



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

TESIS DOCTORAL

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

**DAVID SOTO DEL CERRO
2005**

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Anatomía funcional del ojo

El ojo es una estructura sensorial cuya función es llevar a cabo el proceso de la visión. Tiene una forma aproximadamente esférica y está insertado dentro de la cavidad ósea orbitaria que se sitúa en la parte anterior del cráneo. El ojo se encuentra conectado con el sistema nervioso central a través del nervio óptico, el cual se ubica en la parte posterior del globo ocular. La pared del ojo está formada por tres capas o túnicas: la túnica fibrosa, la túnica vascular y la túnica nerviosa (Tripathi, 1984).

1.1.1. Las túnicas oculares

Túnica fibrosa

La túnica fibrosa supone la más externa de las tres túnicas oculares. Está formada por la esclera, la córnea y el limbo esclerocorneal (Figura 1.1).

La esclera es una estructura de color blanco, opaca y está formada por tejido conectivo. Ocupa aproximadamente las 5/6 partes posteriores de la superficie del ojo y es la más sólida y resistente de las membranas oculares. Su función es la de proteger los elementos sensoriales del globo ocular y la de conferir al globo ocular las dimensiones apropiadas para la correcta función visual. El espesor de la esclera es variable dependiendo de la región del globo ocular: su grosor es superior a 1 mm en la parte posterior del ojo mientras que en la parte anterior es de 0.3 mm (Tripathi, 1984).

La zona de transición entre la esclera y la córnea se denomina limbo esclerocorneal. Tiene entre 1 y 2 mm de grosor y delimita, a modo de anillo, los componentes de la túnica fibrosa. El limbo esclerocorneal contiene, por su parte interna, las estructuras anatómicas involucradas en la mayor parte del drenaje del humor acuoso, de modo que alteraciones en esta estructura pueden producir la aparición de glaucoma (Tripathi, 1984).

En la parte más anterior del globo ocular y como continuación de la esclera, se encuentra la córnea. Esta estructura es convexa, transparente, de carácter fibroso y carece de vasos sanguíneos. Ocupa aproximadamente 1/6 parte del área externa del ojo y su función principal es visual; supone la primera superficie refractiva del ojo y es una de las estructuras responsables de la refracción de la luz que incide sobre la retina.

Túnica vascular

La túnica vascular se sitúa entre la túnica fibrosa más externa y la sensorial más interna. Está formada por dos estructuras: la coroides y la úvea, en la parte más anterior, formada por el iris y el cuerpo ciliar (Figura 1.1).

La coroides es una estructura muy vascularizada situada en la parte posterior del globo ocular y que se extiende, por la parte posterior del ojo, desde la inserción del nervio óptico hasta la *ora serrata* situada más anteriormente. Su función es la de aportar nutrientes a la úvea y la retina (Tripathi, 1984).

El cuerpo ciliar supone la continuación de la coroides y se extiende anteriormente a partir de la *ora serrata* hasta la raíz del iris. El cuerpo ciliar está dividido en dos partes, la *pars plana*, más posterior, y la *pars plicata*, más anterior. En esta estructura se encuentran los procesos ciliares, responsables de la producción de humor acuoso, y el músculo ciliar, formado por un anillo de musculatura lisa y cuya función es la de graduar el grado de acomodación de la lente.

El iris es la estructura más anterior de la úvea y divide la parte anterior del ojo en dos cámaras, la cámara anterior y la cámara posterior. El iris actúa como diafragma, regulando de esta manera la cantidad de luz que pasa a través de su apertura central denominada pupila.

Túnica sensorial

La túnica sensorial es la que está situada más internamente y está formada por dos estructuras: la retina y el epitelio pigmentado de la retina (EPR).

El EPR es la capa más externa de la túnica sensorial y se encuentra unido a la coroides. Se organiza como una sola capa de células que reposa sobre una membrana basal y se caracteriza por la presencia de gránulos de melanina en el citoplasma de las células, que absorben toda la luz que llega hasta este nivel. El EPR se extiende desde la inserción del nervio óptico, posteriormente, hasta la *ora serrata* situada más anteriormente, donde da lugar al epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar.

La retina es una capa de tejido nervioso formada por fotorreceptores (conos y bastones), interneuronas y células ganglionares cuyos axones forman el nervio óptico. Esta estructura se encuentra unida, de forma débil, al epitelio pigmentado.

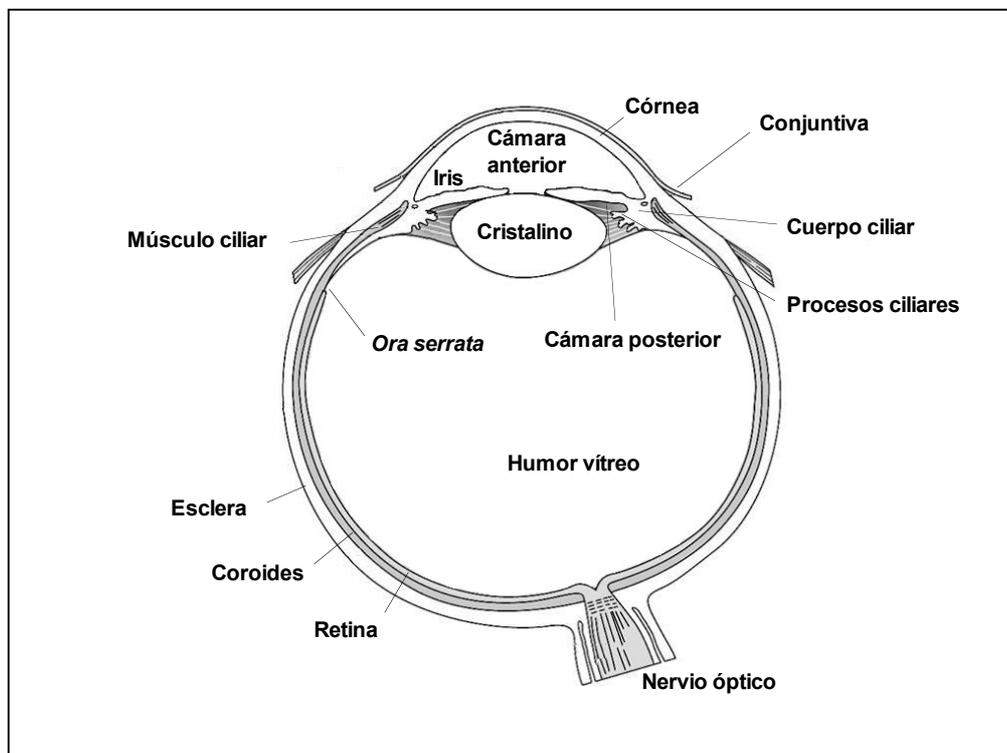


Figura 1.1. Esquema general de las diferentes partes del ojo. Corte sagital.

Cristalino y humor vítreo

Las tres túnicas que conforman la estructura del globo ocular están dispuestas de manera que dentro del globo ocular delimitan diferentes cavidades, en las cuales se

encuentran el cristalino, el humor vítreo y el humor acuoso (Figura 1.1). El humor vítreo es una sustancia semilíquida transparente que ocupa el interior de la cavidad ocular por detrás del cristalino, adaptándose a los tejidos que lo rodean gracias a su naturaleza gelatinosa y representando en volumen el 60% del globo ocular. Otra estructura importante en la función ocular es el cristalino, una lente biconvexa avascular y transparente situada entre el iris y el humor vítreo. Su característica principal es la elasticidad, pudiendo modificar su curvatura durante el proceso de acomodación. Se mantiene en su posición gracias a la zónula, un sistema de fibrillas que van del cuerpo ciliar al cristalino. La contracción del músculo ciliar es transmitida al cristalino a través de estas fibras.

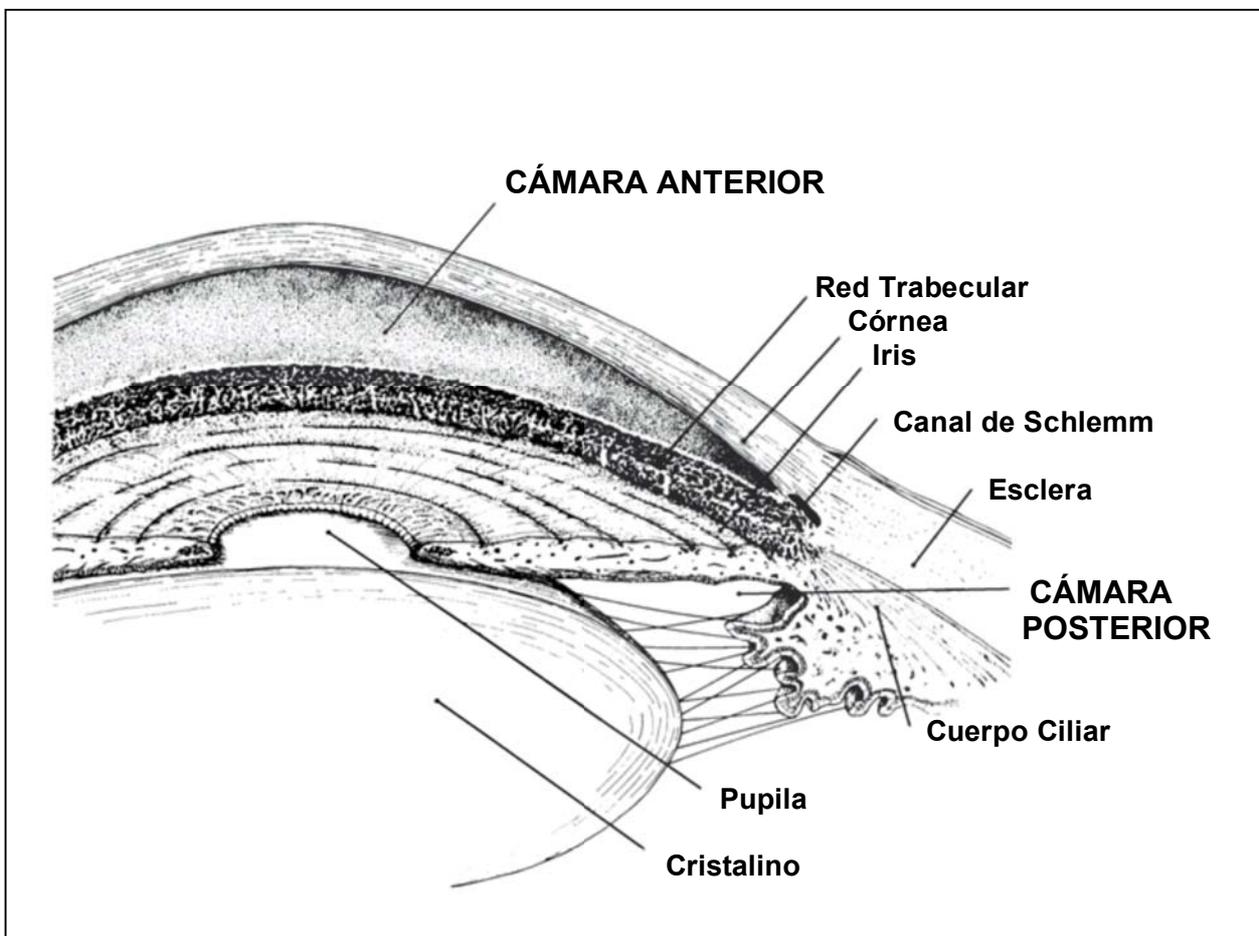


Figura 1.2. Esquema del segmento anterior del ojo en el que se muestran las cámaras anterior y posterior del ojo y los tejidos adyacentes. Modificado de Tripathi, 1984.

1.1.2. El segmento anterior del ojo: las cámaras oculares

El segmento anterior del ojo está delimitado anteriormente por la córnea y parte de la esclera y posteriormente por el humor vítreo. El segmento anterior engloba el iris, el cristalino, el cuerpo ciliar, la red trabecular y el canal de Schlemm. Dentro del segmento anterior del ojo se distinguen dos cámaras: la cámara anterior y la posterior (Figura 1.2). Ambas cámaras se encuentran bañadas por el humor acuoso (Tripathi, 1984).

1.1.2.1. Cámara posterior

La cámara posterior está delimitada anteriormente por 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. Por la parte media delimita con el cristalino, por la parte lateral con los procesos ciliares y por la parte posterior con el humor vítreo (Tripathi, 1984).

1.1.2.1.1. Cuerpo ciliar y procesos ciliares

El cuerpo ciliar limita anteriormente con la esclera y el iris, lateralmente con la esclera y posteriormente con la *ora serrata*. Se encuentra firmemente anclado a la esclera a nivel del espolón escleral y la mayor parte de esta estructura está constituida por músculo liso dispuesto en tres fascículos: longitudinal, radial y circular. Desde el punto de vista anatómico, puede dividirse en dos segmentos: el anterior o *pars plicata* y el posterior o *pars plana*.

El cuerpo ciliar es una estructura muy vascularizada debido a que una de sus funciones principales es la formación del humor acuoso, que se da a nivel de los procesos ciliares presentes en el cuerpo ciliar. Los procesos ciliares se proyectan a partir del cuerpo ciliar hacia la cámara posterior desde la *pars plicata* como pliegues radiales, y se encuentran muy involucrados. Constan de un estroma central de tejido conjuntivo muy vascularizado con una doble capa epitelial especializada alrededor, el denominado epitelio ciliar (Caprioli, 1994).

Epitelio ciliar pigmentado y no pigmentado

Los procesos ciliares se encuentran separados de la cámara posterior por una doble capa de células epiteliales: el epitelio ciliar no pigmentado (ENP), situado más internamente y en contacto directo con el humor acuoso, y el epitelio ciliar pigmentado (EP), situado más externamente, entre el ENP y el estroma ciliar. Las células del EP son cuboides, contienen numerosos melanosomas y cuentan con pocos orgánulos intracelulares en comparación con el ENP. Las células del ENP tienen una morfología cilíndrica y poseen características que demuestran que se trata de células con un metabolismo muy activo e involucradas en procesos de transporte dependientes de energía (Caprioli, 1994). En la zona de contacto entre las células del EP y las del ENP existen muchas uniones del tipo *gap junction*, las cuales permiten el intercambio de iones entre las dos capas de células y un acoplamiento eléctrico que asegura una buena coordinación en la actividad secretora.

El epitelio ciliar produce el humor acuoso a partir del plasma mediante un proceso de secreción activa de solutos a la cámara posterior. Las estrechas uniones entre células del ENP eliminan la presencia de macromoléculas en el humor acuoso y forman la barrera hemato-acuosa.

1.1.2.2. Cámara anterior y región del ángulo iridocorneal

La cámara anterior tiene forma elipsoidal, aunque la forma y profundidad dependen de la curvatura de la córnea y la forma del iris, parámetros que varían entre los individuos (Tripathi, 1984). Está delimitada en su parte más anterior por la córnea y en su parte más posterior por el iris y la superficie del cristalino. Lateralmente está delimitada por la inserción del iris a nivel de la esclera formando el ángulo iridocorneal. Se encuentra bañada por el humor acuoso, líquido que juntamente con la túnica fibrosa se encarga de mantener la morfología ocular correcta para el buen desarrollo de la función visual.

El ángulo iridocorneal es la zona de intersección del iris a nivel de la zona córneoescleral. Esta región juega un papel crucial en la evacuación del humor acuoso, ya que en este punto se encuentran las estructuras involucradas en el drenaje del humor acuoso.

1.1.2.2.1. La red trabecular

La red trabecular es un tejido de carácter esponjoso localizado en el ángulo iridocorneal y cuya función es la de drenar el humor acuoso desde la cámara anterior hasta la circulación venosa. Está delimitado anteriormente por la línea de Schwalbe, posteriormente por el espolón escleral y lateralmente por el canal de Schlemm. La red trabecular está formada por una serie de láminas paralelas de tejido conectivo, delgadas y planas, colocadas radialmente y que se encuentran recubiertas de células endoteliales. Consta de tres partes diferenciadas: el trabéculo uveal, que es la parte más interna, el trabéculo córneoescleral y el trabéculo yuxtacanalicular o cribiforme, que se encuentra en contacto con la cara interna del canal de Schlemm.

El *trabéculo uveal* limita posteriormente con el cuerpo ciliar y la raíz del iris. Está formado por laminillas de tejido conectivo recubiertas de células de carácter endotelial y estructuradas formando una red tridimensional. Los espacios intertrabeculares son relativamente grandes en esta parte del trabéculo, permitiendo una baja resistencia al paso de humor acuoso (Lütjen-Drecoll, 1994).

El *trabéculo córneoescleral* también se encuentra formado por láminas recubiertas de células endoteliales, pero a diferencia del trabéculo uveal, en el que las láminas tienden a estar orientadas radialmente, en el trabéculo córneoescleral se disponen siguiendo un patrón de distribución circunferencial. El núcleo de estas láminas es rico en glicoproteínas, ácido hialurónico, colágeno y fibras elásticas (Lütjen-Drecoll, 1994).

El *trabéculo cribiforme o yuxtacanalicular* es la parte más externa del tejido trabecular, situado entre el trabéculo córneoescleral y el canal de Schlemm. Contiene células alargadas ordenadas en capas dispersas dentro de una matriz extracelular, la cual está formada por fibras elásticas y de colágeno. A diferencia de otras partes del trabéculo, la red trabecular cribiforme no se organiza en láminas de tejido. La estructura morfológica del trabéculo cribiforme hace que la resistencia al paso de fluido sea máxima en esta capa: estudios realizados en primates muestran que el 90% de la resistencia al paso del humor acuoso se localiza en la región de la pared interna (Mäepea, 1989). El acuoso atraviesa en esta zona pequeños conductos de 1.5 μm .

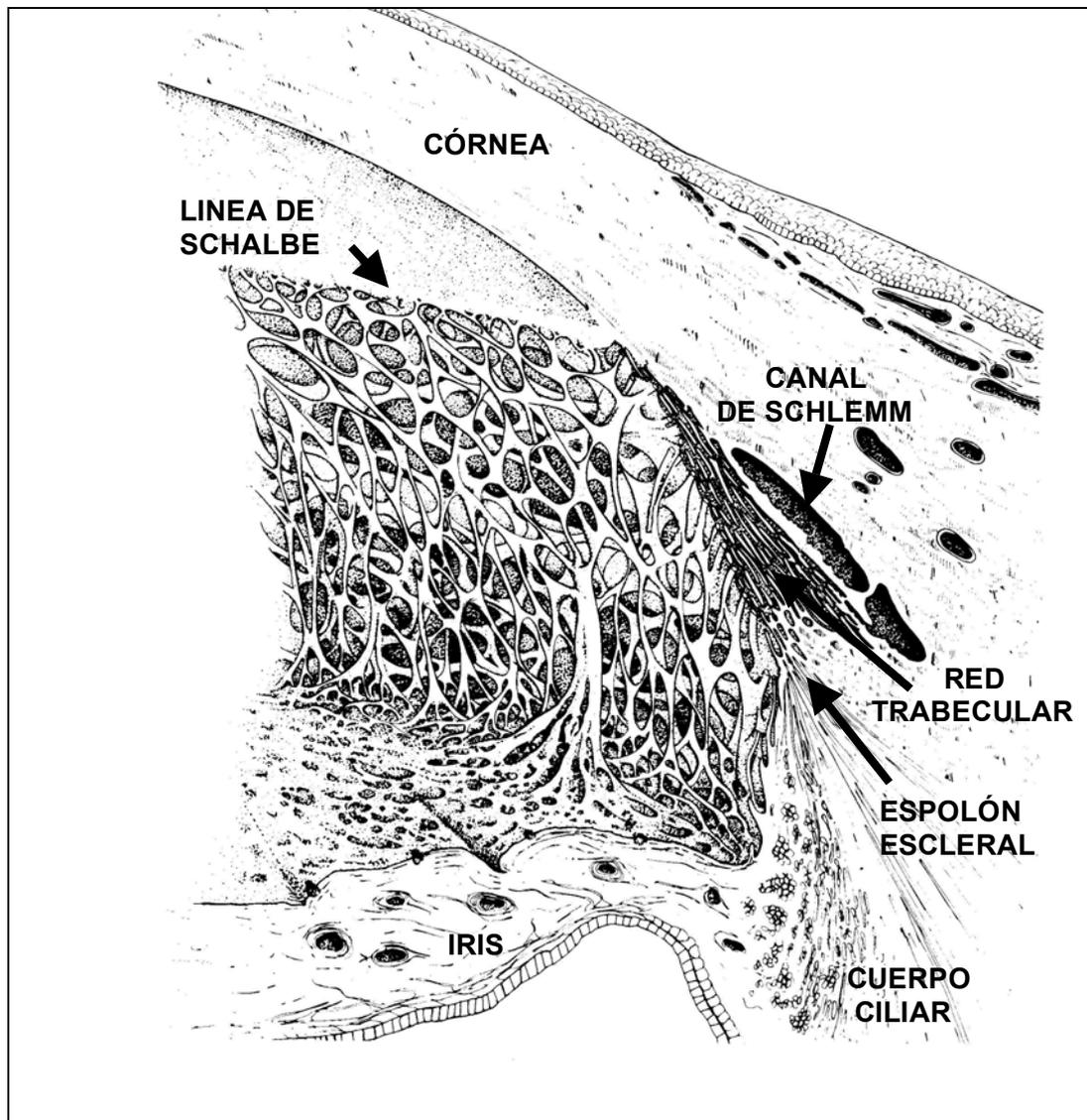


Figura 1.3. La red trabecular y el canal de Schlemm. Modificado de Tripathi, 1984.

