stryer L. **1991**; Calcium spiking. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 20 p.153
151. Mintenig GM, Sánchez-Vives MV, Martin C, Gual A, Belmonte C. **1995**; Sensory receptors in the anterior uvea of the cat's eye. An in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36 : p.1615
152. Mittag TW y Tormay A. **1985**; Adrenergic receptor subtypes in rabbit iris-ciliary body membranes: classification by radioligand studies. *Exp Eye Res* 40 (2): p.239
153. Morris AJ y Malbon CC. **1999**; Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 79 (4): p.1373
154. Murray DL, Podos SM, Wei C, Leopold IH. **1979**; Ocular effects in normal rabbits of topically applied labetalol: a combined alpha- and beta-adrenergic antagonist. *Arch Ophthalmol* 97 (4): p.723
155. Nathanson JA. **1980**; Adrenergic regulation of intraocular pressure: identification of beta 2-adrenergic-stimulated adenylate cyclase in ciliary process epithelium. *PNAS USA* 77 (12): p.7420
156. Nebigil C y Malik KU. **1993**; Alpha adrenergic receptor subtypes involved in prostaglandin synthesis are coupled to  $Ca^{2+}$  channels through a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein. *J Pharmacol Exp Ther* 266 : p.1113
157. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. **1990**; Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 259 (1 Pt 1): p.C3
158. Nilsson H. **1998**; Interactions between membrane potential and intracellular calcium

- concentration in vascular smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 164 (4): p.559
159. Nilsson SFE. **1986**; Studies on ocular blood flow and aqueous humor dynamics. Effects of VIP and PHI related to the effects of facial nerve stimulation. *Acta Univ Uppsala* 43 : p.1
160. Nilsson SFE y Bill A. **1994**; The normal anterior segment. Physiology and neurophysiology of aqueous humor inflow and outflow. *En: Glaucoma*. Kaufman PL, Mittag TW, editores. Mosby-Wolfe, London: 1-II,
161. Nilsson SFE, Linder J, Bill A. **1985**; Characteristics of uveal vasodilation produced by facial nerve stimulation in monkeys, cats and rabbits. *Exp Eye Res* 40 : p.841
162. Nomura T, Smelser GK. **1974**; The identification of adrenergic and cholinergic nerve endings in the trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol* 13 : p.525
163. O'Donnell ME, Brandt JD, Curry FR. **1995**; Na-K-Cl cotransport regulates intracellular volume and monolayer permeability of trabecular meshwork cells. *Am J Physiol* 268 (4 Pt 1): p.C1067
164. Ohuchi T, Tanihara H, Yoshimura N, Kuriyama S, Ito S, Honda Y. **1992**; Neuropeptide-induced  $[Ca^{2+}]_i$  transients in cultured bovine trabecular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33 (5): p.1676
165. Oshika T y Araie M. **1990**; [Changes in intraocular pressure and aqueous humor dynamics of normal human eyes after topical application of bunazosin hydrochloride]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi - Acta Societatis Ophthalmologicae Japonicae* 94 (8): p.762
166. Oshika T, Araie M, Sugiyama T, Nakajima M, Azuma I. **1991**; Effect of bunazosin hydrochloride on intraocular pressure and aqueous humor dynamics in normotensive human eyes. *Arch Ophthalmol* 109 (11): p.1569
167. Palkama A, Uusitalo H, Lehtosalo J. **1986**; Innervation of the anterior segment of the eye: with special reference to functional aspects. *En: Neurohistochemistry: modern methods and applications*. Panula P, Paivarinta H, Soynila S, editores. Alan R Liss, Inc, New York: p. 587

168. Palkama A, Uusitalo H, Stjernschantz J. **1974**; Some aspects on nervous control of aqueous humor dynamics in the rabbit eye. *Acta Ophthalmol* 123 : p.17
169. Pang IH, Shade DL, Clark AF, Steely HT, DeSantis L. **1994**; Preliminary characterization of a transformed cell strain derived from human trabecular meshwork. *Curr Eye Res* 13 (1): p.51
170. Pang IH, Shade DL, Matsumoto S, Steely HT, DeSantis L. **1996**; Presence of functional type B natriuretic peptide receptor in human ocular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (9): p.1724
171. Panneton WM y Burton H. **1981**; Corneal and periocular representation within the trigeminal sensory complex in the cat studied with transganglionic transport of horeseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 199 p.327
172. Paterson CA. **1966**; The effect of sympathetic nerve stimulation on the aqueous humor dynamics on the cocaine pretreated rabbit. *Exp Eye Res* 5 : p.37
173. Perkins ES. **1957**; Influence of the fifth cranial nerve on the intra-ocular pressure of the rabbit eye. *Br J Ophthalmol* 41 : p.257
174. Perkins ES. **1961**; Sensory mechanism and intraocular pressure. *Exp Eye Res* 1 : p.160
175. Polansky JR. **1990**; Beta-adrenergic therapy for glaucoma. *Int Ophthalmol Clin* 30 : p.219
176. Potter DE. **1981**; Adrnergic pharmacology of aqueous humor dynamics. *Pharmacol Rev* 33 (3): p.133
177. Poyer JF, Gabelt B, Kaufman PL. **1992**; The effect of topical PGF2 alpha on uveoscleral outflow and outflow facility in the rabbit eye. *Exp Eye Res* 54 (2): p.277
178. Putney LK, Vibat CR, O'Donnell ME. **1999a**; Intracellular Cl regulates Na-K-Cl cotransport activity in human trabecular meshwork cells. *Am J Physiol* 277 (3 Pt 1): p.C373

179. Putney LK, Brandt JD, O'Donnell ME. **1999b**; Na-K-Cl cotransport in normal and glaucomatous human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (2): p.425
180. Reiner A, Karten HJ, Gamlin PDR, Erichsen JT. **1983**; Parasympathetic ocular control. Functional subdivision and circuitry of the avian nucleus of Edinger-Westphal. *Trends Neurosci* April p.140
181. Robin AL. **1988**; Short-term effects of unilateral 1% apraclonidine therapy. *Arch Ophthalmol* 106 : p.912
182. Robinson JC y Kaufman PL. **1990**; Effects and interactions of epinephrine, norepinephrine, timolol, and betaxolol on outflow facility in the cynomolgus monkey. *Am J Ophthalmol* 109 : p.189
183. Rohen JW. **1982**; The evolution of the primate eye in relation to the problem of glaucoma. *En: Basic aspects of glaucoma research*. Lütjen-Drecoll E, editor. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York: p. 3
184. Rohen JW, Futa R, Lütjen-Drecoll E. **1981**; The fine structure of the cribiform meshwork in normal and glaucomatous eyes as seen in tangential sections. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21 : p.574
185. Ruskell GL. **1970**; An ocular parasympathetic nerve pathway of facial nerve origin and its influence on intraocular pressure. *Exp Eye Res* 10 : p.319
186. Ruskell GL. **1976**; The source of nerve fibres of the trabeculae and adjacent structures in monkey eyes. *Exp Eye Res* 23 : p.449
187. Ruskell GL y Griffiths T. **1979**; Peripheral nerve pathway to the ciliary muscle. *Exp Eye Res* 28 p.277
188. Santafe J, Martinez d, I, Segarra J, Melena J, Garrido M. **1996**; A complex interaction between topical verapamil and timolol on intraocular pressure in conscious rabbits. *Naunyn-*

---

*Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 354 (2): p.198

189. Schmerl E y Steinberg B. **1949**; The role of ciliary and superior cervical ganglia in ocular tension. *Am J Ophthalmol* 32 : p.947
190. Schneider TL, Brubaker RF. **1990**; The effect of chronic epinephrine on aqueous humor flow during the day and during sleep in healthy volunteers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 (ARVO Suppl): p.148
191. Schöfl C, Brabant G, Hesch RD, von zur MA, Cobbold PH, Cuthbertson KS. **1993**; Temporal patterns of alpha 1-receptor stimulation regulate amplitude and frequency of calcium transients. *Am J Physiol* 265 (4 Pt 1): p.C1030
192. Schuman JS, Erickson K, Nathanson JA. **1994**; Nitrovasodilator effects on intraocular pressure and outflow facility in monkeys. *Exp Eye Res* 58 (1): p.99
193. Sears ML y Bárány EH. **1960**; Outflow resistance and adrenergic mechanisms. *Arch Ophthalmol* 64 : p.839
194. Sears ML y Neufeld AH. **1975**; Adrenergic modulation of the outflow of aqueous humor. *Invest Ophthalmol* 14 : p.83
195. Serle JB, Lustgarten JS, Podos SM. **1991**; A clinical trial of metipranolol, a noncardioselective beta-adrenergic antagonist, in ocular hypertension. *Am J Ophthalmol* 112 (3): p.302
196. Serle JB, Steidl S, Wang RF, Mittag TW, Podos SM. **1991**; Selective alpha 2-adrenergic agonists B-HT 920 and UK14304-18. Effects on aqueous humor dynamics in monkeys. *Arch Ophthalmol* 109 (8): p.1158
197. Serle JB, Stein AJ, Podos SM, Severin CH. **1984**; Corynanthine and aqueous humor dynamics in rabbits and monkeys. *Arch Ophthalmol* 102 (9): p.1385
198. Shade DL, Clark AF, Pang IH. **1996**; Effects of muscarinic agents on cultured human

- trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 62 (3): p.201
199. Sharif NA, Su SX, Yanni JM. **1994**; Emedastine: a potent, high affinity histamine H1-receptor-selective antagonist for ocular use: receptor binding and second messenger studies. *J Ocular Pharmacol* 10 (4): p.653
200. Sharif NA, Xu SX. **1996**; Pharmacological characterization of bradykinin receptors coupled to phosphoinositide turnover in SV40-immortalized human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* 63 (6): p.631
201. Sharif NA, Xu SX, Yanni JM. **1996**; Olopatadine (AL-4943A): ligand binding and functional studies on a novel, long acting H1-selective histamine antagonist and anti-allergic agent for use in allergic conjunctivitis. *J Ocular Pharmacol Ther* 12 (4): p.401
202. Skuta GL. **1994**; Specific types of glaucoma. The angle-closure glaucomas. *En: Glaucoma*. Kaufman PL, Mittag TW, editores. Mosby-Wolfe, London: 8-II,
203. Stamer WD, Huang Y, Seftor RE, Svensson SS, Snyder RW, Regan JW. **1996**; Cultured human trabecular meshwork cells express functional alpha 2A adrenergic receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (12): p.2426
204. Stamer WD, Roberts BC, Epstein DL. **1999**; Hydraulic pressure stimulates adenosine 3',5'-cyclic monophosphate accumulation in endothelial cells from Schlemm's canal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (9): p.1983
205. Stamer WD, Seftor RE, Snyder RW, Regan JW. **1995a**; Cultured human trabecular meshwork cells express aquaporin-1 water channels. *Curr Eye Res* 14 (12): p.1095
206. Stamer WD, Seftor RE, Williams SK, Samaha HA, Snyder RW. **1995b**; Isolation and culture of human trabecular meshwork cells by extracellular matrix digestion. *Curr Eye Res* 14 (7): p.611
207. Standen NB y Quayle JM. **1998**; K<sup>+</sup> channel modulation in arterial smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 164 (4): p.549

208. Stewart WC. **1999**; Perspectives in the medical treatment of glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol* 10 (2): p.99
209. Stjernschantz J. **1976**; Effect of parasympathetic stimulation on intraocular pressure, formation of the aqueous humor and outflow facility in rabbits. *Exp Eye Res* 22 : p.639
210. Stjernschantz J, Bill A. **1980**; Vasomotor effects of facial nerve stimulation: Noncholinergic vasodilatation in the eye. *Acta Physiol Scand* 109 : p.45
211. Stjernschantz J, Geijer C, Bill A. **1979**; Electrical stimulation of the fifth cranial nerve in rabbits: effect on ocular blood flow, extravascular, albumin content and intraocular pressure. *Exp Eye Res* 35 : p.401
212. Stone RA. **1986a**; Vasoactive intestinal polypeptide and the ocular innervation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27 : p.951
213. Stone RA. **1986b**; Neuropeptide Y and innervation of the human eye. *Exp Eye Res* 42 : p.439
214. Stone RA y Kuwayama Y. **1989**; The nervous system and intraocular pressure. *En: The glaucoma*. Ritch F, Shields MB, Krupin T, editores. CV Mosby, St Louis: p. 257
215. Stone RA, Kuwayama Y, Laties AM, McGlinn AM, Schmidt ML. **1984**; Guinea-pig ocular nerves contain a peptide of the cholecystokinin/gastrin family. *Exp Eye Res* 39 : p.387
216. Stone RA, Kuwayama Y, McGlinn AM. **1988**; Galanin-like immunoreactive nerves in the porcine eye. *Exp Eye Res* 46 : p.457
217. Stone RA, Laties AM, Emson PC. **1986**; Neuropeptide Y and the ocular innervation of rat, guinea pig, cat and monkey. *Neuroscience* 17 : p.1207
218. Stone RA y McGlinn AM. **1988**; Calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerves in human and rhesus monkey eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29 : p.305