1.1.2.2. El canal de Schlemm

Situado de manera más interna que la red trabecular e insertado dentro de la esclera se encuentra el canal de Schlemm, el cual recorre de manera circular todo el ángulo iridocorneal. A esta estructura llega el humor acuoso procedente de la red trabecular tras cruzar el endotelio de la pared interna del canal. A partir del canal de Schlemm, finalmente se evacua el humor acuoso hacia los canales colectores en primer lugar y hacia las venas episclerales en última instancia (Hart, 1994).

El canal de Schlemm como tal solamente está presente en los primates superiores. En los ojos bovinos y de mamíferos inferiores son unas estructuras denominadas plexos acuosos las que llevan a cabo la misma función que el canal de Schlemm.

1.2. El humor acuoso

El humor acuoso es un fluido incoloro de baja viscosidad que proviene de un filtrado del plasma y que baña las cámaras anterior y posterior del ojo. Se forma en el epitelio ciliar, a nivel de los procesos ciliares, mediante un mecanismo de transporte activo, que conlleva un gasto energético, siendo secretado a la cámara posterior (Caprioli, 1994).

El volumen de humor acuoso determina la presión intraocular (IOP) adecuada para la correcta función visual. Por otro lado, el humor acuoso suministra los nutrientes necesarios a las estructuras avasculares que están en contacto con él: la córnea, el vítreo y el cristalino. Este flujo repone los nutrientes y retira los productos de deshecho de los tejidos avasculares (Caprioli, 1994) con un tiempo de recambio de 100 minutos.

1.2.1. Composición del humor acuoso

La composición del humor acuoso depende de varios factores: del proceso de secreción de humor acuoso, del posterior intercambio activo y pasivo de solutos con los tejidos que baña y de su velocidad de drenaje.

A pesar que en ciertos mamíferos el humor acuoso es ligeramente hiperosmótico con respecto al plasma (Kinsey, 1950), en primates no se observan diferencias en cuanto a la osmolaridad entre el humor acuoso y el plasma, siendo los valores de 303 mOsm/Kg (Gaasterland, 1979). De la misma forma no parecen existir diferencias significativas en cuanto a la osmolaridad entre muestras de humor acuoso procedentes de la cámara anterior y posterior. Su composición de solutos inorgánicos es muy similar a la del plasma: las concentraciones de Na^+ y K^+ son similares entre el humor acuoso y el plasma, aunque existen ligeras diferencias según la especie de estudio. La concentración de los distintos aniones en el humor acuoso también varía interespecíficamente; en el hombre existe un aparente exceso de Cl^- y un déficit de HCO_3^- con respecto a las concentraciones plasmáticas, mientras que en conejos ocurre lo contrario (Caprioli, 1994).

La concentración de glucosa en el humor acuoso es aproximadamente un 80% de la plasmática y pasa al humor acuoso por un proceso de transporte activo mediante transportadores de glucosa GLUT1 (Takata, 1991). Las concentraciones de lactato son similares a las del plasma en la cámara posterior, mientras que en la cámara anterior son

muy superiores a las plasmáticas. El metabolismo de la glucosa en ciertos tejidos, como la córnea, el cristalino y la retina contribuye a la producción de lactato y a la gran concentración de este compuesto en el humor acuoso (Riley 1972).

El contenido de ácido ascórbico es aproximadamente unas 20 veces más alto que en el plasma. Se ha demostrado que gracias a esta alta concentración, el ácido ascórbico actúa como antioxidante protegiendo al ojo de los radicales libres formados por agentes como la radiación ultravioleta (Erb, 2004).

La presión parcial de oxígeno en el humor acuoso oscila entre 13 y 80 mm de Hg, dependiendo del método de medida utilizado, si bien los valores normales oscilan entre 30 y 40 mm de Hg (Caprioli, 1994) siendo, por tanto, estos valores hipóxicos respecto a los plasmáticos.

Las concentraciones de aminoácidos respecto al plasma son variables según la especie de estudio. Normalmente la concentración de la mayor parte de los aminoácidos es superior a la del plasma. No obstante, en ciertas especies, como en los perros, presentan concentraciones inferiores a las plasmáticas (Caprioli, 1994). Respecto a la cantidad de proteínas, normalmente la barrera hemato-acuosa limita el contenido proteico del humor acuoso a menos del 1% de sus valores plasmáticos, sin embargo, el contenido de proteínas de bajo peso molecular como la albúmina o las Ω globulinas es mayor en el humor acuoso que en el plasma (Dernouchamps, 1982). Las proteínas de elevado peso molecular sólo aparecen en trazas. En condiciones normales, también se detectan en el humor acuoso inmunoglobulinas (IgG), plasminógeno y proactivador del plasminógeno en cantidades significativas y pueden manifestarse pequeñas cantidades de las fracciones C2, C6 y C7 del complemento. La cantidad de proteínas está aumentada si se rompe la barrera hemato-acuosa (Caprioli, 1994).

En el humor acuoso se han detectado diversos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento tumoral (TGF- Ω). El TGF- Ω presente parece estar secretado por células de la red trabecular, del iris y del cuerpo ciliar (Tripathi, 1993). Otros factores de crecimiento que se han encontrado en el humor acuoso son el KGF (keratinocyte growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), FGF (fibroblast growth factor) y el PDGF (platelet-derived growth factor). Se cree que estos factores regulan funciones como la mitosis, la diferenciación, la motilidad o la apoptosis.

Su presencia en el humor acuoso es esencial para el mantenimiento y renovación del tejido en el segmento anterior (Klenkler, 2004).

Finalmente, en el humor acuoso también se ha encontrado ácido hialurónico, ácido siálico, iones de cromo trivalente, vitamina B₁₂ y corticosteroides endógenos (Caprioli, 1994).

1.2.2. Producción del humor acuoso

El humor acuoso se forma a nivel del cuerpo ciliar, tejido que se encuentra altamente vascularizado. Los capilares del estroma ciliar son fenestrados, lo cual permite un rápido intercambio de solutos entre la sangre y el estroma ciliar. El EP supone la primera barrera celular para el transporte de solutos y agua a partir del estroma. El paso de sustancias entre el EP y el ENP se produce a través de uniones estrechas intracelulares. Tanto el EP como el ENP son responsables de la composición del humor acuoso, pero es el ENP el que finalmente, mediante un proceso de secreción activa de solutos, genera el humor acuoso que es secretado a la cámara posterior. Las uniones estrechas entre las células del epitelio ciliar eliminan la presencia de macromoléculas en el humor acuoso y forman la barrera hemato-acuosa, evitando la difusión simple de sustancias desde el estroma a la cámara posterior. Esta barrera hemato-acuosa mantiene la transparencia del humor acuoso necesaria para la correcta función óptica del ojo (Nilsson, 1994).

1.2.2.1. Mecanismos implicados en la formación de humor acuoso

En la formación del humor acuoso intervienen tres mecanismos: difusión, ultrafiltración y transporte activo, siendo este último el principal. El bombeo activo de solutos a través del epitelio ciliar establece un gradiente de solutos que impulsa el flujo osmótico de agua hacia la cámara posterior, constituyendo el mecanismo de formación de humor acuoso más importante (Caprioli, 1994; Figura 4.1).

Difusión

La difusión de solutos a través de la membrana de las células del epitelio ciliar se produce a favor de la diferencia de concentración. Este mecanismo es utilizado por sustancias liposolubles que atraviesan las membranas con facilidad.

Ultrafiltración

A pesar de que ciertos autores sostienen que hasta un 70% del humor acuoso procede de la ultrafiltración de líquido hacia la cámara posterior (Green, 1973), existen datos experimentales que indican que el proceso de ultrafiltración no contribuye de manera significativa a la formación del humor acuoso. En primer lugar, la producción de humor acuoso está disminuida en un 70% al inhibir la ATPasa Na^+/K^+ con ouabaína (Cole, 1977), lo que no debería ocurrir si la mayor parte del humor acuoso se originara por ultrafiltración. Por otro lado, otros estudios (Bill, 1973) indican que las presiones hidrostáticas y oncóticas a través del epitelio ciliar favorecerían la reabsorción del humor acuoso en lugar de la filtración. Además, las concentraciones de diversas moléculas de bajo peso molecular difieren bastante entre el plasma y el humor acuoso, lo cual no tendría sentido si la formación de humor acuoso fuese el resultado simplemente de una ultrafiltración (Nilsson, 1994). Así pues, todos estos datos no parecen apoyar la idea de que la ultrafiltración sea un mecanismo demasiado importante en la formación del humor acuoso.

Transporte activo

Actualmente se acepta que el transporte activo de ciertas sustancias por parte del epitelio ciliar supone el mecanismo más importante en la formación del humor acuoso, dependiendo su velocidad de producción de la rapidez con que se dé el transporte activo de solutos por parte del epitelio ciliar.

El bloqueo con ouabaína de la ATPasa Na^+/K^+ presente en la membrana de las células del ENP disminuye la producción de humor acuoso. Probablemente el transporte activo de Na^+ por esta bomba cause un exceso de cargas positivas lo que conllevaría una difusión de cargas negativas para mantener la electroneutralidad. El Cl^- y el HCO_3^- son los aniones más importantes (Lütjen-Drecoll, 1994), aunque se desconoce la cantidad relativa

de su transporte a la cámara posterior. Es posible que exista también un transporte activo de Cl^- , pero su magnitud sería muy pequeña en comparación con la del Na^+ . El incremento en la concentración local de Na^+ y de aniones en los espacios intercelulares de las invaginaciones de las células del ENP, provoca un ambiente hiperosmótico que favorece la difusión de agua hacia el exterior de las células (Caprioli, 1994).

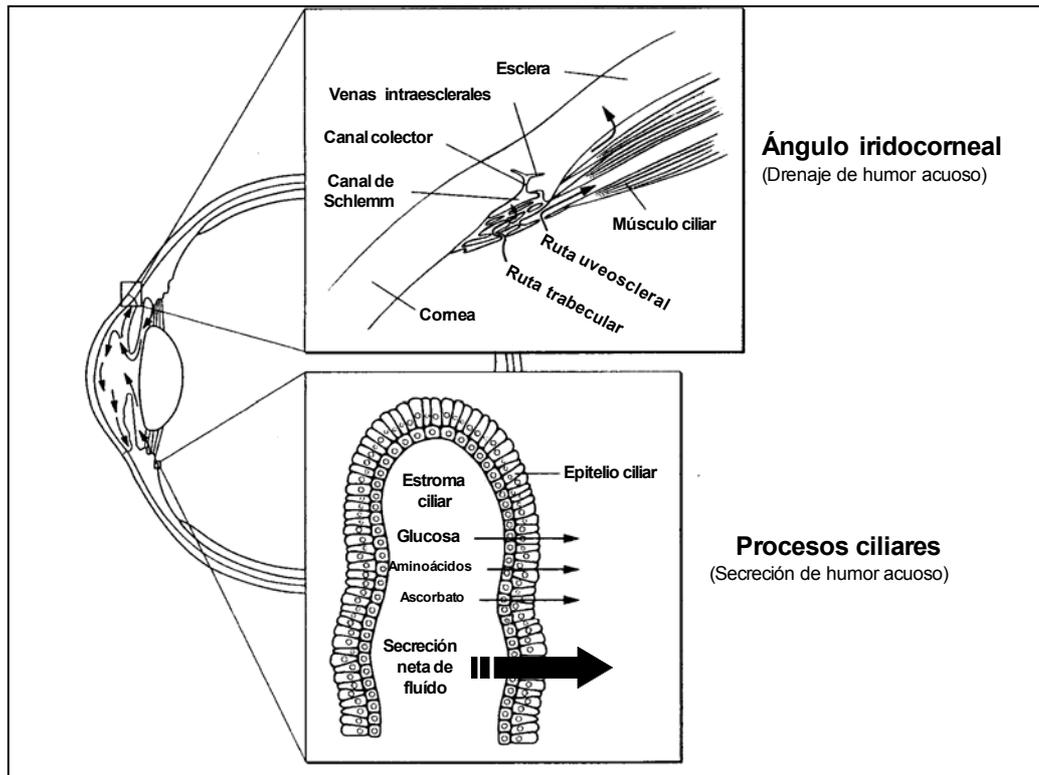


Figura 1.4. Formación y evacuación del humor acuoso. Modificado de Nilsson, 1984.

Un interesante modelo para el sistema de transporte involucrado en la secreción del humor acuoso ha sido presentado por Wiederholt (1991), en cuyos trabajos se encuentran evidencias de la acción conjunta de la bomba $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ combinada con conductancias para los iones K^+ y Cl^- . El Na^+ es bombeado al exterior de las células no pigmentadas mientras que el K^+ es reintroducido en las células. Los canales de K^+ permiten la recirculación de este ión mientras que el Cl^- difunde de manera pasiva por los canales de cloruro.

En cuanto al transporte activo de otras sustancias, se han identificado al menos cuatro mecanismos de transporte de aminoácidos: para básicos, neutros, ácidos y otro para Ω -aminoácidos.

1.2.2.2. Regulación de la formación del humor acuoso

Normalmente no existen grandes variaciones en la tasa de generación de humor acuoso, aunque sí que se observa un aumento en la formación durante el día en comparación con los niveles de formación nocturnos, según un ciclo circadiano. En humanos, durante el día la tasa de formación es de 2.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ mientras que durante la noche desciende hasta 1.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Nilsson, 1994). Los mecanismos que producen estas variaciones son desconocidos, aunque podría estar involucrado el sistema nervioso simpático ya que los procesos ciliares se encuentran inervados por fibras simpáticas además de parasimpáticas. Además se ha demostrado que el sistema nervioso autónomo ejerce un papel importante en la regulación de la producción de humor acuoso.

Los efectos de la estimulación nerviosa simpática sobre la formación de humor acuoso son, sin embargo, limitados. Esto parece ser consecuencia de diferentes efectos provocados por la actuación sobre distintos tipos de receptores adrenérgicos. Los agonistas Ω -adrenérgicos son capaces de aumentar la formación de humor acuoso tanto en primates anestesiados como en humanos dormidos, mientras que agonistas Ω_2 -adrenérgicos reducen la formación de humor acuoso (Caprioli, 1994; Nilsson, 1994). Así pues, los agonistas adrenérgicos no selectivos, como la epinefrina, tendrían efectos duales sobre la formación de humor acuoso: estimulación vía receptores Ω -adrenérgicos e inhibición vía receptores Ω_2 -adrenérgicos. Por otro lado, los agonistas Ω -adrenérgicos no tienen efecto en la formación de humor acuoso en humanos despiertos, sin embargo, antagonistas Ω -adrenérgicos reducen la formación de humor acuoso durante el día pero no durante la noche. Todo esto sugiere que la formación del humor acuoso durante la noche se encuentra estacionada en niveles basales, mientras que durante el día estaría incrementada mediante la estimulación Ω -adrenérgica (Nilsson, 1994).

Respecto a la inervación parasimpática, hay indicios que el nervio facial estaría involucrado en la regulación de la formación de humor acuoso. Su estimulación produce liberación de péptido intestinal vasoactivo (VIP) que incrementa la formación de humor acuoso en primates. Otros datos obtenidos con agonistas muscarínicos son muy

conflictivos y se han encontrado desde incrementos hasta disminuciones en la tasa de formación (Nilsson, 1994).

El sistema adenilato ciclasa (AC) es un importante intermediario en el efecto de las diferentes sustancias y en la formación del humor acuoso, existiendo una correlación positiva entre la formación de AMPc y la formación de humor acuoso. La unión de distintos neurotransmisores u hormonas a sus receptores activan proteínas G_s o G_i que estimulan o inhiben el sistema AC. Así pues, parece ser que distintos receptores convergen en la modulación del sistema AC (Nilsson, 1994), tanto estimuladores (Ω -adrenérgicos ó VIP) cuya activación aumenta el AMPc y la tasa de producción de humor acuoso, como los receptores inhibidores (Ω_2 -adrenérgicos, NPY, muscarínicos) que producen una disminución de AMPc y de la secreción de humor acuoso.

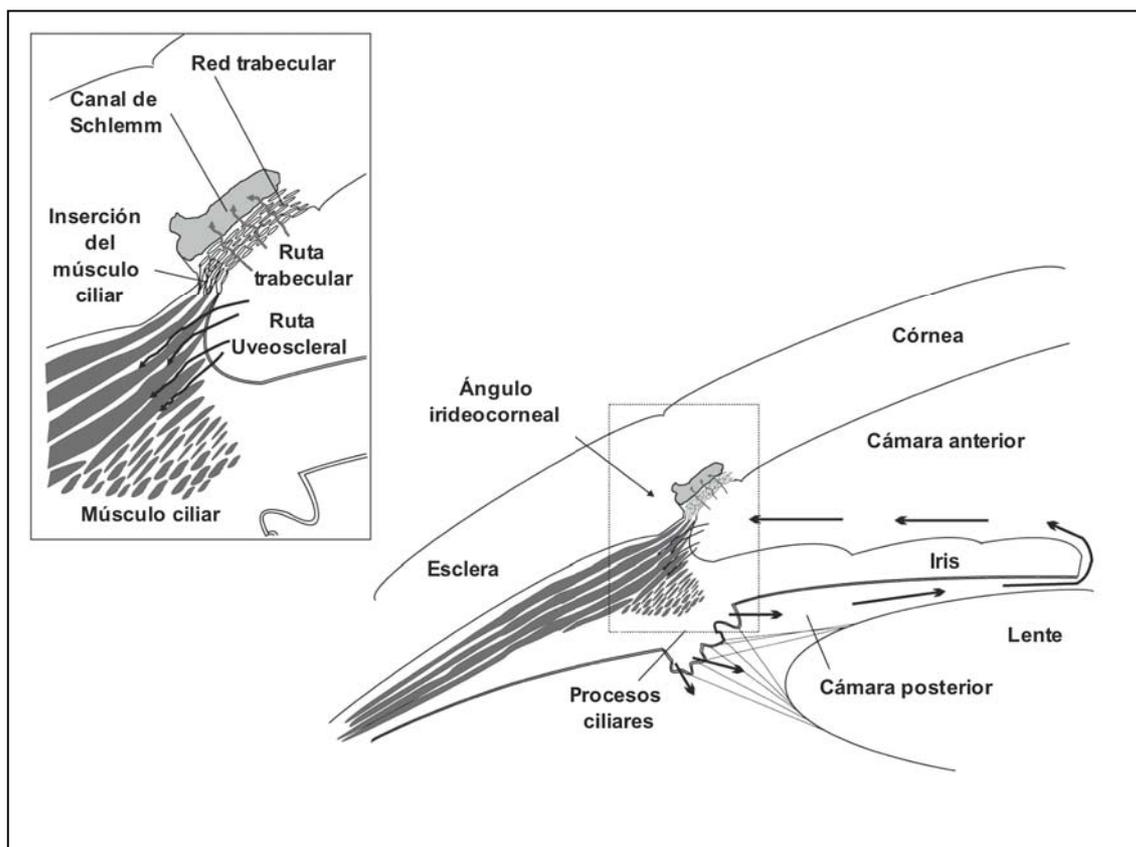


Figura 1.5. Diagrama de la dinámica y evacuación del humor acuoso a través de la vía trabecular y uveoscleral. Modificado de Llobet, 2003.

Otros sistemas de segundos mensajeros, como el sistema NO/GMPc, están también implicados en la formación del humor acuoso. Compuestos donantes de NO reducen la formación del humor acuoso por esta vía (Shahidullah, 2005).

1.2.3. Evacuación del humor acuoso

Se ha explicado que el humor acuoso se forma en los procesos ciliares siendo secretado a la cámara posterior y que de allí pasa a través de la pupila hasta la cámara anterior, donde es drenado a nivel del ángulo iridocorneal a través de las vías de evacuación. Existen dos vías de drenaje hacia la circulación venosa: la vía trabecular (convencional) y la vía uveoscleral (no convencional).

1.2.3.1. Vía convencional

En la vía convencional, el humor acuoso fluye a través de las diferentes capas que constituyen la red trabecular: uveoscleral, corneoscleral y cribiforme, hasta entrar en el canal de Schlemm (Figura 1.6). Desde aquí, el humor acuoso entra en los canales colectores, que son drenados hacia las venas intraesclerales y epiesclerales. Esta vía supone aproximadamente el 80-90% de la evacuación de humor acuoso en humanos, siendo el porcentaje algo menor en otras especies (Lütjen-Drecoll, 1994).

El humor acuoso, en su paso hacia el canal de Schlemm, atraviesa la pared interna del endotelio del canal por dos rutas diferentes: la vía paracelular y la vía transcelular. En la vía paracelular, el humor acuoso fluye a través de los estrechos espacios intercelulares de las células endoteliales que conforman la pared interna del canal de Schlemm. En la vía transendotelial se producen invaginaciones y poros en las células endoteliales que facilitan el drenaje mediante vacuolas gigantes (Figura 1.7). Esta vía supone la vía por la cual la mayor parte de humor acuoso pasa al interior del canal. Estas estructuras son dependientes de presión, ya que su número aumenta paralelamente con el aumento de la presión intraocular (IOP), y desaparecen casi completamente cuando disminuye la IOP (Bill, 1975). Así pues, en un rango de presiones normales, el flujo a través de la ruta convencional aumenta linealmente con el aumento de presión. Sin embargo, a altas presiones, la evacuación disminuye por una compresión de la red trabecular y del canal de

Schlemm y, por lo tanto, por un aumento de la resistencia al paso del líquido (Brubaker, 1975).

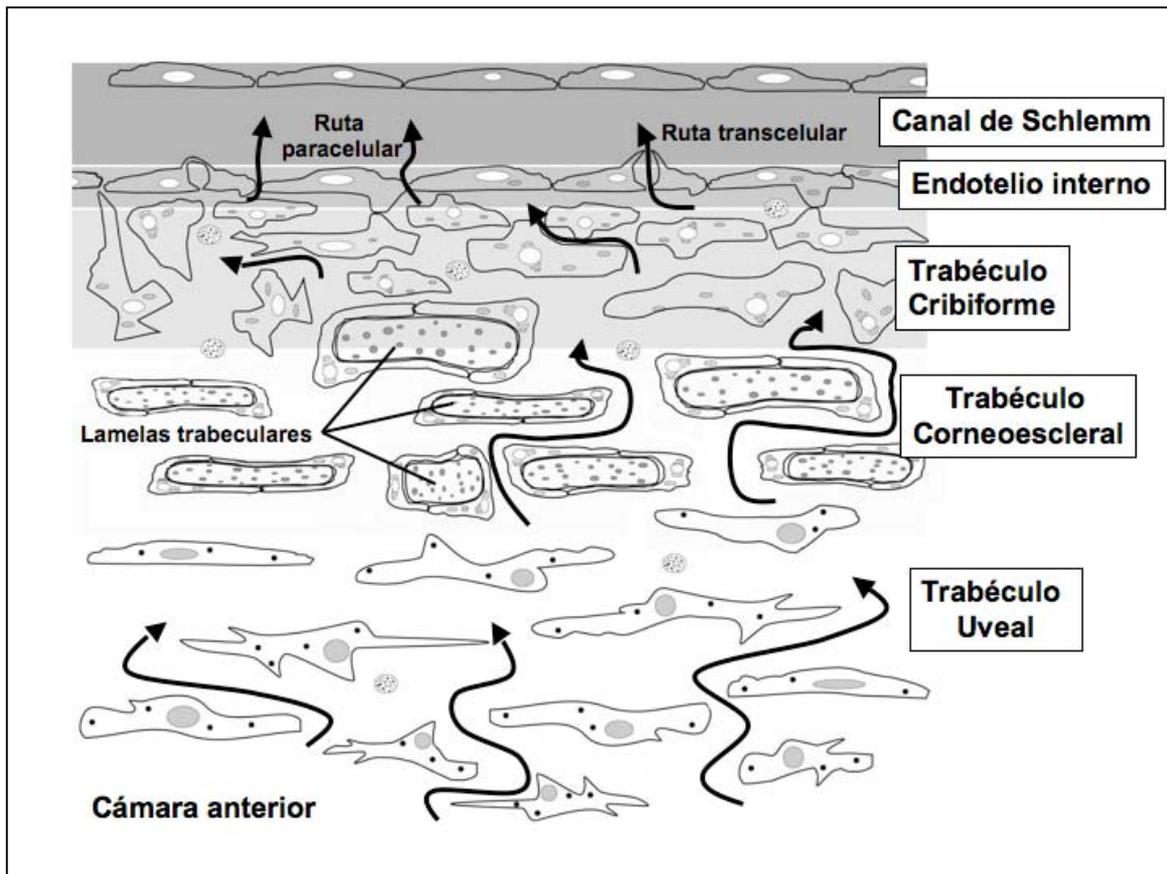


Figura 1.6. Diagrama de la red trabecular donde se muestra el flujo del humor acuoso desde la cámara anterior hacia el canal de Schlemm. El humor acuoso fluye a través de los espacios de las diferentes partes de la red trabecular (uveal, corneoescleral y cribiforme) y cruza la pared interna del canal de Schlemm a través de dos rutas: una transcelular y otra paracelular o intercelular. La resistencia al paso del humor acuoso aumenta progresivamente conforme éste llega al canal de Schlemm. Modificado de Llobet, 2003.

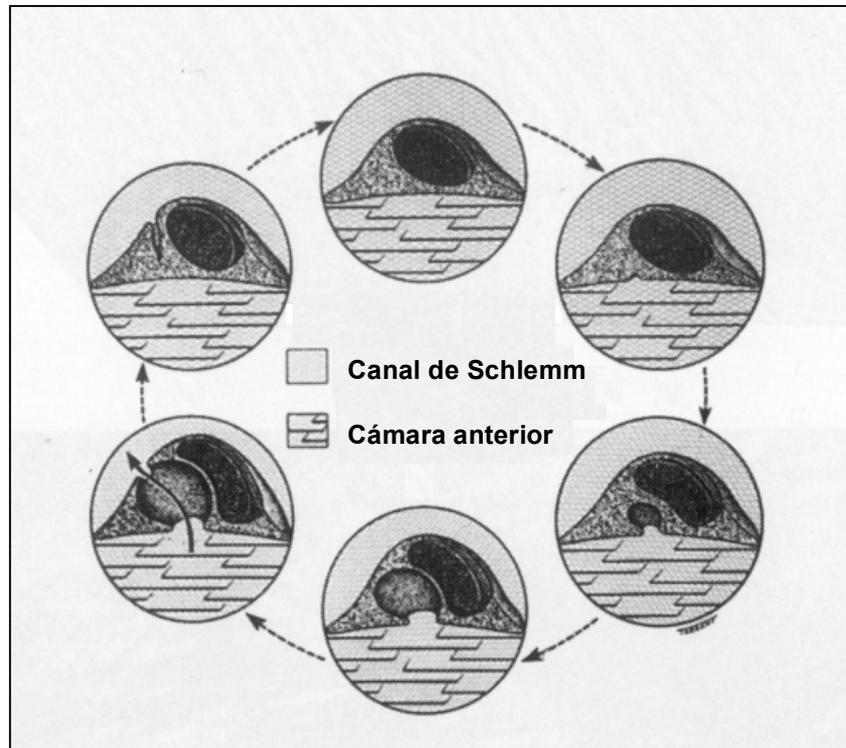


Figura 1.7. Ruta transcelular del paso del humor acuoso a través del canal de Schlemm en la que se producen vacuolas gigantes en las células endoteliales. Modificado de Tripathi, 1984.

1.2.3.2. Vía uveoescleral

La segunda vía de evacuación es la ruta uveoescleral. Es la vía de salida minoritaria y supone aproximadamente entre el 10 y el 20 % de la salida del humor acuoso. La falta de una barrera epitelial entre la cámara anterior y el músculo ciliar hace posible que el humor acuoso penetre en el cuerpo ciliar desde el ángulo iridocorneal. El líquido fluye libremente entre los haces musculares y entra en el espacio supracoroideo y supraciliar, desde donde puede alcanzar la esclera. La vía uveoescleral es relativamente insensible a la presión.

1.3. La presión intraocular (IOP)

1.3.1. Definición

La presión que soportan los tejidos intraoculares se denomina presión intraocular (IOP) y viene determinada por el volumen de humor acuoso existente en las cámaras anterior y posterior del ojo. Su magnitud se mantiene dentro de unos niveles estables gracias a un complejo y dinámico equilibrio entre la producción constante de humor acuoso y su drenaje por las vías de evacuación. Pequeñas variaciones, ya sea en la producción o en el drenaje del humor acuoso, pueden provocar cambios en la IOP.

En condiciones de equilibrio (IOP estable) la formación de humor acuoso es igual al drenaje; esto se puede expresar mediante:

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

donde F_{in} = flujo de entrada de humor acuoso en la cámara anterior, F_{out} = salida de humor acuoso, F_{trab} = salida de humor acuoso a través de la red trabecular y el canal de Schlemm, F_u = salida de humor acuoso a través de la vía uveoescleral.

De acuerdo con la ley de Ohm, el flujo a través de un sistema determinado (Q) es directamente proporcional a la diferencia de presión entre la entrada y la salida del sistema (ΔP) e inversamente proporcional a la resistencia del sistema (R):

$$Q = \Delta P/R$$

Esta ecuación puede aplicarse también a la dinámica de fluidos oculares, con la salvedad de que la salida a través de la red trabecular es dependiente de la presión mientras que la salida a través de la vía uveoescleral es relativamente independiente dentro de un rango normal de IOP (Mäepea, 1989). La fuerza motriz para el flujo de humor acuoso a través de la red trabecular es la diferencia de presión hidrostática entre la cámara anterior y la venas episclerales, hacia donde el humor acuoso es drenado finalmente. Por lo tanto, la ley de Ohm aplicada a la dinámica de fluidos del ojo, se puede escribir de la siguiente manera:

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

O lo que es lo mismo:

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

donde P_v = presión de las venas epiesclerales y R = resistencia a través de la vía de evacuación convencional. En la fisiología ocular se suelen utilizar los términos “conductancia” o “facilidad”, en lugar de resistencia. Ya que la conductancia es la inversa de la resistencia:

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

La determinación de estos parámetros en ojos humanos es la siguiente: $IOP = 15-16$ mm Hg, $P_v = 8-9$ mm Hg, $F_{in} = 2.5-2.8$ μ l/min y $C = 0.3-0.4$ μ l/min/mm Hg. A pesar de que la salida a través de la vía uveoescleral (F_u) no ha sido determinada de manera empírica, su cálculo teórico es de aproximadamente 0.8 μ l/min.

La alta IOP que se puede originar en el interior de las cámaras oculares suele estar causada casi exclusivamente por un incremento en la resistencia de evacuación. En raras excepciones, la elevación patológica de la IOP puede ser el resultado de un aumento en la presión de las venas epiesclerales.

1.3.2. Medición y valores normales

Uno de los métodos más utilizados para la determinación de la IOP es la tonometría. Los tonómetros pueden ser de dos tipos: de aplanación y de indentación.

En humanos, la IOP se mide habitualmente mediante tonometría de aplanación. Los tonómetros de aplanación se basan en la medida de la fuerza que es necesaria para aplanar cierta área de la córnea. Ya que la presión se define como fuerza por unidad de superficie, se puede determinar la presión de manera directa. El tonómetro de Goldmann es el método más empleado en la clínica para la medición de la IOP (Hart, 1994).

La IOP, al igual que otras variables biológicas, no sigue una distribución normal, sino que tiende gradualmente hacia presiones más altas. La presión en humanos y monos

es de 15 mm Hg (Bito, 1979), en perros es de 19 mm Hg (Gelatt, 1998), en gatos de 14 mm Hg (Stadtbaumer, 2002) y en ratones es de 16 mm Hg (Aihara, 2003).

1.3.3. Variaciones fisiológicas de la IOP

La IOP no es exactamente la misma en todas las partes del ojo, ya que existen variaciones espaciales. La presión en la cámara posterior suele ser ligeramente superior respecto a la cámara anterior, lo cual induce un flujo del humor acuoso desde la cámara posterior hacia la anterior.

A su vez, a pesar de que la IOP se mantiene dentro de un rango a lo largo del tiempo, existen factores capaces de provocar variaciones temporales a corto y a largo plazo.

A corto plazo, la IOP presenta claras fluctuaciones. En condiciones normales existen variaciones moderadas que se correlacionan con la presión arterial. El volumen intraocular, y por lo tanto la IOP, aumenta durante la sístole y disminuye durante la diástole (Nilsson, 1994). Existe una variación diurna donde los niveles de presión son máximos a primera hora de la mañana y mínimos a última hora de la noche o en la madrugada. Dichas variaciones parecen ser atribuibles a cambios en la producción del humor acuoso y son comparables con la reducción obtenida al utilizar inhibidores de la anhidrasa carbónica o bloqueantes α -adrenérgicos (Reiss, 1984). El ritmo de formación de humor acuoso varía en relación con los niveles endógenos de cortisol y catecolaminas, produciéndose el pico máximo de IOP 3 ó 4 horas después del máximo nivel de cortisol en sangre. Hay otros factores que determinan variaciones de IOP, como cambios en la presión venosa central o modificaciones en la postura corporal. Variaciones de los movimientos oculares pueden provocar oscilaciones a corto plazo de la IOP, al igual que el ejercicio intenso.

Dentro de las variaciones a largo plazo, se ha postulado la edad. Varios estudios apuntan una relación entre la edad y los incrementos de la IOP, sin embargo, estos hallazgos no son universales y otros estudios no han encontrado una relación significativa. Otra variación a largo término se produce durante los meses de invierno, en los que se ha observado un ligero aumento de la presión intraocular a pesar de que se desconocen las causas (Hart, 1994).

1.3.4. Alteraciones patológicas de la IOP: los glaucomas

Los glaucomas son un conjunto de patologías oculares neurodegenerativas que tienen en común una lenta y progresiva degeneración de las células ganglionares de la retina, lo que va acompañado de una pérdida de visión (Weinreb, 2004). La mayoría de los glaucomas tienen también en común un aumento de la IOP. Al incrementarse la IOP por encima de unos valores fisiológicos, se produce una compresión de las fibras del nervio óptico contra la esclera en la región de la lámina cribosa (Bellezza, 2003). Los axones de las neuronas ganglionares de la retina convergen hacia la lámina cribosa para formar la papila, lugar de incisión del nervio óptico. En el glaucoma, las fibras axonales degeneran hasta que son destruidas, momento en el que se manifiesta la pérdida progresiva en el campo visual. Independiente o adicionalmente a la IOP, otros factores pueden contribuir al daño neuronal, destacando la hipoxia isquémica por una disfunción del aporte sanguíneo, un exceso en la estimulación glutamatérgica, malfuncionamiento de bombas celulares y transportadores de glutamato, estrés oxidativo y formación de radicales libres y la presencia de citoquinas inflamatorias (Weinreb, 2004).

La prevalencia del glaucoma en la sociedad occidental es muy elevada. Se calcula que alrededor de 66 millones de personas en el mundo lo padecen y que esta patología produce ceguera bilateral en más de 6 millones de personas, siendo ésta la segunda causa de ceguera tras las cegueras traumáticas (Weinreb, 2004).

La etiología del glaucoma es variada, existiendo glaucomas con diferentes características. Según éstas, los glaucomas pueden clasificarse en diferentes tipos: ángulo abierto, ángulo cerrado, agudo, crónico, congénito, primario y secundario. En cualquier caso, salvo raras excepciones, los glaucomas se caracterizan por presentar valores de presión intraocular elevada (>21 mm Hg) que va acompañada de pérdidas en el campo visual. Esta elevación en la IOP es el principal factor de riesgo. Casi todas las formas de glaucoma se deben a problemas en el drenaje del humor acuoso. La etiopatogenia de estos problemas varía según las diferentes formas de glaucoma. Una de las clasificaciones más comunes es la que diferencia entre glaucoma de ángulo cerrado y de ángulo abierto.

1.3.4.1. Glaucoma de ángulo cerrado

Dentro de los glaucomas de ángulo cerrado se incluyen aquellas condiciones agudas o crónicas en las que existe una obstrucción temporal o permanente de la red trabecular por parte del iris, resultando en una disminución del drenaje del humor acuoso y por lo tanto en una elevación de la presión intraocular (Skuta, 1994). Este tipo de glaucoma es menos frecuente que el glaucoma de ángulo abierto, con una relación de entre 1:4 a 1:10. Parece ser que existe una influencia hereditaria en la profundidad del ángulo de la cámara anterior y, por lo tanto, en el riesgo de desarrollar glaucoma de ángulo cerrado (Skuta, 1994). Su incidencia es mayor en mujeres que en hombres y menor entre poblaciones negras o indias respecto a caucásicas. Existe asimismo un mayor riesgo en ojos hipermétropes o con el aumento de la edad. En general, los ojos con segmentos anteriores más pequeños están más predispuestos a un bloqueo de la vía de evacuación y a padecer glaucomas de ángulo cerrado.

La exposición a luz tenue, alteraciones emocionales juntamente con estimulación simpática o el uso de agentes farmacológicos con propiedades anticolinérgicas o simpatomiméticas, pueden resultar en una dilatación de la pupila y un cierre potencial del ángulo de la cámara anterior.

1.3.4.2. Glaucoma primario de ángulo abierto

El glaucoma primario de ángulo abierto (POAG; *primary open-angle glaucoma*) se define como una neuropatía óptica que va acompañada de pérdidas en el campo visual y está normalmente asociado con un aumento de la IOP. Por definición, en este tipo de glaucoma no existe obstrucción del ángulo iridocorneal por parte de estructuras como el iris. El POAG es la forma más frecuente de glaucoma.

Dentro de los factores de riesgo que se asocian con el POAG, el único con gran valor de predicción es una elevación persistente de la IOP. Otro factor de riesgo es la presencia de una papila óptica grande. Hay una prevalencia mayor de la enfermedad dentro de la raza negra en comparación con la caucásica u oriental. El incremento en la edad es otro factor de riesgo, siendo menos frecuente en individuos jóvenes. Hay otros factores que favorecen el riesgo de aparición de glaucoma, como la *diabetes mellitus*, la hipertensión arterial o la miopía. Son importantes los antecedentes familiares de glaucoma, ya que existe un fuerte componente genético.

Algunos síndromes oculares pueden provocar el denominado glaucoma secundario de ángulo abierto. Por ejemplo, material exfoliativo procedente de la parte anterior de la cápsula de la lente o del iris, parece ser causa del glaucoma pseudoexfoliativo.

La administración sistémica u ocular de glucocorticoides puede provocar una elevación de la IOP y producir un glaucoma inducido por esteroides. Esto ocurre ya que estas hormonas esteroideas aumentan la resistencia a la evacuación del humor acuoso vía cambios morfológicos y bioquímicos en la red trabecular (Clark, 1995). Las características de este glaucoma son muy similares a las del POAG.

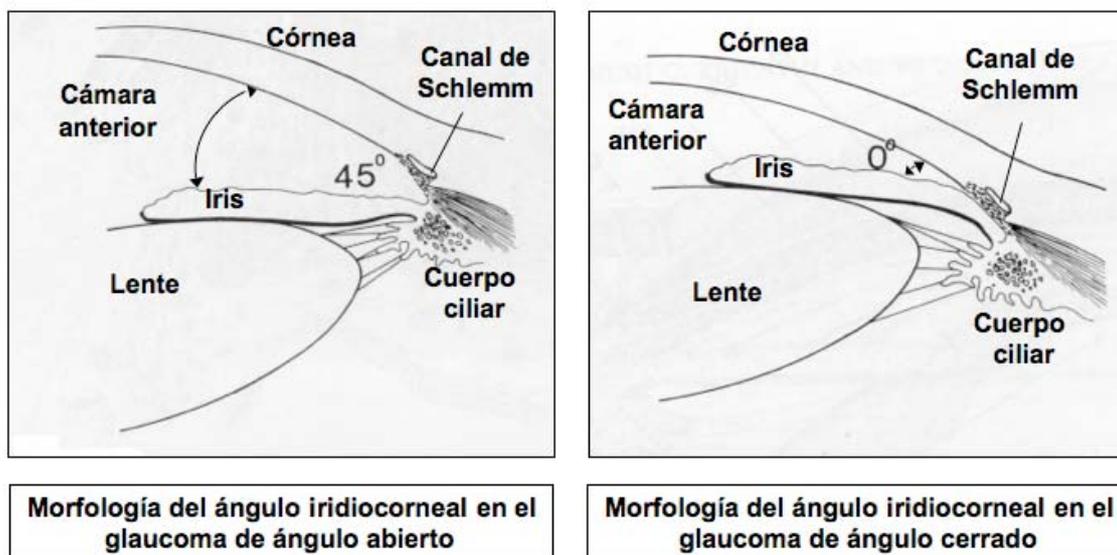


Figura 1.8. Estructura del ángulo iridocorneal en distintos tipos de glaucoma. En el glaucoma de ángulo abierto la morfología del ángulo es completamente normal, mientras que en el glaucoma de ángulo cerrado el iris bloquea el ángulo impidiendo el paso de humor acuoso.

1.3.4.3. Glaucomas secundarios

En este tipo de glaucomas, se producen aumentos en la IOP debido a una enfermedad subyacente. El glaucoma secundario generalmente es una afección unilateral y su prevalencia es del 0.1% de la población.