219. Straiker AJ, Maguire G, Mackie K, Lindsey J. **1999**; Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (10): p.2442
220. Stumpff F, Que Y, Boxberger M, Strauss O, Wiederholt M. **1999**; Stimulation of maxi-K channels in trabecular meshwork by tyrosine kinase inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (7): p.1404
221. Stumpff F, Strauss O, Boxberger M, Wiederholt M. **1997**; Characterization of maxi-K-channels in bovine trabecular meshwork and their activation by cyclic guanosine monophosphate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 (9): p.1883
222. Suzuki R, Karageuzian LN, Crean EV, Anderson PJ. **1997**; Effects of adrenergic agents and phosphodiesterase inhibitors on outflow facility and cell shape of bovine trabecular meshwork. *Jpn J Ophthalmol* 41 (1): p.31
223. Takashima Y, Taniguchi T, Yoshida M, Haque MS, Igaki T, Itoh H, Nakao K, Honda Y, Yoshimura N. **1998**; Ocular hypotension induced by intravitreally injected C-type natriuretic peptide. *Exp Eye Res* 66 (1): p.89
224. Takashima Y, Taniguchi T, Yoshida M, Haque MS, Yoshimura N, Honda Y. **1996**; Ocular hypotensive mechanism of intravitreally injected brain natriuretic peptide in rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37 (13): p.2671
225. Tamm ER, Flugel C, Stefani FH, Lutjen-Drecoll E. **1994**; Nerve endings with structural characteristics of mechanoreceptors in the human scleral spur. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 (3): p.1157
226. Tamm ER, Russell P, Piatigorsky J. **1999**; Development of characterization of a immortal and differentiated murine trabecular meshwork cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (7): p.1392
227. Tamm ER, Siegner A, Baur A, Lutjen-Drecoil E. **1996**; Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle-actin expression in cultured human and monkey trabecular

- meshwork. *Exp Eye Res* 62 (4): p.389
228. Tanihara H, Ohuchi T, Yoshimura N, Negishi M, Ito S. **1991**; Heterogeneous response in calcium signaling by adrenergic and cholinergic stimulation in cultured bovine trabecular cells. *Exp Eye Res* 52 (4): p.393
229. Tao W, Prasanna G, Dimitrijevic S, Yorio T. **1998**; Endothelin receptor A is expressed and mediates the  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization of cells in human ciliary smooth muscle, ciliary nonpigmented epithelium, and trabecular meshwork. *Curr Eye Res* 17 (1): p.31
230. Ten Tusscher MPM, Beckers HJM, Vrensen GFJM, Klooster J. **1994**; Pheripheral neural circuits regulating IOP? A review of its anatomical backbone. *Doc Ophthalmol* 87 : p.291
231. Thieme H, Uwe Nass J, Nuskovski M, Bechrakis NE, Stumpff F, Strauss O, Wiederholt M. **1999**; The effects of protein kinase C on trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 (13): p.3254
232. Thomas AP, Bird GS, Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Putney JW, Jr. **1996**; Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J* 10 (13): p.1505
233. Thomas RP. **1964**; Effect of third cranial nerve on intraocular pressure. *Arch Ophthalmol* 72 : p.529
234. Topper JF y Brubaker RF. **1985**; Effects of timolol, epinephrine, and acetazolamide on aqueous flow during sleep. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26 : p.1315
235. Tordjmann T, Berthon B, Claret M, Combettes L. **1997**; Coordinated intercellular calcium waves induced by noradrenaline in rat hepatocytes: dual control by gap junction permeability and agonist. *EMBO J* 16 (17): p.5398
236. Toris CB, Camras CB, Yablonski ME. **1993**; Effects of PhXA41, a new prostaglandin F2 alpha analog, on aqueous humor dynamics in human eyes. *Ophthalmol* 100 (9): p.1297
237. Toris CB, Camras CB, Yablonski ME. **1999**; Acute versus chronic effects of brimonidine