Hay varias clases de glaucoma secundario: el glaucoma neovascular es una forma frecuente que ocurre como complicación de la retinopatía diabética o de la trombosis de la vena central de la retina. En ambos casos se obstruye la salida del humor acuoso. Estos glaucomas cursan con inflamación ocular y sintomatología asociada a ella. Otra forma de glaucoma secundario es el que se asocia a la uveítis. En este caso, la presión ocular aumenta producto del cambio de las características del humor acuoso, que contiene elementos anormales como proteínas y células inflamatorias. Estos elementos obstruyen los espacios trabeculares dificultando la salida del humor acuoso y elevando la presión ocular. Otra forma de glaucoma secundario es el glaucoma traumático, que ocurre de forma secundaria a una herida en el globo ocular. El glaucoma se produce por la alteración traumática del sistema de drenaje del humor acuoso.

1.3.4.4. Genes asociados al glaucoma

El POAG parece tener componente genético y se han podido correlacionar mutaciones en genes concretos con el desarrollo de la patología. Hasta la fecha se han descrito tres genes ligados a la enfermedad: el gen del CYP1B1 (citocromo P4501B1), el gen TIGR/MYOC (*Trabecular meshwork inducible glucocorticoid protein*) y el gen de la optineurina.

Se han identificado y asociado diferentes mutaciones heredables en el gen CYP1B1 en individuos de familias que presentan un tipo de glaucoma primario congénito. La prevalencia en países occidentales es de 1:10.000 aunque puede llegar a ser de 1:1.250 en ciertas poblaciones europeas (Sarfrazi, 1997). El producto del gen CYP1B1, el citocromo P450, es un enzima que metaboliza hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos que suponen un contaminante ambiental. Además de esta actividad metabólica, el P450 parece activar ciertos inhibidores de la bomba ATPasa Na^+/K^+ , enzima que se ha relacionado con la transparencia de la córnea y en la secreción del humor acuoso por el epitelio ciliar (Schwartzman, 1987). Un freno de estas funciones del enzima

podría relacionarse fácilmente con dos de los primeros diagnósticos de la enfermedad: turbidez de la córnea y aumento de la IOP.

El gen TIGR/MYOC supuso el primer gen asociado al POAG, tanto adulto como juvenil (Stone, 1997). La proteína que codifica el gen se identificó por primera vez sobre expresada en una línea de células trabeculares tras un tratamiento prolongado con dexametasona (Sarfrazi, 1997). La función de la proteína codificada por el gen TIGR/MYOC es desconocida, pero se ha visto que mutaciones en el gen producen que la proteína no se pliegue de manera correcta y sea retenida dentro de la célula en forma de agregados, en lugar de ser secretada al espacio extracelular (Borrás, 2003). Estas consideraciones permiten hipotetizar que el mecanismo causante del glaucoma podría incluir no sólo la pérdida de una función extracelular beneficiosa de la proteína, sino también la adquisición de un efecto nocivo por la acumulación de estas proteínas. En apoyo de esta hipótesis está el hecho que un ratón *knock-out* para el gen MYOC presenta valores de IOP normales (Borrás, 2003). El gen es inducido con alta presión, lo que lleva a sugerir que podría tratarse de un mecanismo protector más que homeostático (Borrás, 2002a).

El gen ligado a glaucoma de descubrimiento más reciente, ha sido el de la optineurina (OPTN). La proteína que codifica este gen parece ser secretable, pues aparece en el humor acuoso de todas las especies analizadas (Rezaie, 2002). En un estudio realizado sobre 54 familias con POAG autosómico dominante adulto, incluidas personas con una IOP normal, se encontraron mutaciones en el gen OPTN en el 16.7% de los individuos. Mutaciones en este mismo gen se encontraron en el 13.6% de una muestra de 124 casos de glaucoma con dominancia de IOP normal (Rezaie, 2002). Así pues, la optineurina supone el primer gen asociado a ciertos casos de glaucoma con presión normal. Se ha especulado acerca del papel neuroprotector de la proteína en el ojo y en el nervio óptico actuando a través de la vía TNF Ω , mientras que la forma mutada podría producir una neuropatía (Rezaie, 2002).

1.3.5. Tratamiento del glaucoma

El tratamiento del glaucoma está dirigido a reducir la IOP, disminuyendo de esta manera el daño neuronal y la ceguera. Sin embargo, cuando una persona presenta ya una pérdida parcial o total del campo visual, no es posible la recuperación de la visión. Entre

los tratamientos del glaucoma más empleados se encuentran el quirúrgico (trabeculectomía o trabeculoplastía láser) y el farmacológico. De momento la terapia génica no se utiliza en el tratamiento del glaucoma, sin embargo, los estudios encaminados a la utilización de la terapia génica son cada vez más numerosos, revelando una posible utilización futura de este tratamiento en la patología del glaucoma.

1.3.5.1. Tratamientos quirúrgicos

Las dos técnicas quirúrgicas más empleadas en el tratamiento del glaucoma son la trabeculoplastía y la trabeculectomía. La trabeculoplastía es un tratamiento en el que se aplican pequeños pulsos de láser de 50 micrones de diámetro sobre la región del trabéculo. La lesión producida por el láser en la red trabecular permite mejorar la salida de humor acuoso.

La trabeculectomía es una técnica quirúrgica en la que se extirpa parte del trabéculo y del endotelio del canal de Schlemm, permitiendo de esta manera crear una vía de salida para el humor acuoso desde la cámara anterior hacia el espacio subconjuntival y normalizando de esta forma la IOP. Esta técnica constituye el procedimiento quirúrgico más utilizado en el glaucoma de ángulo abierto.

1.3.5.2. Farmacología en el tratamiento del glaucoma

El tratamiento farmacológico está encaminado a disminuir el factor de riesgo causal del glaucoma, es decir, la IOP.

Fármacos parasimpaticomiméticos

Los agonistas parasimpáticos directos, como la pilocarpina o el carbachol, o agonistas indirectos, como los inhibidores de la colinesterasa (eserina o yoduro de fosfolina), producen un efecto neto de aumento del drenaje del humor acuoso. Los efectos colinérgicos parecen ser mediados por receptores muscarínicos presentes en el músculo ciliar. La contracción de este músculo aumenta el flujo a través de la red trabecular y disminuye el drenaje a través de la ruta uveoescleral. Como la facilidad trabecular es

aproximadamente un orden de magnitud superior a la uveal, el resultado neto es una marcada elevación de la facilidad de drenaje con una disminución de la IOP (Hart, 1994). Dados los efectos secundarios de la pilocarpina (miosis, miopía, espasmo del músculo ciliar y riesgo de desarrollar cataratas), se ha postergado su uso frente a nuevas drogas desarrolladas recientemente.

Fármacos simpaticomiméticos

Los agonistas Ω_2 -adrenérgicos (apraclonidina y brimonidina) parece que en primera instancia disminuyen la formación del humor acuoso, pero a largo plazo su efecto es un aumento de la facilidad de evacuación (Toris, 1999). Este subtipo de receptor adrenérgico está presente en el epitelio ciliar y en las células de la red trabecular entre otros tejidos oculares (Bylund, 1997; Stamer, 1996).

Los antagonistas Ω -adrenérgicos o betabloqueantes (betaxolol, timolol o levobunolol) disminuyen también la secreción del humor acuoso a nivel del epitelio ciliar. En la clínica diaria, el betabloqueante más utilizado es el maleato de timolol. La administración de otros agonistas simpáticos, como son el colirio de epinefrina y de dipivalil-epinefrina, a pesar de su efecto reductor en la formación de humor acuoso, ha dejado de usarse por sus efectos secundarios.

Fármacos análogos de prostaglandinas

Los análogos de las prostaglandinas y prostamidas (latanoprost, bimatoprost, travosprost, unoprostona) reducen la IOP mediante un aumento en el drenaje del humor acuoso, principalmente por la vía uveoescleral (Gabelt, 1989). Algunas prostaglandinas activan las metaloproteinasas, las cuales remodelan la matriz extracelular de la red trabecular y disminuyen la resistencia, permitiendo el paso de humor acuoso por esta vía (Weinreb, 2002).

Este tipo de drogas son las más utilizadas actualmente por su efectividad en la disminución de la IOP y por los mínimos efectos secundarios que poseen a nivel sistémico. De todas formas, en Europa y EEUU tan sólo está aprobado el uso del latanoprost.

Fármacos inhibidores de la anhidrasa carbónica

La anhidrasa carbónica es un enzima implicado en el transporte de membrana de HCO_3^- y de agua a través del epitelio ciliar. Los inhibidores de este enzima disminuyen la formación de humor acuoso. La acetazolamida se ha usado durante cuatro décadas por vía sistémica para disminuir la IOP. Los colirios de dorzolamida y brinzolamida inhiben la anhidrasa carbónica cuando son aplicados de forma tópica y presentan menos efectos secundarios que la aplicación sistémica de acetazolamida.

Fármacos que varían la osmolaridad

Las sustancias que elevan de forma rápida y significativa la osmolaridad sanguínea, ocasionan una salida de líquido desde el globo ocular hacia el sistema sanguíneo y se acompañan de un descenso rápido y efectivo de la IOP. La ingestión oral de soluciones hipertónicas de glicerina o las inyecciones intravenosas de soluciones concentradas de urea o manitol son muy útiles en el control de las presiones intraoculares que se han elevado de forma rápida y considerable (Hart, 1994).

Fármacos inhibidores de la ATPasa Na^+/K^+

La bomba ATPasa Na^+/K^+ se encuentra presente en grandes concentraciones en la membrana basolateral del epitelio ciliar no pigmentado, dónde genera energía para el transporte activo de Na^+ a la cámara posterior, facilitando así la formación de humor acuoso. La inhibición de este enzima reduce la formación de humor acuoso en más de un 50% en diferentes especies, incluida la humana. Sin embargo, existen efectos adversos que impiden su utilización a nivel clínico: la aplicación tópica afecta al mismo enzima en la córnea provocando edema corneal y aplicado a nivel sistémico tiene efectos cardíacos adversos (Kaufman, 1994).

1.3.6. Terapia génica en el tratamiento del glaucoma

La terapia génica no ha sido utilizada hasta el momento en el tratamiento de la patología del glaucoma, sin embargo, se está investigando de manera extensa de cara al futuro. El glaucoma ofrece variedad de dianas potenciales para la terapia génica. Por un

lado, las estructuras adecuadas para la inserción de genes incluyen la red trabecular, el epitelio ciliar, el músculo ciliar, las células ganglionares o las células gliales de Müller. Por otro lado, genes como el TIGR/MYOC, cuya disfunción se ha asociado al POAG juvenil primario, y el gen de la OPTN, se presentan como candidatos idóneos para la terapia génica del glaucoma.

Varios estudios han demostrado que vectores de adenovirus pueden insertar genes de manera eficiente en la red trabecular, tras una inyección intracameral. Los adenovirus transducen todos los tipos celulares que conforman la red con alta eficiencia en todas las especies investigadas: conejos, ratón, rata, perro, monos y segmentos anteriores procedentes de humanos (Borrás, 2002b). Otro vector utilizado capaz de transferir genes a estructuras y células relevantes en el glaucoma, han sido los virus Herpes simplex, los cuales son capaces de transducir células trabeculares y del epitelio ciliar (Spencer, 2000; Liu, 1999).

A pesar de que la base genética de muchos glaucomas todavía es desconocida, la transferencia y expresión de genes que codifican productos neuroprotectores o disminuidores de la IOP podrían servir para modificar la fisiología de células de interés y bloquear de esta manera la patogénesis de la enfermedad. La disminución de la IOP manipulando tejidos del segmento anterior con terapia génica podría representar un primer e inmediato tratamiento para el glaucoma (Borrás, 2002b).

La mayor parte de las investigaciones se han centrado en la introducción de genes chivato en las células, sin embargo, algunos trabajos han demostrado que un vector adenovirus es capaz de transportar la metaloproteínasa estromelsina y transducir células trabeculares de rata tras una inyección intracameral (Kee, 2001). La transducción de vectores de adenovirus que transportaban el gen salvaje MYOC o genes que afectan al citoesqueleto incrementan la facilidad de evacuación (Vittitow, 2002). Se han insertado también genes con el BDNF (Factor neurotrófico derivado de cerebro) observándose en diferentes estudios una protección de las células ganglionares de la retina (Di Polo, 1998). El humor acuoso contiene numerosos factores secretados por el epitelio ciliar que pueden actuar como moléculas señalizadoras en las células trabeculares, modulando de esta forma sus características y su resistencia al paso del humor acuso (Coca-Prados, 1999). La manipulación de la concentración de estos factores podría, pues, representar también una atractiva diana génica en la terapia del glaucoma.

1.4. Fisiología de la red trabecular

1.4.1. La célula trabecular

Las células que forman la red trabecular tienen propiedades endoteliales y se encuentran ancladas a una matriz extracelular que le confiere una estructura tridimensional única. Tienen una tasa de replicación baja pero son metabólicamente muy activas. Estas células son capaces de secretar, fagocitar, contraerse, responder frente a condiciones de estrés y de liberar factores que afectan a la permeabilidad del canal de Schlemm (Alvarado, 1984; Shirato, 1989; Lütjen-Drecoll, 1994; Wang, 2001).

1.4.1.1. Origen de la célula trabecular

Debido a la presencia de una enolasa específica de neuronas cerebrales en los cultivos de células trabeculares, se postuló que estas células podrían derivar de la cresta neural (Tripathi, 1989). Experimentos de inmunohistoquímica realizados en ojos humanos adultos con anticuerpos específicos de la enolasa cerebral, muestran un marcaje en la red trabecular, sobretodo en la región uveal y córneoescleral. En las células de la parte yuxtacanalicular y del canal de Schlemm el marcaje es ocasional, hecho que es interpretado como un origen potencialmente diferente de las células de la red trabecular. Una confirmación del origen neural de la red trabecular se ha visto en ratones mutantes para el gen *Pax6*, un factor de transcripción que interviene en la diferenciación de los tejidos derivados de la cresta neural (Matsuo, 1993). En estos ratones, los tejidos del ángulo iridocorneal, que conforman la vía de evacuación, no se diferencian (Baulmann, 2002). Respecto a las células del canal de Schlemm (SC) está aceptado que éstas son de origen vascular. Parece que el SC se desarrolla a partir de pequeños vasos venosos de la región del limbo a las 17 semanas de gestación (Hamanaka, 1992). Los extremos de esos plexos venosos crecen circumferencialmente hasta completar el SC a los 40 días.

1.4.1.2. Heterogeneidad funcional

Existen como mínimo dos poblaciones celulares diferentes dentro de la red trabecular: un primer tipo celular redondeado de características endoteliales y uno segundo alargado, tipo célula de la musculatura lisa (Coroneo, 1991). Estos dos tipos

celulares muestran una serie de características morfológicas y eléctricas que las diferencian entre sí. Las células del tipo muscular presentan Ω -actina de músculo liso, abundantes filamentos intermedios y microfilamentos, largos procesos citoplasmáticos y un potencial de membrana de Δ -70 mV. Por su parte, las células del tipo endotelial disponen de pocos filamentos intermedios y microfilamentos, tienen procesos citoplasmáticos cortos, y presentan un potencial de membrana de -50 mV. Estas células, debido a la gran cantidad de retículo, ribosomas, vacuolas, lisosomas y un extenso complejo de Golgi, parecen ser muy activas metabólicamente (Coroneo, 1991).

Otro hecho que aboga por la existencia de diferentes tipos celulares funcionales es la presencia de ciertos canales en un porcentaje limitado de células trabeculares. En este sentido, el 60% de ellas presentan evidencias funcionales del canal Kir2.1, mientras que está ausente en el 40% restante (Llobet, 2001). Además, la activación de canales iónicos tras la estimulación de receptores de adenosina A_{2A} , se da en el 40% de las células (Fleischhauer, 2003). Por otro lado, el distinto porcentaje de respuesta del Ca^{2+} intracelular también es indicativo de la existencia de varias poblaciones. La respuesta frente a neuropéptidos como la sustancia P, bombesina o VIP, se sitúa en torno al 20-30%, mientras que otros neuropéptidos como el neuropéptido Y logran respuesta en la mayor parte de las células (Ohuchi, 1992).

1.4.1.3. Características funcionales de las células trabeculares

1.4.1.3.1. Potencial de membrana y excitabilidad

Como se ha comentado anteriormente, el potencial de membrana trabecular difiere según el tipo de célula. En células trabeculares bovinas (BTMs) se sitúa en torno a los -50 mV en las células del tipo endotelial y en -70 mV en las de tipo muscular (Coroneo, 1991). Respecto a las células trabeculares humanas (HTMs), los potenciales de membrana (V_m) son semejantes a los encontrados en bovinas (Lepple-Wienhues, 1994).

Estas diferencias en el V_m pueden establecer una correlación funcional. El V_m es crucial para la función celular ya que está involucrado en procesos como la contracción, siendo posible conjeturar, en base a los diferentes V_m encontrados en las células trabeculares, que estas diferencias pueden ser atribuibles a una expresión diferencial de canales iónicos, especialmente aquellos que contribuyen al establecimiento del V_m .

Tanto en las células BTMs como HTMs, tienen lugar fluctuaciones en el V_m , parecidas a las observadas en células musculares lisas, que son dependientes del Ca^{2+} extracelular y en las que no están involucrados canales de Na^+ . Aproximadamente el 10% de las células trabeculares muestran este comportamiento contráctil (Coroneo, 1991, Lepple-Wienhues, 1994).

1.4.1.3.2. Proliferación

Las células trabeculares no disponen de una tasa de replicación demasiado elevada. Se sabe que en pacientes con glaucoma y edad avanzada, tiene lugar una pérdida significativa de células trabeculares (Grierson, 1987). Esta disminución celular produce una pérdida de las trabéculas lo que conlleva una disminución de la facilidad de evacuación. Hay factores que afectan a la celularidad trabecular: la trabeculoplastia, intervención con láser que se realiza sobre la red trabecular con el fin de facilitar la evacuación del humor acuoso y conseguir una disminución de la presión intraocular, induce replicación celular (Bylsma, 1988). De manera inversa, altos niveles de glucosa reducen la proliferación de células bovinas (Sato, 2002). Debido a los altos niveles de glucosa en el humor acuoso de pacientes con diabetes, esto podría explicar la mayor frecuencia de glaucoma en individuos con la enfermedad.

1.4.1.3.3. Secreción

La actividad secretora de las células de la red trabecular es fundamental para la formación y el mantenimiento de la matriz extracelular. Para ello, las células trabeculares sintetizan los enzimas y componentes estructurales necesarios para la correcta organización de la matriz (Lütjen-Drecoll, 1994). Esta actividad secretora es quizá una de las más importantes desempeñadas por las células del trabéculo, ya que son extensas las evidencias de una acumulación anormal de materiales de la matriz extracelular en POAG (Borrás, 2003).

1.4.1.3.4. Fagocitosis

La capacidad fagocítica de las células trabeculares ha sido demostrada en multitud de estudios (Shirato, 1989). Son activamente fagocíticas y funcionan manteniendo las vías de drenaje libres de detritos celulares, pigmento y otros materiales. Entre las muchas causas que se han propuesto en la patología del glaucoma, una es un descenso en la capacidad fagocítica. Sin embargo, la habilidad fagocítica de la red trabecular se muestra similar entre ojos con POAG y ojos normales en perfusión de cultivo de órgano (Matsumoto, 1997a).

Las células trabeculares humanas son capaces de fagocitar microesferas no metabolizables, gránulos de pigmento, eritrocitos y material de pseudoexfoliación (Shirato, 1989). Tras la fagocitosis parece que las células muestran, a corto plazo, una pérdida de adhesividad a la matriz extracelular, acompañada de desorganización de la estructura del citoesqueleto e incremento de la actividad migratoria (Zhou, 1999). Los procesos siguientes a la fagocitosis son iguales: las células trabeculares toman forma redondeada, se desenganchan de su sustrato de colágeno y migran a través del canal de Schlemm o del plexo acuoso (Sherwood, 1988). Además de este aumento en la migración, se ha visto que la adición de partículas fagocitables en cultivos de BTM recién sembrados produce una reducción en la actividad proliferativa (Day, 1986).

Existen ciertos compuestos capaces de modificar esta capacidad fagocítica. Por ejemplo, la epinefrina y la cortisona inhiben de manera significativa la fagocitosis. De igual manera, la fagocitosis también es inhibida por la dexametasona en células trabeculares humanas en sistema de cultivo de órgano (Matsumoto, 1997b), indicando que la disminución en la capacidad fagocítica causada por la dexametasona puede jugar un papel relevante en el glaucoma inducido por esteroides.

1.4.1.3.5. Contractibilidad

Las células trabeculares poseen a nivel intracelular miosina y actina específicas de la musculatura lisa (de Kater, 1990; de Kater, 1992). En las medidas del potencial de membrana de las células trabeculares se observan picos de voltaje característicos de las células musculares lisas (Coroneo, 1991). Desde entonces y hasta la fecha, las propiedades contráctiles y relajantes de las células trabeculares han sido verificadas en

multitud de ocasiones mediante el uso de sustancias que producen la contracción o la relajación de tiras de tejido (Thieme, 1999, Thieme, 2001a; Wiederholt, 2000). La contracción de la red trabecular produce una disminución de la facilidad de evacuación de humor acuoso, mientras que la relajación del tejido se traduce en un aumento de la facilidad de evacuación (Wiederholt, 2000).

1.4.1.3.6. Respuesta al estrés

Las células que conforman la red trabecular tienen la habilidad de responder a situaciones de estrés tanto mecánicas como bioquímicas.