- on aqueous humor dynamics in ocular hypertensive patients. *Am J Ophthalmol* 128 (1): p.8
238. Toris CB, Gleason ML, Camras CB, Yablonski ME. **1995a**; Effects of brimonidine on aqueous humor dynamics in human eyes. *Arch Ophthalmol* 113 (12): p.1514
239. Toris CB, Tafuya ME, Camras CB, Yablonski ME. **1995b**; Effects of apraclonidine on aqueous humor dynamics in human eyes. *Ophthalmol* 102 (3): p.456
240. Toris CB, Yablonski ME, Wang YL, Hayashi M. **1995c**; Prostaglandin A2 increases uveoscleral outflow and trabecular outflow facility in the cat. *Exp Eye Res* 61 (6): p.649
241. Törnqvist G. **1970**; Effect of oculomotor nerve stimulation on outflow facility and pupil diameter in a monkey (*Cercopithecus ethiops*). *Invest Ophthalmol* 9 : p.220
242. Townsend DI y Brubaker RF. **1980**; Immediate effects of epinephrine on aqueous formation in the normal human eye as measured by fluorophotometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19 : p.256
243. Treister G y Bárány EH. **1970**; Mydriasis and intraocular pressure decrease in the conscious rabbit after unilateral superior cervical ganglionectomy. *Invest Ophthalmol* 9 : p.331
244. Tripathi RC y Tripathi BJ. **1984a**; Anatomy, orbit and adnexa of the human eye. *En: The eye*. 3rd ed. Davson H, editor. Academic press, Orlando, Florida: 1, p. 1
245. Tripathi BJ, Tripathi RC, Millard CB. **1989**; Epinephrine-induced toxicity of human trabecular cells in vitro. *Lens & Eye Toxicity Research* 6 (1-2): p.141
246. Tripathi BJ y Tripathi RC. **1984b**; Effect of epinephrine in vitro on the morphology, phagocytosis, and mitotic activity of human trabecular endothelium. *Exp Eye Res* 39 (6): p.731
247. Tripathi RC, Yang C, Tripathi BJ, and Borisuth NSC. **1992**; Role of receptors in the trabecular meshwork of the eye as targeted to the development of antiglaucoma therapy.

---

*Drug Develop Res* 27 p.191

248. Uusitalo H. **1972**; Effect sympathetic and parasympathetic stimulation on the secretion and outflow of aqueous humor in the rabbit eye. *Acta Physiol Scand* 86 : p.315
249. Van Alphen GWHM, Kern R, Robinette SL. **1965**; Adrenergic receptors of the intraocular muscles: Comparison to cat, rabbit and ,monkey. *Arch Ophthalmol* 74 : p.253
250. Vanhoutte PM y Mombouli JV. **1996**; Vascular endothelium: vasoactive mediators. *Prog Cardiovasc Dis* 39 (3): p.229
251. Villumsen J y Alm A. **1989**; Prostaglandin F2 alpha-isopropylester eye drops: effects in normal human eyes. *Br J Ophthalmol* 73 (6): p.419
252. Von Sallmann L, Michelangelo M, Fuortes GF, Grimes P. **1958**; Study of afferent electric impulses induced by intracocular pressure changes. *Am J Ophthalmol* 45 : p.211
253. Waitzman MB, Woods WD, Cheek WV. **1979**; Effects of prostaglandins and norepinephrine on ocular pressure and pupil size in rabbits following bilateral cervical ganglionectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 18 (1): p.52
254. Waltman SR y Hart WM. **1987**; The cornea. *En: Adler's Physiology of the eye*. 8th ed. Moses RA, Hart WM, editores. Mosby, St. Luis. Missouri: 3, p. 36
255. Wang RF, Lee PY, Mittag TW, Podos SM, Serle JB. **1997**; Effect of 5-methylurapidil, an alpha 1a-adrenergic antagonist and 5-hydroxytryptamine1a agonist, on aqueous humor dynamics in monkeys and rabbits. *Curr Eye Res* 16 (8): p.769
256. Wang RF, Lee PY, Mittag TW, Podos SM, Serle JB, Becker B. **1998**; Effect of 8-iso prostaglandin E2 on aqueous humor dynamics in monkeys. *Arch Ophthalmol* 116 (9): p.1213
257. Wang YL, Toris CB, Zhan G, Yablonski ME. **1999**; Effects of topical epinephrine on aqueous humor dynamics in the cat. *Exp Eye Res* 68 (4): p.439