La tensión sobre estas células es un factor que modifica el comportamiento de las células y la estructura. La alta presión provoca en ojos perfundidos una mayor separación entre los espacios de la red, así como un aumento en el número de vacuolas de las células del canal de Schlemm (Johnstone, 1973). Los cambios observados muestran una adaptación del tejido a la condición estresante, de modo que no parece haber daño celular o pérdida entre contactos celulares, aunque hay un aumento en el número de orgánulos celulares y cambios en la reorganización del citoesqueleto (Grierson, 1975; Wax, 2000).

Otro factor que afecta constantemente a las células de la red trabecular es el estrés oxidativo de sustancias como por ejemplo el peróxido de hidrógeno cuya concentración en el humor acuoso es elevada. Las células trabeculares tienen una elevada capacidad antioxidante y se ha comprobado su alta efectividad en la eliminación de este oxidante (Nguyen, 1988). Un ejemplo muy interesante que corrobora la capacidad protectora trabecular frente a la oxidación en condiciones de estrés, surge de un estudio en el que se somete a las células al oxidante t-butilhidroperóxido (t-BH) (Wang, 2001). En estos estudios se demuestra una mayor resistencia frente al t-BH en células trabeculares glaucomatosas que en normales. La resistencia de las células normales se incrementaba al tratarlas con la citoquina IL-1 y la de las glaucomatosas disminuía al tratarlas con un antagonista de la IL-1. La protección de la IL-1 actúa a través de la activación de la vía de señalización NF- κ B, la cual se activa tras varias condiciones de estrés. Estos resultados apoyan el modelo de respuesta a estrés que es beneficioso en un primer momento y podría volverse perjudicial al cronificarse la condición estresante. Cabe destacar que la activación de citoquinas inflamatorias por la activación de la vía podría contribuir al daño celular observado en el glaucoma.

1.4.1.4. Receptores

En la célula trabecular se han descrito varios tipos de receptores. Receptores Ω -adrenérgicos funcionales del tipo Ω_2 , cuya estimulación inhibe la formación de AMPc mediante una proteína $G_{i/o}$ (Stamer, 1996), y receptores Ω -adrenérgicos del subtipo Ω_2 (Wax, 1989). El receptor muscarínico M_3 se ha detectado a nivel de RNA mensajero (Gupta, 1994) y posteriormente se ha visto su capacidad para movilizar calcio intracelular (Shade, 1996) tras la activación de la fosfolipasa C (PLC). También se ha demostrado la existencia del subtipo M_2 en células BTMs y HTMs y su implicación en la contracción del tejido (Thieme, 2001b). Hay un estudio en el cual se demuestra la unión de benzodiazepinas a la red trabecular, sugiriendo la existencia en las células de receptores gabaérgicos (Zarbin, 1991). También parecen existir en células trabeculares porcinas y caninas receptores D_{A1} dopaminérgicos acoplados al sistema adenilato ciclasa, que inducen aumentos del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Karnezis, 1989). Curiosamente la activación de estos receptores de dopamina aumenta la IOP en humanos (Elliott, 1991). Las células trabeculares muestran incrementos en sus niveles de $[Ca^{2+}]_i$ cuando son estimulados con diferentes neuropéptidos (Ohuchi, 1992). El neuropéptido Y moviliza Ca^{2+} en la mayor parte de las células trabeculares mientras que tan sólo el 20 - 30% de las células incrementan la $[Ca^{2+}]_i$ frente a otros neuropéptidos como la sustancia P, bombesina, CGRP o péptido intestinal vasoactivo (VIP). El VIP, sin embargo, aumenta los niveles de AMPc (Koh, 1988).

La presencia de receptores para péptidos natriuréticos en las células de la red trabecular se ha demostrado con estudios funcionales donde la activación preferentemente de receptores del tipo B (NPR-B) estimula la formación de guanósín monofosfato cíclico (GMPc) (Chang, 1996; Zhong, 2003). Hay estudios en los que se demuestra que los péptidos natriuréticos actúan como agentes hipotensores (Fernández-Durango, 1999), a pesar de que su efecto no se ha relacionado directamente con la activación de la red trabecular. La expresión de receptores de somatostatina SSTR1 y SSTR2 también ha sido observada en la red trabecular y en el canal de Schlemm (Klisovic, 2001)

El receptor de endotelina ET_A está presente en células trabeculares humanas y media incrementos de Ca^{2+} intracelular (Tao, 1998). La exposición al agonista ET-1, además de producir los mencionados aumentos de Ca^{2+} , también provoca incrementos del pH intracelular (Kohmoto, 1994). La estimulación con histamina causa elevaciones del inositol trifosfato (IP_3) y del Ca^{2+} intracelular vía receptor de histamina H_1 (WoldeMussie,

1992). En las células trabeculares, el descubrimiento y caracterización del receptor de bradikina B_2 se hizo a partir de una línea inmortalizada (Sharif, 1996). Estudios posteriores implican este receptor en cambios de morfología celular y variaciones en la facilidad de evacuación (Llobet, 1999) y parece ser que su activación es capaz de amplificar la respuesta en el aumento de AMPc de las células mediada por PGE_2 (Webb, 2003).

Varios subtipos de receptores para las prostaglandinas han sido descritos en las células trabeculares. El EP_2 ha sido descrito mediante técnicas de inmunocitoquímica (Zhao, 1995). A su vez, en la red trabecular existen receptores funcionales de prostanoides FP_A que pueden involucrar a la red trabecular en las acciones hipotensoras de la prostaglandina $PGF_{2\alpha}$, la cual actúa principalmente sobre la vía uveoescleral (Anthony, 1998). También han sido descritos receptores funcionales TP para el tromboxano (Krauss, 1997).

En las células trabeculares se ha descrito la presencia funcional de receptores purinérgicos P1 que responden a la adenosina. Concretamente del tipo A_1 , A_{2A} y A_3 , cuya activación produce incrementos similares en la $[Ca^{2+}]_i$, cambios en el volumen celular y respuestas variables en la modulación de canales de K^+ y Cl^- (Fleischhauer, 2003). Asimismo se ha descrito receptores purinérgicos P2 metabotrópicos, concretamente $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$ y $P2Y_{11}$, cuya estimulación moviliza Ca^{2+} intracelular (Pintor, 2004a; Crosson, 2004; Chow, 2005).

La presencia de receptores funcionales para glucocorticoides en las células trabeculares se describió hace tiempo mediante estudios de *binding*, los cuales muestran una afinidad mayor por la dexametasona que por el cortisol o la progesterona (Weinreb, 1981). El receptor de cannabinoides CB_1 también está presente en las células trabeculares (Straiker, 1999).

Proteínas como la Ω_2 -macroglobulina se unen a las células trabeculares mediante dos lugares diferentes de unión en la membrana, provocando en ambos casos un aumento del Ca^{2+} intracelular (Howard, 1996).

1.4.1.5. Canales

Las células trabeculares poseen el canal de potasio de alta conductancia dependiente de voltaje y Ca^{2+} intracelular (BK_{Ca}), el cual se activa por GMPc intracelular (Stumpff, 1997). Tanto los inhibidores de la tirosina kinasa (Stumpff, 1999), como la tensión de la membrana (Gasull, 2003), aumentan la actividad del BK_{Ca} . Este canal en las células trabeculares dispone de las características típicas del canal BK_{Ca} que se encuentra en casi todas las células de músculo liso, donde es un importante regulador del grado de despolarización e hiperpolarización y, por lo tanto, de la contracción y relajación muscular (Nelson, 1995). Así pues, las sustancias que activan el canal, como es el caso del ácido flufenámico (Stumpff, 2001), permiten una relajación del tejido trabecular (Wiederholt, 1997).

Más del 60% de las células trabeculares bovinas y humanas expresan de manera funcional el canal de K^+ rectificador de entrada Kir2.1 (Llobet, 2001). Este canal se encuentra involucrado en respuestas contráctiles, función que podría llevar a cabo en las células trabeculares.

La presencia de corrientes de Ca^{2+} del tipo L ha sido demostrada tanto en células trabeculares BTMs como HTMs (Steinhausen, 2000) aunque los canales no han sido caracterizados. Estos canales influyen en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ modulando de esta manera la contractibilidad celular. Su actividad se encuentra influenciada por agonistas muscarínicos y tirosina kinasas.

En varios trabajos se ha visto la presencia de diferentes canales de la familia de canales de Cl^- voltaje-dependientes en las células trabeculares. En células HTMs se ha comprobado la expresión de todos los canales (CIC-2 a CIC-7) de Cl^- , excepto el CIC-1 (Comes, 2005a), mientras que en células bovinas se han encontrado el CIC-2, el CIC-5, (Srinivas, 2004) y otros estudios indican además de la expresión de los dos anteriores, el CIC-6 y el CIC-7 (Comes, 2005a). Hay que comentar que en ambos trabajos los *primers* utilizados han sido diseñados para secuencias humanas, con lo que no debe descartarse la posibilidad de la existencia de otros miembros de la familia en células trabeculares bovinas. Paralelamente, se ha caracterizado funcionalmente el canal CIC-2 en las células trabeculares tanto humanas como bovinas (Comes, 2005b). Por otro lado, las células trabeculares presentan una corriente de Cl^- dependiente de volumen, ($\text{ICl}_{\text{Swell}}$), la cual parece desempeñar un importante rol en la regulación del volumen celular (Mitchell, 2002; Srinivas, 2004; Soto, 2004).

La presencia de un canal integral de membrana permeable al agua en el sistema de evacuación del ojo fue descrita por Stamer y colaboradores (Stamer, 1994). El canal Aquaporina-1 fue descrito posteriormente en células trabeculares en cultivo (Stamer, 1995a) y en células endoteliales del canal de Schlemm. La importante función desempeñada por este canal se ha comprobado en trabajos en los que se relaciona el nivel de expresión del canal con el volumen celular en reposo (Stamer, 2001). Estos cambios de expresión podrían alterar la permeabilidad en las células trabeculares yuxtacaniculares gracias a un aumento en el tránsito paracelular. Una segunda posibilidad incluiría efectos sobre las células de la pared interna del canal de Schlemm, aumentando también el tránsito transcelular y paracelular.

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio muestran evidencias de la existencia de canales receptores de potencial transitorio (TRP) en células trabeculares bovinas. Estos canales catiónicos inespecíficos permean principalmente para el ión Ca^{2+} y están modulados por la liberación de este mismo ión a partir de los depósitos citoplasmáticos, lo que se produce como resultado de la acción de diferentes agonistas. La activación de este canal tras un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ provoca una entrada de Ca^{2+} extracelular que podría ser responsable, en parte, del aumento sostenido en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se producen tras un aumento inicial de Ca^{2+} a partir de los depósitos intracelulares con drogas como la bradikinina o el ATP (Llobet, 1999; Soto, 2004).

1.4.1.6. Bombas e intercambiadores

La célula trabecular presenta diferentes bombas y proteínas transportadoras de membrana. La existencia de la bomba Na^+/K^+ ATPasa se evidenció utilizando el inhibidor ouabaína con el que se produce la despolarización de la membrana (Coroneo, 1991).

El intercambiador Na^+/H^+ ha sido descrito en células trabeculares bovinas (Chu, 1992) y estudios funcionales lo relacionan con cambios volumétricos en células humanas (Mitchell, 2002). La participación del transportador K^+/Cl^- en cambios de volumen celular ha sido sugerida en este mismo trabajo.

El sistema cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ ha sido demostrado tanto en células humanas como bovinas (O'Donell, 1995). Su actividad en gran medida depende de las cantidades de Cl^- intracelulares (Putney, 1999a) y desempeña una importante función en

la dinámica del humor acuoso a través de la regulación del volumen celular (Al-Aswad, 1999).

1.4.1.7. Vías de señalización intracelular

1.4.1.7.1. El calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$)

El ión Ca^{2+} es una señal intracelular universal y es responsable del control de numerosos procesos celulares siendo, por ejemplo, el regulador más importante de la contracción (Berridge, 1993).

Los niveles basales de Ca^{2+} en las células trabeculares se sitúan en torno a 40-80 nM. (Wiederholt, 1998). La aplicación de diferentes sustancias que movilizan Ca^{2+} intracelular produce una respuesta bifásica en las células trabeculares. Por ejemplo, la endotelina produce un pico inicial de Ca^{2+} seguido de una recuperación y un *plateau*. De manera similar, la activación de receptores muscarínicos (Shade, 1996) y otras sustancias como la bradikina (Llobet, 1999), la histamina (WoldeMussie, 1992), la $PGF_{2\Omega}$ (Anthony, 1998) o el neuropéptido Y (Ohuchi, 1992) producen patrones de Ca^{2+} similares. La gran mayoría de estas sustancias activan receptores acoplados a una proteína $G_{q/11}$, producen activación de $PLC\Omega$ generación de IP_3 y diacilglicerol (DAG) y liberación de Ca^{2+} a partir de depósitos celulares por la activación de receptores de IP_3 . Sin embargo, en algunos casos se ha relacionado la activación con proteínas $G_{i/o}$ (Neuropéptido Y) o G_s (isoproterenol) (Friedman 1999).

Se ha relacionado un aumento sostenido en la $[Ca^{2+}]_i$ de las células trabeculares con una disminución del flujo de evacuación de humor acuoso. Así, sustancias que aumentan la $[Ca^{2+}]_i$ como el carbacol, la endotelina o la bradikina, disminuyen la facilidad de evacuación (Wiederholt, 1995; Llobet, 1999). Drogas como el verapamil, que bloquea los canales de calcio tipo L presentes en las células trabeculares, aumentan la facilidad de evacuación (Erickson, 1995). Sin embargo, algunos autores encuentran que la facilidad de evacuación disminuye con el bloqueo de canales de Ca^{2+} (Melena, 1999).

1.4.1.7.2. AMPc

El sistema adenilato ciclasa (AC) es un enzima que genera el mensajero intracelular adenosina monofosfato cíclico (AMPc) a partir del ATP citoplasmático. Este enzima ha sido identificado en células trabeculares tanto humanas como bovinas (Busch, 1993), habiendo sido descritos dos subtipos distintos de AC, la AC-II y AC-IV (Zhang, 2000).

La participación del AMPc en la fisiología celular de la red trabecular ha sido estudiada ampliamente, tras la aplicación de distintos agonistas como epinefrina o isoproterenol (Erickson, 1992), PGE₁ (Dijkstra; 1999), dopamina (Karzenis, 1989), adenosina (Koh, 1988), VIP (Koh, 1997) o análogos de AMPc (Kaufman, 1987; Gilabert, 1997). Un incremento en la concentración de AMPc intracelular se asocia a un incremento de la facilidad de evacuación por la vía trabecular. Aumentos en el AMPc tras la estimulación con adenosina conllevan una disminución del volumen celular (Srinivas, 2004), mecanismo que podría explicar este aumento en el flujo de evacuación.

Parece que un aumento de la IOP podría modular esta vía del AMPc, ya que se ha descrito un aumento en la concentración de AMPc en células del canal de Schlemm tras un tratamiento de aumento de presión hidráulica (Stamer, 1999), al igual que un aumento en la actividad de la AC en células trabeculares tras el mismo tipo de tratamiento (Wax, 2000).

1.4.1.7.3. GMPc/NO

El óxido nítrico (NO) es un mediador que regula la contractibilidad de la musculatura lisa y ejerce un efecto vasodilatador a través de la estimulación de la producción de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) en las células de la musculatura lisa vascular. En las células trabeculares se ha demostrado la existencia del sistema guanilato ciclasa (Pang, 1994). La NO sintasa se ha detectado también en el sistema de drenaje bovino (Geyer, 1997) y humano (Nathanson, 1995a). En pacientes con POAG la inmunoreactividad para la NO sintasa se encuentra disminuida (Nathanson, 1995b).

Se ha podido observar en varios estudios que la concentración de GMPc en las células trabeculares incrementa tras el estímulo con agonistas como el péptido natriurético

cerebral (BNP), el péptido natriurético tipo C (CNP) o el péptido natriurético auricular (ANP) (Takashima, 1996; Pang, 1996; Chang, 1996; Zhong, 2003). Estos aumentos de los niveles de GMPc han sido correlacionados con disminuciones en la IOP (Takashima, 1998), siendo este efecto posiblemente mediado por un aumento sobre la facilidad de evacuación (Kee, 1994). Además, derivados del GMPc o agentes que producen NO aumentan la facilidad de evacuación (Kotikoski, 2003).

En la red trabecular la activación del sistema GMPc/NO provoca la relajación de tejido previamente contraído. La inhibición de la NO sintasa incrementa la acción de fármacos contractores (Wiederholt, 1994), mientras que diferentes agentes vasodilatadores como el nitroprusiato o el dinitrato de isosorbide, producen relajación de la red trabecular incluso sin previa contracción del tejido (Wiederholt, 1994). Los efectos de esta relajación parecen estar mediados por el canal BK_{Ca} (Stumpff, 1997).

1.4.2. Mecanismos de regulación de la red trabecular

La base de la regulación de la facilidad de evacuación por parte de la red trabecular es por ahora desconocida aunque se han propuesto múltiples mecanismos y cabe la posibilidad de que varios de ellos sean llevados a cabo al mismo tiempo por la red trabecular. Entre los más estudiados hay que destacar la contracción y relajación tanto de la red trabecular como del músculo ciliar (Llobet, 1999; Wiederholt, 1998; Wiederholt, 2000), los cambios en la matriz extracelular de la zona yuxtacanalicular (Mäepea, 1992), la formación de poros en la pared interna del canal de Schlemm (Ethier 1999), el stretch pasivo (Tumminia, 1998) y los cambios en la forma (Epstein, 1999) y volumen de las células trabeculares (Mitchell, 2002).

1.4.2.1. Propiedades contráctiles de la red trabecular

Las propiedades contráctiles de la red trabecular han sido estudiadas en tiras de tejido de 0.5 mm de grosor y 2-4 mm de longitud, montadas en un transductor isométrico, de manera que se mide la fuerza ejercida por la contracción de las tiras sin que existan cambios en la longitud del tejido (Lepple-Wienhues, 1991).

Varios agonistas colinérgicos como la acetilcolina, la pilocarpina o la aceclidina producen contracciones en tiras de tejido de manera dosis dependiente, las cuales parecen ser mediadas por receptores muscarínicos ya que son completamente inhibidas por atropina (Wiederholt, 1998). Así pues, las propiedades contráctiles de la red trabecular vienen determinadas en parte por receptores muscarínicos, probablemente del subtipo M_3 (Gupta, 1994).

La activación de receptores adrenérgicos modifica también las características contráctiles de la red trabecular, pudiéndose distinguir dos efectos. Por un lado, la activación de receptores Ω -adrenérgicos que provocan una contracción de la red. Tanto la activación de receptores Ω_1 (fenilefrina), como Ω_2 (brimonidina), producen este efecto con una potencia de contracción del 20% del efecto del carbacol. En contraposición, la activación de receptores Ω -adrenérgicos (isoproterenol) producen una relajación del tejido que ha sido pre-contraído con carbacol (Wiederholt, 1998). Otros compuestos como la endotelina-1 también producen contracción de la red trabecular.

Al quitar el calcio del medio extracelular, se produce una relajación reversible de las tiras de red trabecular previamente contraídas con carbacol o endotelina, aunque esta relajación no es del 100% como ocurre con tiras de músculo ciliar (Lepple-Wienhues, 1991). Esto es indicativo de que deben existir, además de una vía dependiente de Ca^{2+} , mecanismos independientes adicionales involucrados en la contracción de la red trabecular. En este sentido, en musculatura lisa se han visto contracciones independientes del Ca^{2+} extracelular (Marsault, 1990). Ciertos agentes contráctiles de la red trabecular, como la endotelina-1, el tromboxano A2 o la angiotensina II, inducen la activación de una Rho GTPasa (la RhoA) y la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC), indicando que las propiedades contráctiles de la red trabecular están reguladas, también en parte, por un mecanismo independiente de Ca^{2+} que comporta una reorganización del citoesqueleto de actomiosina (Rao, 2005). Esta contracción independiente de Ca^{2+} está modulada por la PKC- Ω cuyo funcionamiento es independiente de Ca^{2+} y la cual se encuentra expresada en la red trabecular (Thieme, 1999).

1.4.2.2. Antagonismo funcional red trabecular-músculo ciliar

Como se acaba de explicar, la red trabecular posee propiedades contráctiles. Aquellas sustancias capaces de contraer tiras de tejido trabecular (agonistas muscarínicos, agonistas Ω -adrenérgicos o endotelina) disminuyen la evacuación del humor acuoso en la perfusión de segmentos anteriores al incrementar la resistencia al paso del fluido. Por el contrario, las manipulaciones que relajan las tiras de tejido trabecular (disminución del Ca^{2+} extracelular, antagonistas de los canales de Ca^{2+} , agonistas Ω -adrenérgicos o activación del sistema NO/GMPc), aumentan la facilidad de evacuación disminuyendo la resistencia.