258. Wax MB y Molinoff PB. **1987**; Distribution and properties of beta-adrenergic receptors in human iris-ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28 (3): p.420
259. Wax MB, Molinoff PB, Alvarado J, Polansky J. **1989**; Characterization of beta-adrenergic receptors in cultured human trabecular cells and human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 : p.51
260. Weinreb RN, Bloom E, Baxter JD, Alvarado J, Lan N, O'Donnell J, Polansky JR. **1981**; Detection of glucocorticoid receptors in cultured human trabecular cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 21 (3): p.403
261. Weinreb RN, Mitchell MD, Polansky JR. **1983**; Prostaglandin production by human trabecular cells: in vitro inhibition by dexamethasone. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24 (12): p.1541
262. Weinstein JM. **1994**; The pupil. *En: Neuro-ophthalmology*. Slamovits TL, Burde R, editores. Mosby-Wolfe, London: 5
263. Wiederholt M, Bielka S, Schweig F, Lütjen-Drecoll E, Lepple-Wienhues A. **1995**; Regulation of outflow rate and resistance in the perfused anterior segment of the bovine eye. *Exp Eye Res* 61 : p.223
264. Wiederholt M, Dorschner N, Groth J. **1997**; Effect of diuretics, channel modulators and signal interceptors on contractility of the trabecular meshwork. *Ophthalmologica* 211 (3): p.153
265. Wiederholt M, Groth J, Strauss O. **1998**; Role of protein tyrosine kinase on regulation of trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 (6): p.1012
266. Wiederholt M, Schafer R, Wagner U, Lepple-Wienhues A. **1996**; Contractile response of the isolated trabecular meshwork and ciliary muscle to cholinergic and adrenergic agents. *Ger J Ophthalmol* 5 (3): p.146
267. Wiederholt M y Stumpff F. **1998**; The trabecular meshwork and aqueous humor

- reabsorption. *En: The eye's aqueous humor. From secretion to glaucoma.* Civan MM, editor. Academic press, San Diego: 7, p. 163
268. Wiederholt M, Sturm A, Lepple-Wienhues A. **1994**; Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35 (5): p.2515
269. Wikberg-Matsson A, Wikberg JE, Uhlen S. **1996**; Characterization of alpha 2-adrenoceptor subtypes in the porcine eye: identification of alpha 2A-adrenoceptors in the choroid, ciliary body and iris, and alpha 2A- and alpha 2C-adrenoceptors in the retina. *Exp Eye Res* 63 (1): p.57
270. Wilensky JT. **1994**; Specific types of glaucoma. Epidemiology of open-angle glaucoma. *En: Glaucoma.* Kaufman PL, Mittag TW, editores. Mosby-Wolfe, London: 8-III,
271. WoldeMussie E y Ruiz G. **1992**; Effect of histamine on signal transduction in cultured human trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res* 11 (10): p.987
272. Wordinger RJ y Clark AF. **1999**; Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: towards a better understanding of glaucoma. *Prog Ret Eye Res* 18 (5): p.629
273. Yohai D y Danon A. **1987**; Effect of adrenergic agonists on eicosanoid output from isolated rabbit choroid plexus and iris-ciliary body. *Prostaglandins Leukotrienes & Medicine* 28 (3): p.227
274. Yoshino H y Suzuki R. **1992**; Effect of phosphodiesterase inhibitors on bovine ciliary muscle and outflow facility. *J Ocular Pharmacol* 8 (2): p.99
275. Yousufzai SY y Abdel-Latif AA. **1983**; Effects of norepinephrine and other pharmacological agents on prostaglandin E2 release by rabbit and bovine irides. *Exp Eye Res* 37 (3): p.279
276. Yousufzai SY, Gracy RA, Aboul-Khair HS, Abdel-Latif AA. **1988**; In vivo electrical stimulation of the sympathetic nerve of the eye increases inositol phosphate production and prostaglandin release in the rabbit iris muscle. *J Neurochem* 50 (3): p.752

277. Zadunaisky JA y Spring KR. **1995**; TBM cells area changes induced by drugs. Is it contraction or cell volume regulation? *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: (S) p.194
278. Zarbin MA, Anholt RR. **1991**; Benzodiazepine receptors in the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 (9): p.2579
279. Zhan GL, Toris CB, Camras CB, Wang YL, Yablonski ME. **1998**; Bunazosin reduces intraocular pressure in rabbits by increasing uveoscleral outflow. *J Ocular Pharmacol Ther* 14 (3): p.217
280. Zhao C, Fujimoto N, Shichi H. **1995**; Immunocytochemical localization of prostaglandin E2 receptor subtypes in porcine ocular tissues. I. Uveal tissues. *J Ocular Pharmacol Ther* 11 (3): p.421
281. Zimmerman TJ. **1981**; Pilocarpine. *Ophthalmol* 88 : p.85
282. Zuazo A, Ibañez J, Belmonte C. **1986**; Sensory nerve responses elicited by experimental ocular hypertension. *Exp Eye Res* 43 : p.759





(043)00  
GAS