Sin embargo, está demostrado que la pilocarpina incrementa el flujo de humor acuoso mediante la contracción del músculo ciliar, aumentando la permeabilidad de la red trabecular (Wiederholt, 1998). Ya que se ha demostrado que los agentes colinérgicos y la endotelina (Erickson-Lamy, 1991) incrementan la facilidad de evacuación y disminuyen la IOP en ojos intactos, se ha postulado que el efecto de contracción directo que tienen estas sustancias sobre la red trabecular es antagónico al efecto de estas sustancias sobre el músculo ciliar.

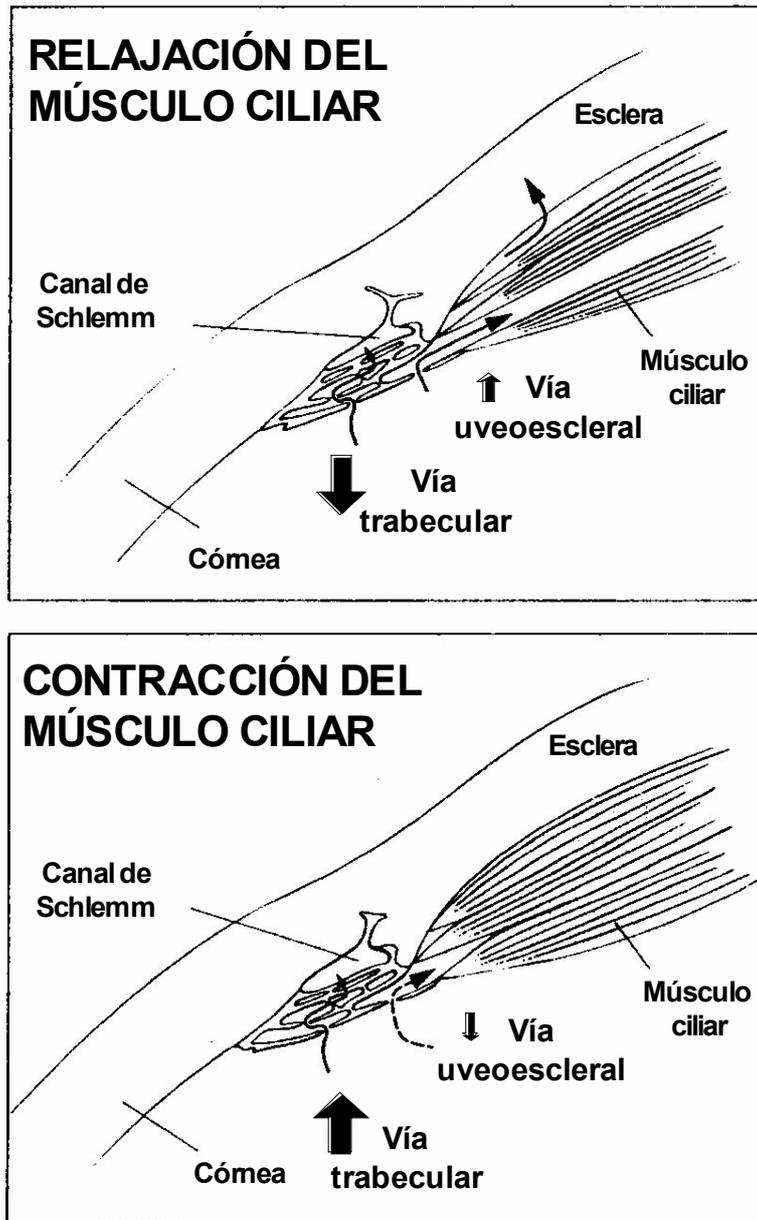


Figura 1.9. Esquema del efecto del músculo ciliar sobre la facilidad de evacuación. La relajación del músculo ciliar afecta a las vías trabecular y uveoescleral, siendo el efecto neto una disminución de la facilidad. La contracción del músculo ciliar produce un aumento neto de la facilidad debido a la mayor importancia en el drenaje por parte de la red trabecular. Modificado de Nilsson, 1994.

Muchas de las sustancias que afectan a la contractibilidad del músculo ciliar también ejercen efectos sobre la contractibilidad trabecular, aunque sea de manera cuantitativa o cualitativamente diferente (Wiederholt, 1998). El efecto neto de una droga sobre la facilidad de evacuación, vendrá determinado probablemente por el balance entre los efectos de contracción-relajación de la sustancia sobre el músculo ciliar y la red trabecular.

Se cree que los espacios de la red trabecular se ven disminuidos por la contracción de la misma red trabecular y agrandados por la tracción sobre la red debido a la contracción del músculo ciliar. En la mayoría de las ocasiones, la contracción del músculo ciliar domina probablemente sobre el efecto global de la facilidad de evacuación tanto en el modelo humano como el bovino. Un efecto exclusivo en una de las dos estructuras permitiría un mayor control de la modificación de la facilidad. Drogas capaces de relajar la red trabecular, sin mediar ningún efecto en el músculo ciliar, podrían ser instrumentos beneficiosos en la disminución de la IOP.

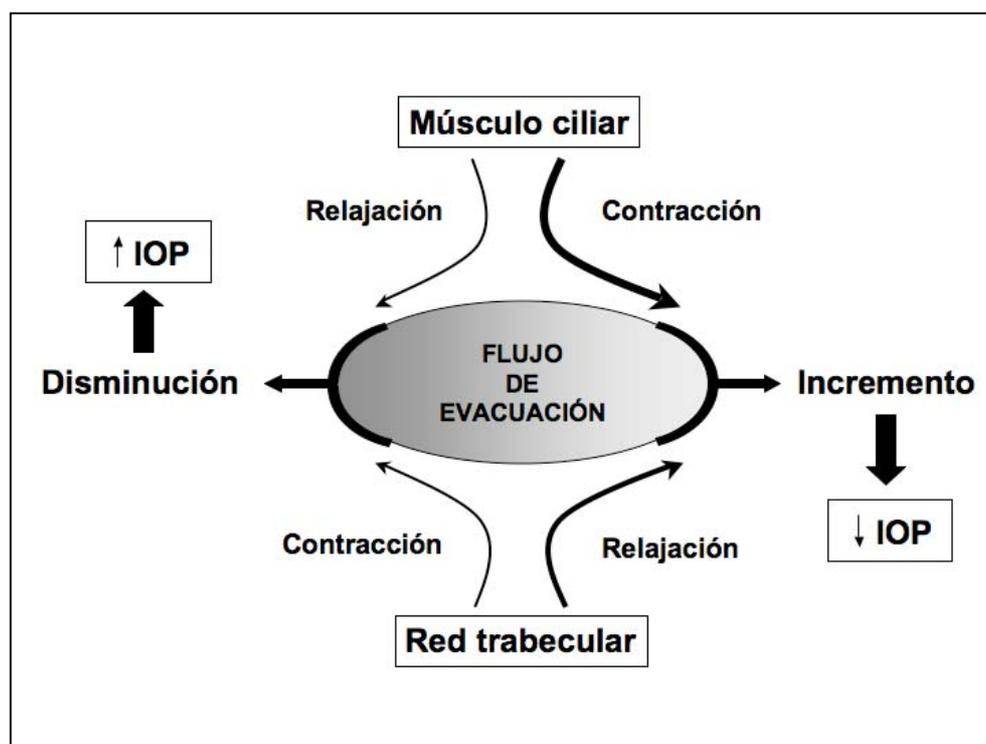


Figura 1.10. Modelo del antagonismo funcional entre la contracción del músculo ciliar y la red trabecular sobre la resistencia de evacuación del humor acuoso. Modificado de Wiederholt, 1998.

1.4.2.3. Cambios en la matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC), que junto con las células trabeculares forma parte de la red trabecular, se encuentra sujeta a la actividad de las propias células ya que son ellas las que producen y modifican todos los componentes de la matriz. La regulación de su síntesis contribuye al recambio de la MEC y puede, por lo tanto, ser un importante factor en la regulación de la facilidad de evacuación (Borrás, 2003). De hecho, se han observado acumulaciones excesivas de material de la MEC en la red trabecular de pacientes con POAG (Lütjen-Drecoll, 1986).

La composición y estructura de la matriz es distinta según la zona de trabéculo. La MEC de las regiones uveal y corneoescleral presenta láminas recubiertas de células y que poseen un núcleo central compuesto de fibras elásticas y de colágeno, envueltas en proteoglicanos como los glicosaminoglicanos condroitín sulfato y dermatán sulfato (Lütjen-Drecoll, 1999). La matriz extracelular de la región yuxtacanalicular está formada por una red elástica más densa, formada por gran variedad de macromoléculas como ácido hialurónico y otros glicosaminoglicanos, colágeno, fibronectina y otras glicoproteínas.

Dentro de las proteínas estructurales importantes hay que destacar la elastina, presente en la matriz de las diferentes regiones de la red trabecular. El colágeno supone la base estructural del armazón que conforma la red trabecular. La red trabecular presenta los tipos I, III, IV, V y VI (Marshall, 1991). La expresión de colágeno VI parece aumentar con los diferentes pases en células en cultivo (Tripathi, 1997), y se considera que el aumento de pases en cultivo imitaría a un modelo de envejecimiento, sugiriendo un aumento en la acumulación de colágeno con la edad. La expresión de colágeno está influenciada por diversos factores. El ácido ascórbico aumenta la expresión del colágeno de tipo I mientras que la dexametasona induce la del tipo IV y I (Borrás, 2003). La expresión de otras moléculas de la MEC como la laminina y la fibronectina se encuentra afectada por la dexametasona (Steely, 1992; Dickerson, 1998) o están sobreexpresadas en pases antiguos de células trabeculares en cultivo (Tripathi, 1997). Un exceso en la síntesis de fibronectina por las células trabeculares parece inhibir la permeabilidad celular pudiendo contribuir a la disminución de la facilidad asociada con el POAG (Li, 2004).

Las células trabeculares, además de la secreción de los componentes estructurales, se encargan de la síntesis y posterior liberación de gran variedad de enzimas que remodelan la MEC (Borrás, 2003). Entre los enzimas secretados se

encuentran metaloproteinasas (MMPs) e inhibidores proteicos de éstas. Dentro de estas enzimas secretables e importantes en la función de la red trabecular, encontramos la colagenasa (MMP-1), la gelatinasa A (MMP-2), la estromelsina (MMP-3), la gelatinasa B (MMP-9) y los inhibidores proteicos TIMP-1 y TIMP-2. La mayoría de estas proteínas son secretadas en bajas cantidades en condiciones basales y se ha visto que su secreción está afectada por diversos estímulos como la exposición a citoquinas, factores de crecimiento, condiciones de estrés o selenio (Conley, 2004). Cambios en la presión mecánica de la red trabecular similares a los que acontecen durante cambios en la IOP, inducen cambios en la actividad de diferentes metaloproteinasas. Existe un aumento en la producción de ciertos enzimas y una disminución en otros, pero en todos los trabajos queda claro el aumento de la producción de MMP-2 con la presión (WuDunn, 2001; Bradley 2001). A su vez, las MMPs y sus enzimas parece ser que juegan un papel más importante en el mantenimiento de la función fisiológica de la célula y la red trabecular ya que la síntesis y secreción de la gran mayoría de estas enzimas no parece alterarse de manera significativa frente a factores que son relevantes en el glaucoma como son el TGF β o la dexametasona (Bradley, 1998).

La proteína miocilina, producto del gen MYOC y cuya función hasta el momento es desconocida, parece ser importante dentro de la homeostasis de la red trabecular. Se trata de una proteína que es secretada en condiciones normales por parte de las células trabeculares y parece interactuar con elementos de la MEC. Se cree que la deposición de grandes cantidades de esta proteína en la red trabecular podría producir una elevación de la IOP. Por otro lado se ha asociado la mutación del gen que codifica para esta proteína con POAG (Stone, 1997).

Estudios recientes han demostrado la asociación de la coclina, una proteína conocida como la causante de un desorden de sordera, con glaucoma, a través de una actuación sobre la MEC (Bhattacharya, 2005). En la red trabecular, esta proteína está ausente en condiciones normales, pero se ha visto su presencia en glaucoma. Además, en ratones DBA/2J glaucomatosos, la proteína se expresa previamente al aumento de la IOP únicamente en aquellos que aumentan la IOP. Parece ser que la coclina alteraría la estructura de la matriz de la red, haciendo a componentes de ésta más susceptibles a la degradación y al colapso.

1.4.2.4. El citoesqueleto de actina y las uniones celulares

Las células trabeculares y del endotelio del canal de Schlemm poseen microfilamentos de actina y propiedades contráctiles (de Kater, 1992; Lepple-Wienhues, 1991). Además, en la zona yuxtacanalicular de la red trabecular, lugar dónde la resistencia al paso de líquido es la mayor de toda la estructura trabecular, las células se encuentran en íntimo contacto a través de procesos citoplasmáticos. No es sorprendente dada esta disposición, que aquellas alteraciones que afecten las uniones intercelulares y las propiedades contráctiles produzcan variaciones en la forma de las células produciendo un aumento de la facilidad.

Numerosos estudios han demostrado que los compuestos que afectan la estabilidad del citoesqueleto de actina son capaces de aumentar el flujo de evacuación de humor acuoso. Tanto la latrunculina-A (LatA) como la latrunculina-B aumentan la facilidad de evacuación y disminuyen la IOP (Peterson, 1999; Okka, 2004). La citocalasina D aumenta la facilidad de evacuación y causa ruptura de la pared interna del canal de Schlemm en humanos (Johnson, 1997). El compuesto swinholida-A también incrementa la salida de humor acuoso (Tian, 2001). Experimentos realizados en nuestro laboratorio muestran que interferencias en la dinámica de polimerización del citoesqueleto de actina aumentan el flujo de evacuación de humor acuoso (Gasull, 2005). La aplicación terapéutica de estos compuestos podría ser interesante, y más si tenemos en cuenta que se ha demostrado que LatA a bajas dosis es capaz de prevenir los efectos de la dexametasona sobre el citoesqueleto de actina en células trabeculares (Liu, 2003).

Se ha visto que drogas que afectan a la función acto-miosina de las células trabeculares o del canal de Schlemm, pueden producir una pérdida secundaria de la estructura del citoesqueleto de actina e inducir cambios en la forma celular, así como en las uniones entre células, aumentando la facilidad de evacuación (Epstein, 1999). La proteína quinasa C (PKC), igual que la proteína de la cadena ligera de la miosina (MLC) fosforilada por la PKC, juegan un importante rol modulando la actividad del citoesqueleto de actina. Variaciones en la actividad de la PKC muestran efectos directos sobre la facilidad de evacuación y las características morfológicas y del citoesqueleto de las células. El inhibidor de la PKC, H-7, aumenta la facilidad de evacuación afectando a la red trabecular (Tian, 1999) y sus efectos sobre el citoesqueleto parecen estar acentuados en la pared interna del canal de Schlemm y en la zona yuxtacanalicular (Sabanay, 2004). Sin embargo, los resultados no son claros, ya que tanto el uso de activadores como

inhibidores de la PKC parecen aumentar el flujo de evacuación (Khurana, 2003). La inhibición de la MLC parece tener un efecto más claro resultando en un aumento del flujo de evacuación (Rao, 2005).

La vía de señalización de la RhoA/ROCK, la cual está involucrada en cambios en el citoesqueleto, se encuentra presente en las células de la red trabecular. Las acciones de la RhoA son llevadas a cabo, en parte, por la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC), la cual provoca en células no musculares la contracción de la actomiosina. El RNAm de la proteína RhoA es muy abundante en las células de la red trabecular (Thieme, 2000) y la inactivación del gen en las células trabeculares produce cambios importantes en la morfología celular que parecen reflejar una relajación (Vittitow, 2002). Las células de la pared interna del canal de Schlemm se ven también afectadas por la inactivación del gen RhoA, mostrando un aumento en su separación (Rao, 2001). En este sentido, la activación de la vía de la Rho kinasa disminuye la facilidad de evacuación (Mettu, 2004), mientras que por el contrario, la inhibición de la función de la proteína RhoA provoca un aumento en la facilidad de evacuación (Vittitow, 2002).

Los quelantes de Ca^{2+} (EGTA y EDTA) son capaces de romper las uniones intercelulares, habiéndose realizado estudios en los que se demuestra que el EDTA logra incrementar el paso de fluido a través del canal de Schlemm (Burke, 2004).

1.4.2.5. Regulación del volumen

Dentro de los posibles mecanismos implicados en la regulación de la facilidad de evacuación que han sido estudiados, el volumen de las células trabeculares se ha postulado como un mecanismo para modular la permeabilidad del tejido.

Se ha demostrado que los estímulos que producen un aumento del volumen de las células trabeculares disminuyen la facilidad de evacuación, mientras que aquellos que disminuyen el volumen de las células, incrementan dicha facilidad (Gual, 1997; Al-Aswad, 1999). Un ejemplo claro son las variaciones en la facilidad de evacuación frente a cambios en la osmolaridad del medio en experimentos de perfusión de segmentos anteriores bovinos (Gual, 1997). En este estudio la perfusión con medio hipotónico, el cual aumenta el volumen celular y disminuye posiblemente la permeabilidad del tejido, disminuye la facilidad de evacuación, mientras que la perfusión con medio hipertónico la aumenta.

Las células trabeculares poseen una gran actividad del sistema cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, cuya función principal es la de regulación del volumen intracelular. Este cotransportador es inhibido por el ácido etacrínico y la bumetanida, lo que conlleva una reducción del volumen de las células trabeculares (O'Donnell, 1995). A nivel de tejido, el ácido etacrínico incrementa la facilidad de evacuación y disminuye la IOP en humanos y monos (Croft, 1994; Liang, 1992). La bumetanida también aumenta la facilidad de evacuación en ojos humanos y bovinos, sin embargo existen estudios previos en los que la inhibición del cotransportador con bumetanida no produce efecto alguno sobre la facilidad de evacuación (Gabelt, 1997), pudiendo ser estas diferencias atribuibles al uso de distintas técnicas experimentales. Finalmente, sustancias que activan el cotransportador como la vasopresina disminuyen la facilidad (Al-Aswad, 1999).

A pesar de estos estudios que muestran que el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ juega un papel importante en la regulación de la red trabecular controlando el volumen celular, hay otros mecanismos que tienen una función crucial en esta regulación. Esto se basa en el hecho que, a pesar de que la actividad del cotransportador se encuentra reducida en células glaucomatosas, el volumen intracelular de las células trabeculares es más grande en condiciones normales (Putney, 1999b). Las células trabeculares disponen del mecanismo antiporte Na^+/H^+ (Chu, 1992) cuya inhibición produce una disminución del volumen celular (Mitchell, 2002). Este mecanismo antiporte podría funcionar en paralelo con un intercambiador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ para regular el volumen, al igual que en las células pigmentadas del epitelio ciliar (Counillon, 2000), y parece ser el mecanismo predominante en condiciones fisiológicas de HCO_3^- (Mitchell, 2002). El bloqueo del intercambiador Na^+/H^+ disminuye la IOP en ratón (Avila, 2002), siendo esta disminución debida en parte a una actuación sobre células del epitelio ciliar (Counillon, 2000), aunque principalmente por un aumento en la facilidad de la evacuación del humor acuoso (Avila, 2003).

Las células de la red trabecular disponen también de otros mecanismos iónicos que les confieren la capacidad de regular el volumen celular tras un aumento de volumen, mediante el mecanismo conocido como *regulatory volume decrease* (RVD) (Mitchell, 2002). Este proceso implica la activación de diferentes canales iónicos que permiten la salida de iones y agua fuera de la célula, de manera que el volumen celular inicial vuelve a quedar reestablecido (Okada, 2001). En las células trabeculares el RVD está mediado en parte por la participación de un canal de cloruro activado por volumen, un canal de K^+ , muy probablemente el BK_{ca} y posiblemente un simporte K^+/Cl^- (Mitchell, 2002). Otros autores hallan resultados muy similares en los que el RVD activa corrientes aniónicas reguladas

por volumen (VRAC) y sostienen que el RVD mostrado por las células trabeculares podría estar limitado por la corriente de K^+ que acompaña a la de Cl^- en el proceso de disminución del volumen (Srinivas, 2004). La actividad de los canales de K^+ y Cl^- se ve estimulada por la activación de receptores de adenosina presentes en la red trabecular (A_1 , A_{2A} y A_3) que participan en la disminución del volumen celular (Fleischhauer, 2003).

Algunos mensajeros intracelulares, como el AMPc, parecen estar relacionados en los cambios de volumen trabeculares. El aumento de AMPc producido por la forskolina y el isoproterenol provoca una disminución del volumen celular tanto en condiciones isotónicas como hipotónicas (Srinivas, 2004), hecho que concuerda con el incremento de la facilidad de evacuación provocado por las sustancias que aumentan el AMPc, como la epinefrina, forskolina o la isobutilmetilxantina (Erickson-Lamy, 1992; Gilabert, 1997). Este segundo mensajero está estrechamente relacionado con la regulación de canales iónicos y transportadores (Nilius, 2001), de manera que podría modular canales involucrados en el RVD. Sin embargo, no parece que active los canales de cloruro relacionados con el RVD en la red trabecular puesto que el AMPc disminuye el volumen celular en condiciones isotónicas, en las cuales estos canales no se encontrarían activados (Srinivas, 2004).

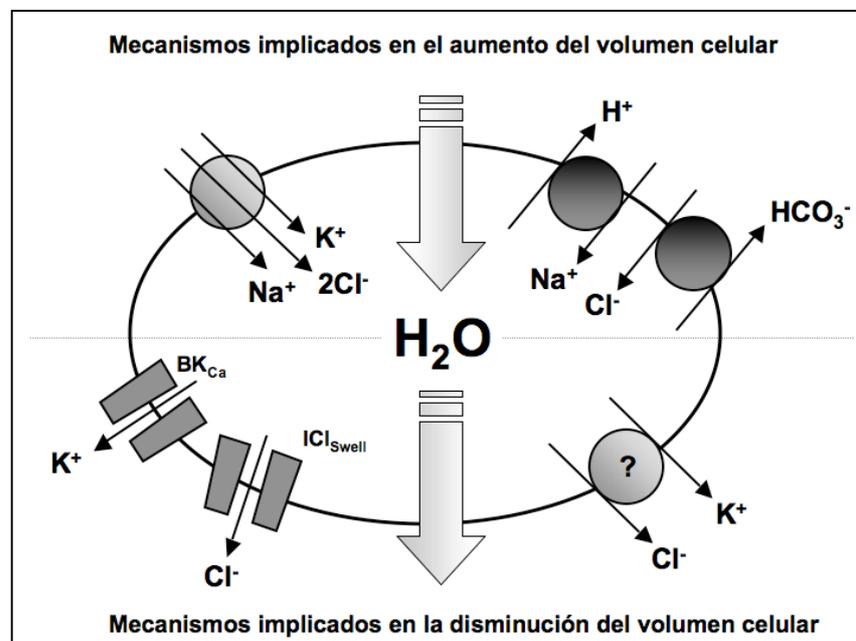


Figura 1.11. Transportadores y canales iónicos involucrados en la regulación del volumen de las células trabeculares.

1.5. Señalización purinérgica

1.5.1. Receptores purinérgicos

Las purinas extracelulares (adenosina, ADP y ATP) y pirimidinas (UDP, UTP) son moléculas señalizadoras importantes que median diferentes efectos biológicos. Dentro de la gran diversidad de efectos ejercidos por las purinas y pirimidinas extracelulares cabe destacar la contracción del músculo liso, la neurotransmisión (tanto en el sistema nervioso central como periférico), la secreción endocrina y exocrina, la respuesta inmune, la inflamación, la agregación plaquetaria, el dolor y la modulación de la función cardíaca (Ralevic 1998).

La procedencia de estas moléculas extracelulares es diversa y variada. El ATP está considerado como un importante neurotransmisor o cotransmisor en el sistema nervioso, dónde es liberado por los terminales nerviosos. Se ha visto, asimismo, una gran diversidad de células no excitables capaces de liberar compuestos purinérgicos (plaquetas, mastocitos, eritrocitos, leucocitos, miocitos, fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales), tanto en condiciones fisiológicas como fisiopatológicas. También se han detectado fuentes de liberación de pirimidinas, como el UTP, que puede ser liberado por estímulos fisiológicos por células endoteliales, epiteliales o de astrocitoma (Lazarowski, 2001). Además de las purinas y las pirimidinas se ha descrito también la liberación de dinucleótidos de adenina, los cuales son secretados por diferentes tipos celulares como trombocitos, células cromafines y neuronas, y representan una clase de moléculas señalizadoras relativamente nueva.

Las purinas y pirimidinas median sus efectos gracias a la interacción con diferentes receptores de membrana denominados receptores purinérgicos. Existen dos familias principales de receptores para estos compuestos, receptores P1 para adenosina y receptores P2 que reconocen, principalmente, ATP, ADP, UTP y UDP. Más recientemente se ha descrito la existencia de un nuevo tipo de receptor, el P4, activado específicamente por dinucleótidos y de carácter ionotrópico (Pintor, 1995).

1.5.1.1. Receptores P1

La familia de receptores de adenosina (P1) está formada por cuatro miembros: A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, todos ellos acoplados a proteínas G.

El receptor A₁ media un amplio rango de respuestas fisiológicas que parece que están causadas por el acoplamiento a diferentes proteínas G de la familia de las G_{i/o}, mediante la inhibición de la adenilato ciclasa (AC). Se encuentra ampliamente distribuido en muchas especies y gran número de tejidos, mediando gran diversidad de procesos biológicos. El receptor A_{2A} está acoplado a proteína G_s y por lo tanto su activación produce un incremento del AMPc. El A_{2B} está acoplado a diferentes vías de señalización. Por un lado promueve la activación de la AC y por otro activa la vía de la PLC, con generación de IP₃ y aumento de Ca²⁺ intracelular. Este tipo de receptor se encuentra en casi todas las células de muchas especies, sin embargo, el número de receptores es bajo y se necesitan altas concentraciones de adenosina para producir una respuesta. El receptor A₃ se encuentra acoplado a proteínas G tanto inhibitorias de la AC (G_i) como estimuladoras de la PLC (G_{q/11}). Este receptor está ampliamente distribuido, pero su función fisiológica es bastante desconocida.

1.5.1.2. Receptores P2

Los receptores del tipo P2 se dividen en dos grandes grupos, dependiendo de si son canales iónicos (P2X) o receptores acoplados a proteínas G (P2Y). Hasta la fecha se han descrito siete receptores P2X en mamífero (P2X₁₋₇) y ocho receptores P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) han sido clonados, caracterizados y aceptados como miembros de la familia de los P2Y (Ralevic, 1998; Abbracchio, 2003; Nicholas, 2001; Fumagalli, 2004).

Los receptores P2 tienen un amplio espectro de ligandos naturales, tales como el ATP, ADP, UTP, UDP y los diadenosín polifosfato. Aunque por el momento no existen agonistas o antagonistas que discriminen adecuadamente entre subtipos de receptores, hay algunos compuestos que pueden ser útiles en esta discriminación. Los análogos estables del ATP, como el $\Omega\Omega$ meATP y el $\Omega\Omega$ meATP, implican activación de receptores P2X, ya que generalmente son inactivos sobre P2Y. Otros compuestos como el ADP,

adenosina 5'-O-(2-thiodifosfato)(ADP α S) ó el UTP, ejercen una función agonista sobre ciertos receptores P2Y, mientras que frente a los receptores P2X se muestran inactivos (Ralevic, 1998). De la misma manera, los antagonistas no son capaces de discriminar demasiado bien entre receptores P2X y P2Y.

1.5.1.2.1. Receptores P2X

Los receptores P2X son canales iónicos activados por la unión con el ligando ATP. Dichos canales median el paso rápido de iones (dentro de un periodo de 10 ms) y su permeabilidad es catiónica no selectiva con una mayor permeabilidad por el Ca²⁺ respecto al Na⁺. Esta rápida entrada de iones en la célula (principalmente Ca²⁺) produce una despolarización de la membrana y la activación de canales de calcio voltaje dependientes. Este tipo de respuesta es muy rápida ya que la transducción de señal no depende de segundos mensajeros. Por esta razón, los P2X están distribuidos en gran cantidad de células excitables (células musculares lisas, neuronas y glía) y median respuestas sinápticas excitadoras rápidas tanto en el sistema nervioso central como el periférico. Se han clonado siete proteínas P2X (P2X₁ a P2X₇), las cuales se unen dando como resultado canales iónicos homoméricos. Las subunidades P2X disponen de dos segmentos de transmembrana unidos por un segmento extracelular. Una sola subunidad no es capaz de formar el canal iónico. Se cree que los receptores P2X se asocian en tres subunidades o en múltiples de tres subunidades (Ralevic, 1998).

1.5.1.2.2. Receptores P2Y

Los receptores P2Y son receptores para purinas y pirimidinas que se encuentran acoplados a proteínas G y disponen de una estructura terciaria con siete segmentos transmembrana (Ralevic, 1998). La gran mayoría de receptores P2Y están acoplados a una proteína G que activa la fosfolipasa C (PLC) permitiendo la formación de IP₃ y la movilización de Ca²⁺ intracelular. Sin embargo, han sido descritos receptores P2Y acoplados al sistema AC.

P2Y₁

El mecanismo de transducción utilizado por este receptor es la activación de la PLC Ω mediante una proteína G_{q/11} insensible a la toxina colérica y pertusis. La formación de IP₃ y la movilización de Ca²⁺ pueden estimular gran variedad de señales entre las cuales se incluyen PKC, PLA₂, canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ o formación de NOS. El DAG formado es capaz de estimular la PKC que puede activar una PLD, la vía de las MAP kinasas o la entrada de Ca²⁺ a través de canales de Ca²⁺ voltaje dependientes. Una segunda vía señalizadora de los receptores P2Y₁ sería la inhibición de la AC. Las dos vías se expresan de manera independiente, de manera que la activación de la PLC vía P2Y₁ no coincide con inhibición de la AC tras la estimulación del mismo receptor.

Los ligandos capaces de estimular este subtipo de receptor son el ADP, ATP y ciertos compuestos de diadenosina polifosfato. El receptor P2Y₁ parece mostrarse más sensible a los nucleótidos de adenina difosfatos que a los trifosfatos. Sin embargo la sensibilidad al ATP es variable. El receptor es estimulado en gran medida por los siguientes agonistas: 2-Me-SATP, ADP, ADP Ω S, ADP Ω F. El 2-Me-SADP es un potente agonista de este receptor y supone una herramienta útil en la caracterización de receptores P2Y₁. El receptor no es activado por nucleótidos de pirimidina como el UDP o UTP, de la misma manera que no es estimulado por derivados purinérgicos como $\Omega\Omega$ meATP o $\Omega\Omega$ meATP. Por último, ciertos dinucleótidos polifosfatos, en especial aquellos con una cadena de tres fosfatos o menos, se presentan como agonistas naturales de esta subtipo de receptor (Pintor, 1996).

Dentro de los antagonistas no selectivos del receptor encontramos el PPADS, que generalmente bloquea los P2Y₁ acoplados a PLC pero no los acoplados a AC. El MRS2179, antagonista específico del subtipo P2Y₁, ha sido durante mucho tiempo el antagonista P2Y₁ más potente, sin embargo, recientemente se ha descrito el MRS2500 (Cattaneo, 2004).

El receptor P2Y₁ se encuentra ampliamente distribuido habiendo sido descrito en corazón, tejido vascular, conectivo, inmune y neural. En el endotelio vascular y en las células de la musculatura lisa de los vasos implica al receptor en la regulación del tono vascular. En la mayoría de las venas, el P2Y₁ presente en el endotelio media vasodilatación por la activación de la NOS dependiente de Ca²⁺.

P2Y₂

El receptor P2Y₂ se encuentra acoplado a proteínas G_{i/o} y G_{q/11} y media la movilización de Ca²⁺ vía PLC Ω , efecto que puede ser toxina pertusis sensible, parcialmente sensible o insensible. Los P2Y₂ acoplados a una proteína G_i involucran en su sistema de señalización una subunidad $\Omega\Omega$ de la proteína G_i, la cual estimularía formación de IP₃ vía PLC- Ω_2 , movilización de Ca²⁺ y una variedad de vías de señalización entre las que se incluyen PKC, PLA₂, canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ y formación de NO (Ralevic, 1998). Secundariamente a la activación de la PLC y la movilización de Ca²⁺ intracelular, el receptor P2Y₂ media la apertura de canales de Cl⁻ sensibles a Ca²⁺ en epitelio pulmonar, líneas celulares de epitelio biliar y células de las glándulas de la sal de aves, donde se modula la secreción de fluido. La activación del receptor P2Y₂ estimula corrientes catiónicas y de K⁺ vía mecanismos dependientes de Ca²⁺ en células de una línea celular de hígado de rata (Ralevic, 1998). Receptores P2Y₂ median la inhibición de la AC en ciertas células, pero esto ocurriría de manera secundaria a un aumento de la [Ca²⁺]_i. Incrementos en GMPc también han sido publicados, aunque también de manera secundaria al aumento de Ca²⁺ (Reiser, 1995).

Los ligandos naturales para el subtipo de receptor purinérgico P2Y₂ son el ATP y el UTP, activándose el receptor aproximadamente con la misma potencia por ambos agonistas. El P2Y₂ es insensible o responde de manera muy débil al ADP y otros nucleótidos difosfato, 2-MeS-ATP y $\Omega\Omega$ meATP. El UTP- Ω S se muestra equipotente con el UTP y ATP. El ATP- Ω S se comporta como agonista del receptor, aunque su potencia es algo menor que la del ATP o UTP. El Ap₄A se comporta como un potente agonista en P2Y₂ recombinantes, siendo comparable al ATP y UTP (Lazarowski, 1995). Algunos derivados pirimidínicos de reciente síntesis se han mostrado como buenos agonistas del receptor P2Y₂, como el Up₄U (INS365) o el Cp₄U (INS37217), el cual se ha propuesto como compuesto en el tratamiento de enfermedades como la fibrosis quística ya que estimula el transporte de fluido (Yerxa, 2002).

No hay antagonistas selectivos para el receptor P2Y₂. Tanto la suramina como el PPADS actúan como antagonistas en ciertas subpoblaciones del receptor. Respecto al PPADS, se han descrito P2Y₂ insensibles y otros sensibles según el tejido. Estas diferencias en la sensibilidad a los antagonistas no son debidas al tipo de proteína G acoplada al receptor. A pesar de esta diferente respuesta, no existen evidencias moleculares que apoyen la subdivisión de receptores P2Y₂ (Ralevic, 1998).

La distribución de los P2Y₂, al igual que la de los P2Y₁, es amplia aunque poco se sabe de su significado biológico. El P2Y₂ está presente en gran variedad de células y tejidos incluyendo astrocitos, diferentes tipos de células sanguíneas, células cromafines, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, hepatocitos, keratinocitos, miocitos, osteoblastos, células Ω -pancreáticas, células pituitarias y células tumorales (Ralevic, 1998). En los vasos los P2Y₂ están generalmente presentes en el endotelio, dónde estimulan la síntesis y liberación de prostaciclina y NO, lo cual permite una vasodilatación. Se han descrito receptores en la mucosa nasal cuya activación produce un aumento en la secreción, probablemente vía canales de Cl⁻ dependientes de Ca²⁺. Su presencia en epitelios como el bronquial y pulmonar es generalizada, desempeñando una función de secreción de ión cloruro y de líquido (Kellerman, 2002).

P2Y₄

El P2Y₄ humano es más selectivo para el UTP que para el ATP y no es activado por nucleótidos difosfato. Parece estar acoplado a dos proteínas G diferentes; una proteína G_i y una G_{q/11}. El receptor humano no es bloqueado por suramina y existen datos contradictorios respecto al PPADS. El receptor P2Y₄ clonado a partir de rata presenta una importante diferencia con respecto a su homólogo humano: es activado de manera equipotente por el ATP y el UTP. El ADP, ATP- Ω S, 2-MeS-ATP y Ap₄A, son también equipotentes a pesar de ser agonistas parciales. Con respecto a la sensibilidad por el ATP y UTP, el P2Y₄ muestra el mismo perfil descrito para el receptor P2Y₂.

P2Y₆

El receptor P2Y₆ es activado de manera potente por el UDP, siendo su activación por UTP, ATP, ADP o 2-MeS-ATP muy débil o nula. Otros dinucleótidos actúan como agonistas del receptor con menor afinidad. El MRS2578 es un nuevo agonista selectivo para el receptor sin actividad sobre otros receptores P2Y. La insensibilidad a la toxina pertúsica indica que se encuentra acoplado a una proteína G_{q/11}. El RNAm del P2Y₆ se ha encontrado de manera abundante en varios tejidos de rata entre los que se incluyen placenta, timo, pulmón, estómago, intestino, bazo, mesenterio y aorta. En células epiteliales, la presencia del receptor se circunscribe a la superficie apical de dichas células (Ralevic, 1998).

P2Y₁₁

El P2Y₁₁ posee una característica que lo hace único dentro de la familia de los P2Y: se encuentra acoplado al sistema fosfoinositol y al sistema AC. El ATP se presenta como el agonista nativo más potente siendo su potencia muy superior a la del ADP. Estudios recientes han demostrado que el UTP es un agonista del P2Y₁₁ con una potencia y respuesta igual a la del ATP, que sería capaz de movilizar Ca²⁺ por una vía independiente de la formación de IP₃ (White, 2003).

P2Y₁₂

El receptor presente en plaquetas y también conocido como *P2Y_{ADP}* o *P_{2T}*, se encuentra acoplado a una proteína G_i que produce inhibición de AMPc. Además se ha visto que el P2Y₁₂ produce efectos como la inhibición de canales de Ca²⁺ tipo N o la activación de canales de K⁺ *inward rectifier*. Estos efectos parecen estar mediados por la liberación de la subunidad ΩΩ de la proteína G.

El receptor presenta como agonista natural el ADP. Compuestos como el 2-MeS-ADP, 2-cloroADP se comportan como agonistas potentes, mientras que el ADPΩΩ o el ADPΩS son agonistas parciales. Otros compuestos purinérgicos como 2Cl-ATP, ΩΩ meATP, Ap₄A, Ap₅A o Ap₆A, se muestran como antagonistas competitivos. El antagonista más potente del P2Y₁₂ es el AR-C67085.

El P2Y₁₂ se encuentra en plaquetas, donde su papel es el de mediar la agregación plaquetaria durante la trombosis. Se ha visto su expresión en células endoteliales y en musculatura lisa vascular, donde estimula la contracción de los vasos.

P2Y₁₃

El P2Y₁₃ se encuentra acoplado a una proteína G_i y responde a los nucleótidos difosfato de adenina. Tanto el ADP como el 2-MeS-ADP se presentan como agonistas equipotentes en cuanto a la capacidad de generar IP₃. El ATP y 2-MeS-ATP se muestran como agonistas débiles del receptor P2Y₁₃ y otros agonistas como el ΩΩ meATP, ΩΩ meATP, UTP, o UDP-glucosa, no son activos. Los efectos del ADP son antagonizados

por suramina, RB-2, PPADS, pero no por el antagonista selectivo de P2Y₁, el MRS2179. El antagonista más potente conocido para el P2Y₁₃ es el ARC69931MX.

Hasta el momento se conoce poco sobre el papel fisiopatológico del receptor P2Y₁₃, aunque se han sugerido roles importantes en los sistemas nervioso e inmune.

P2Y₁₄

Este receptor es el miembro más joven de la familia de los P2Y (Abbracchio, 2003). El P2Y₁₄ responde a nucleótidos glicosilados como UDP-glucosa, UDP-galactosa, UDP-glucurónico y UDP-N-acetil-glucosamina. Dicho receptor no muestra respuesta frente a otros agonistas tales como ATP, ADP, UTP, UDP u otros nucleótidos, dinucleótidos, nucleósidos o nucleótidos glicosilados, lo que demuestra un perfil farmacológico diferente al resto de receptores P2Y. La toxina pertusis suprime completamente la respuesta del receptor a los distintos agonistas, lo cual indica que se encuentra acoplado a una proteína G_{1/o}, aunque las vías de transducción utilizadas por el receptor no han sido todavía vislumbradas. Respecto a su función, hasta el momento se ha hipotetizado su papel en infección e inflamación en tejido nervioso.

1.5.2. Señalización purinérgica en el ojo

1.5.2.1. Receptores purinérgicos en los tejidos oculares

El ojo es un órgano rico en receptores purinérgicos P1 y P2, activados por compuestos naturales presentes en el ojo como el ATP o la adenosina. Las funciones que estos receptores ejercen son, en ocasiones, cruciales para el correcto funcionamiento de las diferentes estructuras del ojo. Los distintos tejidos oculares varían en cuanto a los receptores que expresan, pero es un hecho común a todos ellos la presencia de receptores purinérgicos (Pintor, 1999).

1.5.2.1.1. Conjuntiva

En la conjuntiva, el papel desempeñado por los receptores P2 parece centrarse en la hidratación de esta estructura. En estudios realizados en conejos se demuestra que el epitelio conjuntival posee receptores P2Y₂ cuya activación aumenta la secreción neta de iones cloruro y fluido desde la capa serosa a la mucosa (Li, 2001; Murakami, 2004). Este mismo receptor regula la secreción de mucina en conjuntiva de humanos (Jumblatt, 1998). El receptor P2Y₄ también ha sido involucrado en procesos de flujo de iones a través de la conjuntiva (Hosoya, 1999).

1.5.2.1.2. Córnea

La córnea es una estructura altamente innervada a la cual llegan gran cantidad de fibras nerviosas sensoriales, adrenérgicas y colinérgicas. Presenta cierta cantidad de terminales nerviosos positivos para la tinción con quinacrina, lo cual sugiere la presencia de ATP como neurotransmisor. Así pues, es posible que ciertas cantidades de ATP sean liberadas a dicho nivel tras la estimulación nerviosa (Pintor, 1999).

Tanto a nivel del epitelio corneal como del endotelio corneal existen diferentes tipos de receptores metabotrópicos purinérgicos P2Y. Estudios funcionales demuestran la presencia de receptores P2Y en el epitelio corneal (Kimura, 1999; Kubo-Watanabe, 2003). La expresión de distintos P2Y (1,2,4,6) en epitelio corneal ha sido confirmada posteriormente (Pintor, 2004a), siendo el subtipo P2Y₂ el más abundante (Cowlen 2003). La activación de receptores P2Y a este nivel parece estar también involucrada en procesos de reparación de erosiones corneales, ya que agonistas purinérgicos activan la vía de las MAP Kinasas, la cual controla la tasa de migración de células epiteliales (Pintor 2004b). En el endotelio corneal parece ser que coexisten varios subtipos de receptores P2Y (Srinivas 1998) y la activación de estos receptores regula la proliferación celular (Cha 2000).

Se ha demostrado también la existencia de receptores de adenosina del tipo A₂ en el epitelio corneal cuya estimulación provoca, vía AMPc, un aumento en la conductancia para el ión cloruro (Pintor, 1999). Así pues la adenosina formada a partir de la hidrólisis del ATP liberado por los terminales nerviosos a nivel de la córnea, podría estar involucrada también en la homeostasis de la córnea.

1.5.2.1.3. Iris

El iris está innervado por fibras colinérgicas derivadas del nervio oculomotor que, al ser activadas, producen a nivel del esfínter del iris una constricción. Sin embargo, esta parte del iris está también innervada por terminales procedentes del nervio trigémino los cuales poseen el ATP como neurotransmisor (Pintor, 1999). La aplicación de diferentes agonistas purinérgicos produce contracciones del músculo del iris, de igual manera que ocurre al estimular terminales colinérgicos, involucrando de esta forma receptores P2X en dicha contracción. Estudios funcionales manifiestan la existencia en el iris de receptores P2Y (Fuder, 1993), confirmándose en estudios en los que se demuestra la presencia de P2Y₁, P2Y₂ y P2Y₄, siendo este último el más abundante (Pintor, 2004a).

1.5.2.1.4. Cuerpo ciliar y procesos ciliares

El cuerpo ciliar supone otro tejido ocular donde el ATP y sus derivados ejercen acciones importantes en la fisiología ocular a través de la activación de receptores específicos. Las células del epitelio ciliar (pigmentadas y no pigmentadas) que recubren esta estructura son capaces de sintetizar y secretar gran cantidad de agentes reguladores con funciones autocrinas y paracrinas (Coca-Prados, 1999), como el ATP y la adenosina. Las células epiteliales del cuerpo ciliar son capaces de liberar ATP en respuesta a estímulos osmóticos, mecánicos o bioquímicos (Mitchell, 1998), y la presencia de nucleotidasas en la superficie de estas células permite la aparición del producto de degradación del ATP, la adenosina, la cual es capaz de estimular receptores específicos.

De hecho, la adenosina ejerce efectos probados sobre el epitelio ciliar. La totalidad de los receptores de adenosina descritos hasta el momento se encuentran presentes en el epitelio ciliar. El subtipo A₃, presente en células del epitelio ciliar humano y de conejo, se ha relacionado con la activación de canales de cloro (Mitchell, 1999). Los subtipos A₁, A_{2A} y A_{2B} han sido descritos a nivel de RNAm (Kvanta, 1997). Cabe destacar que se ha visto que la adenosina potencia, de manera sinérgica y vía receptores A₁, la respuesta de las células del epitelio ciliar a la acetilcolina en cuanto a la capacidad para movilizar Ca²⁺ intracelular (Farahbakhsh, 1997).

El epitelio ciliar de conejo también responde al ATP extracelular generando IP₃ e incrementando sus niveles de Ca²⁺ intracelular tanto en células pigmentadas como en no

pigmentadas (Suzuki, 1997). Estudios realizados en epitelio ciliar bovino parecen indicar que los aumentos de Ca^{2+} e IP_3 citoplasmáticos son mediados por el subtipo de receptor P2Y_2 tanto en células pigmentadas como no pigmentadas de dicho epitelio (Shahidullah, 1997). Este mismo receptor se ha descrito en epitelio ciliar humano, donde el ATP actúa como una potente señal en la secreción (Cullinane, 2001). Posteriores estudios funcionales amplían la presencia de receptores purinérgicos, describiéndose en epitelio ciliar de conejo además del P2Y_2 el subtipo P2Y_1 cuya activación movilizaría Ca^{2+} vía IP_3 de manera diferente (Farahbakhsh, 2002). La presencia de receptores P2Y no queda restringida a los subtipos P2Y_1 y P2Y_2 ; se han descrito RNAm para el P2Y_6 y P2Y_{12} (Farahbakhsh, 2003) y expresión del P2Y_4 (Pintor, 2004a). La activación de estos receptores metabotrópicos puede incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ además de la formación de PGE_2 y AMPc. Esta combinación produce la activación de canales de cloruro lo cual reduce la formación de humor acuoso y disminuye la presión intraocular (Fleischhauer, 2001). La existencia de receptores P2X en esta estructura es hasta el momento desconocida.

1.5.2.1.5. Cristalino

La lente o cristalino es una estructura que contiene grandes cantidades de nucleótidos, aunque varía según las especies. El ATP es siempre el nucleótido más representativo, seguido del ADP y otros nucleótidos trifosfato (Pintor, 1999).

La presencia de receptores P2 está demostrada. Las células epiteliales de lentes humanas movilizan Ca^{2+} intracelular frente al ATP mediante la estimulación de receptores P2Y_2 (Pintor, 1999). Con posterioridad se ha confirmado la localización del receptor P2Y_2 en el epitelio subcapsular de la lente (Cowlen, 2003). El subtipo P2Y_1 también parece estar presente en esta estructura (Merriman-Smith, 1998). La función que desempeñan estos receptores en la lente parece relacionarse con el control de la división celular y la diferenciación de células epiteliales (Pintor, 1999).

1.5.2.1.6. Red trabecular y canal de Schlemm

La presencia de receptores purinérgicos en la red trabecular se ha visto en estudios en los cuales se ha demostrado que el ATP es capaz de movilizar Ca^{2+} intracelular al igual que la adenosina. Las células que conforman la red trabecular parecen ser capaces de

liberar ATP como consecuencia de diversos estímulos, como los hipotónicos o *shear stress* (Fleischhauer, 2003; Cui, 2001; presente trabajo), lo que confiere un carácter autocrino-paracrino a esta sustancia.

Respecto a los receptores de adenosina, células humanas de la red trabecular responden funcionalmente a agonistas selectivos de los receptores A_1 , A_{2A} y A_3 . La activación de los tres subtipos de receptor genera cantidades semejantes de Ca^{2+} intracelular y estimula en último término corrientes iónicas de K^+ y Cl^- en la membrana (Fleischhauer, 2003). Por otro lado, la activación del receptor de adenosina A_1 produce la estimulación de la secreción de metaloproteinasa MMP-2 (Shearer, 2002).

La presencia de receptores P2 se ha sugerido al comprobar que el ATP es capaz de aumentar los niveles de Ca^{2+} intracelular tanto en células trabeculares humanas como bovinas (Fleischhauer, 2003; Crosson, 2004). Los incrementos de Ca^{2+} parecen activar la vía ERK1/2 de las MAP kinasas en las células trabeculares, y estudios de PCR realizados en una línea celular humana muestran la existencia de RNAm para los receptores $P2Y_1$, $P2Y_4$ y $P2Y_{11}$ (Crosson, 2004). Trabajos posteriores muestran resultados de inmunocitoquímica realizados en tejido trabecular de rata que descubren la presencia de $P2Y_1$, $P2Y_2$ y $P2Y_4$ (Pintor, 2004a).

Un trabajo reciente en el cual se han conseguido estudiar exclusivamente las células endoteliales de la pared interna del canal de Schlemm, muestra que la estimulación de receptores A_1 incrementa corrientes iónicas de K^+ y Cl^- mientras que la estimulación del receptor A_{2A} las reduce (Karl, 2005). La activación de canales de K^+ vía A_1 produciría una disminución del volumen celular, mientras que la inhibición de canales de K^+ por la activación del receptor A_{2A} llevaría a la célula a aumentar su volumen. Estos resultados sugieren que a nivel del canal de Schlemm los receptores A_1 y A_{2A} podrían modular la facilidad de evacuación, ya que los efectos sobre las corrientes de K^+ y Cl^- se correlacionan con los efectos de la estimulación de los receptores A_1 y A_{2A} sobre la dinámica del humor acuoso *in vivo*, donde la estimulación del receptor A_1 provoca una disminución de la IOP mientras que la estimulación A_{2A} produce el efecto contrario (Avila, 2001).

1.5.2.1.7. Retina

Sin duda, la retina supone uno de los tejidos oculares donde mayor es la abundancia de receptores purinérgicos, tanto del tipo P1 como P2. La gran cuantía y variedad de estos receptores demuestran que los nucleótidos extracelulares juegan un importante papel en la retina neural como neuromoduladores y mediadores autocrinos y paracrinos a través de receptores P2X ionotrópicos y P1-P2 metabotrópicos.

En la retina se han encontrado diferentes subtipos de receptores P2X. El subtipo P2X₁ se encuentra expresado en diferentes especies (Yazulla, 2004; Ishii, 2003). La existencia del P2X₂ ha sido demostrada y se ha visto que el receptor colocaliza con colina acetiltransferasa, razón por la cual se le ha relacionado con la regulación en la liberación de acetilcolina en retina (Kaneda, 2004). Sin embargo, en otros trabajos no encuentran el receptor P2X₂ (Ishii, 2003). El subtipo P2X₃ se ha detectado en células ganglionares mediante diferentes técnicas y los receptores P2X₄ y P2X₅ han sido detectados en diferentes capas de la retina (Wheeler-Schilling, 2000; Wheeler-Schilling, 2001; Ishii, 2003). En retina de rata se ha localizado el P2X₇ asociado a las sinapsis de fotorreceptores y células horizontales lo que sugiere que las purinas juegan un papel importante en la neurotransmisión de la retina modulando respuestas celulares de fotorreceptores y células bipolares (Puthussery, 2004).

En retina, se ha visto también la existencia de diferentes receptores metabotrópicos P2Y. La presencia del receptor P2Y₁ se ha demostrado mediante inmunocitoquímica en diferentes partes de la retina, como la capa nuclear interna, nuclear externa, ganglionar y plexiforme externa, al igual que los fotorreceptores en los cuales también se presenta marcaje para el P2Y₁ (Fries, 2004). La distribución del P2Y₂ y P2Y₄ es también amplia. En retina de rata se ha encontrado expresión en diferentes capas y en los fotorreceptores (Fries, 2004). Mediante experimentos de hibridación *in situ* o inmunocitoquímica se ha confirmado la presencia de P2Y₆ en alguna capa de la retina (Fries, 2004; Pintor, 2004a).

Las células no excitables de la retina neural, concretamente las células gliales de Müller, expresan múltiples receptores P2 funcionales, ya que se ha comprobado que estas células son capaces de aumentar sus niveles de calcio intracelular tras la estimulación con gran variedad de agonistas purinérgicos. Se han descrito receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₆ y P2Y₁₁, y se ha sugerido la existencia también del P2Y₄ y P2Y₁₃ (Reifel Saltzberg, 2003). Otros datos confirman la expresión de P2Y₄ (Pintor, 2004a). En células de Müller humanas

se han detectado evidencias electrofisiológicas de la existencia de P2X₇ (Pannicke, 2000), aunque en rata su presencia no ha sido vista mientras que sí se ha detectado P2X₃, P2X₄ y P2X₅ (Jabs, 2000). En retina de primates, otros autores no han logrado detectar la presencia de receptores P2X en células no neuronales (Ishii, 2003).

1.5.2.1.8. Coroides y epitelio pigmentado de la retina

La coroides presenta expresión de P2X₂ y P2X₄ (Brandle, 1998) y gran variedad de receptores P2 metabotrópicos, entre los que destacan P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ (Fries, 2004).

El epitelio pigmentado de la retina (EPR) humano posee receptores de adenosina A₂ acoplados a AC (Friedman, 1989) y la activación con agonistas A_{2B} inhibe la fagocitosis en estas células, siendo éste un mecanismo de control de la longitud de los fotorreceptores (Pintor, 1999). El EPR también presenta receptores P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₆ (Fries, 2004). Otros autores encuentran P2Y₂, P2Y₄ y P2Y₁₁ en EPR de rata, siendo el marcaje para el P2Y₂ muy evidente (Pintor, 2004a). La presencia de receptores P2Y₂ ha sido demostrada en EPR en estudios de hibridación *in situ* (Cowlen, 2003) y en estudios funcionales donde se ha visto que la activación del receptor estimula directamente el transporte activo a través del EPR (Peterson, 1997; Takahashi, 2004). Experimentos *in vitro* han demostrado que la activación del receptor P2Y₂ con agonistas específicos como el INS37217, estimulan la reabsorción por parte del EPR del fluido generado en modelos de desprendimiento de retina y proporcionan un aumento en la adherencia de la retina. Así pues, hay que destacar la importancia terapéutica de la estimulación de receptores P2Y₂ en el tratamiento de enfermedades de retina en las que se produce una acumulación de líquido en el espacio subretinal (Maminishkis, 2002).

1.5.2.2. Nucleótidos y derivados en el humor acuoso

La presencia de nucleótidos fosfato y derivados en el humor acuoso ha sido demostrada en distintas especies y múltiples ocasiones y la procedencia de dichas moléculas parece tener un origen diverso.

Los niveles de adenosina en muestras bovinas y porcinas de este fluido ocular son de 321 nM (Howard, 1998), siendo los valores en el humor acuoso de humanos de 194 nM (Daines, 2003). Se desconoce si su procedencia es fruto de la degradación a partir de otros compuestos como el ATP o, por el contrario, existe una liberación activa de esta sustancia. En los tejidos bañados por el humor acuoso no se ha descrito liberación de adenosina, pero se ha demostrado una liberación de este nucleósido en otros tejidos tras diferentes estímulos como por ejemplo la hipoxia. Hay que resaltar que la concentración de adenosina se encuentra incrementada en pacientes con POAG y que sus niveles están correlacionados con la presión en pacientes con hipertensión ocular (Daines, 2003).

Es sabido que el ATP está presente en gránulos en diferentes tipos de neuronas y que es liberado por éstas ya sea como neurotransmisor o cotransmisor. El ATP se presenta como cotransmisor junto a la noradrenalina o acetilcolina en neuronas simpáticas y parasimpáticas respectivamente. Así mismo puede ser liberado como neurotransmisor por las denominadas fibras no-adrenérgicas no-colinérgicas. Al ojo llegan gran cantidad de fibras nerviosas, tanto de carácter simpático, parasimpático como sensoriales (ten Tusscher, 1994). Así pues una posible fuente de ATP podría estar derivada de la liberación de este nucleótido por parte de los terminales nerviosos. En este sentido, la estimulación del nervio trigémino produce un aumento en la concentración de ATP del humor acuoso (Maul, 1979). Las concentraciones de nucleótidos en el humor acuoso de conejo son conocidas y para el ATP, ADP y AMP se sitúan en 1.07, 1.93 y 10.47 μM respectivamente (Pintor, 2003a). Otros estudios sitúan los niveles de ATP en muestras humanas en valores bastante inferiores: 38 nM (Eldred, 2003). Recientemente se ha descrito la presencia del nucleótido Ap_4 en humor acuoso de conejos a bajas concentraciones (Pintor, 2004c).

El ATP puede aparecer en el medio extracelular a partir de células dañadas, lo cual probablemente es indicativo de daño patológico (Neary, 1996). En el ojo se dan condiciones patológicas, como uveítis o inflamación general, en las que el ATP y otras sustancias como la histamina están incrementadas (Unger, 1998).

Son varios los estudios que muestran la capacidad de ciertos tejidos situados en contacto con el humor acuoso de liberar ATP. Las células de la red trabecular pueden liberar ATP al humor acuoso debido al *shear stress* (Cui, 2001). El epitelio ciliar acumula ATP en gránulos y es liberado al espacio extracelular, donde se le ha atribuido un papel importante en la formación del humor acuoso (Mitchell, 1998). Las concentraciones de

ATP en las inmediaciones de los lugares de liberación difieren de las obtenidas en las medidas de humor acuoso, pudiendo ser esta diferencia atribuible a un efecto de dilución o a la actividad de las ectonucleotidasas (Farahbakhsh, 2002).

Por otro lado, también se ha descrito la presencia de ciertos dinucleótidos polifosfato en el humor acuoso. Concretamente, el Ap_4A y el Ap_5A han sido identificados y cuantificados, siendo sus concentraciones en el humor acuoso de conejos de 0.34 y 0.08 μM respectivamente (Pintor, 2003a). Los dinucleótidos polifosfato son compuestos naturales que pueden actuar como moléculas señalizadoras a nivel extracelular o realizar funciones intracelulares y que pueden ser almacenados en gránulos de secreción de diferentes tejidos (Hoyle, 2001). De todas formas, el origen de estos dinucleótidos en el humor acuoso es incierto. Estos compuestos son susceptibles a ser degradados por las ectonucleotidasas (Vollmayer, 2003), lo que supondría una posible fuente de nucleótidos fosfato en el humor acuoso debido a la degradación de los dinucleótidos polifosfato por parte de las células que se encuentran en contacto con el humor acuoso. De la misma forma, la degradación de mononucleótidos fosfato produciría adenosina.

1.5.2.3. Efecto de compuestos purinérgicos sobre la IOP

La adenosina fue el primer compuesto purinérgico que se estudió en cuanto a su capacidad de variar la IOP, demostrándose que tenía efectos relevantes sobre la misma (Crosson, 1995). Los efectos ejercidos por la adenosina sobre la IOP son variables, dependiendo del subtipo de receptor sobre el que se actúe. Distintos estudios han demostrado que agonistas del receptor de adenosina A_1 disminuyen la IOP en conejo, ratón y primate (Crosson, 1995; Avila, 2003; Tian 1997), y la respuesta hipotensora descrita en primates estaría mediada exclusivamente por un incremento en la facilidad de evacuación (Tian, 1997). La activación de receptores A_2 por la adenosina produce un aumento en la IOP (Crosson, 1995; Crosson, 1996). En general está aceptado que los receptores de adenosina A_3 y A_{2A} incrementan la IOP en distintas especies, y la activación de receptores A_1 la disminuye (Avila 2001).

Se han probado diferentes compuestos mononucleótidos en cuanto a su capacidad de modulación de la IOP y dentro de la variedad de derivados utilizados se pueden distinguir dos grandes grupos. Por un lado se encuentran compuestos como el 2-MeSATP, ATP- ΩS o el ATP, que producen un claro incremento en la IOP con un efecto máximo tras

2-3 horas de la aplicación. Parece ser que el perfil de respuesta coincide con una actuación sobre receptores P2Y, aunque la destrucción de estos nucleótidos por la acción de ectonucleotidasas y la consiguiente formación de adenina no puede descartarse (Pintor, 2001). La acción de estos compuestos podría darse tanto a nivel de drenaje como de formación del humor acuoso, donde se han descrito receptores P2Y capaces de ser estimulados por estos agonistas (Farahbakhsh, 2002).

Por otro lado, derivados del ATP como el $\Omega\Omega$ meATP y $\Omega\Omega$ meATP, provocan una clara y marcada reducción de la IOP en conejos. El efecto hipotensor producido por estos compuestos es bloqueado por el antagonista PPADS y no se ve afectado por el antagonista de adenosina DPCPX, demostrando la participación de receptores P2 (Pintor, 2001). Otro nucleótido que se ha visto que es capaz de disminuir la IOP ha sido el Ap₄. Al aplicarse este mononucleótido tópicamente en conejos, se produce un efecto hipotensor de hasta un 75 % y parece ser que su efecto está mediado vía receptores P2X, lo cual indicaría una conexión con mecanismos neurales responsables del control de la presión intraocular (Pintor, 2004c).

Otro grupo de compuestos purinérgicos con capacidad de modificar la IOP son los dinucleótidos polifosfatos. De los diferentes Ap_nAs que han sido testados, el Ap₂A, el Ap₃A y el Ap₅A producen un aumento de la IOP tras la aplicación tópica en conejos, mientras que el Ap₄A la disminuye. Ya que el Ap₄A se presenta en el humor acuoso en condiciones normales, éste compuesto podría desempeñar un papel importante en la regulación de la IOP (Pintor, 2003a). La acción hipotensora del Ap₄A parece estar mediada por el mismo receptor responsable de la disminución de la IOP al aplicar los compuestos $\Omega\Omega$ meATP y $\Omega\Omega$ meATP, aunque no se descartan otros mecanismos, según se ha podido ver en experimentos de desensibilización cruzada (Pintor, 2001). Se ha sugerido que estos compuestos podrían activar receptores P2X₂ presentes en los terminales colinérgicos que llegan a la red trabecular, produciendo un incremento en la liberación de acetilcolina (Pintor, 2003c). Sin embargo, los agonistas colinérgicos se han mostrado como contractores de la red trabecular y disminuidores del flujo de evacuación (Wiederholt, 1995) y no debe descartarse la actuación de los agonistas purinérgicos a nivel de músculo ciliar, dónde está demostrado que la contracción de este músculo produce un aumento de la facilidad de evacuación al aumentar los espacios funcionales en el sistema de evacuación.