



**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

DIVISIÓ DE CIÈNCIES DE LA SALUT  
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES FISIOLÒGIQUES, HUMANES I DE LA NUTRICIÓ

**MECANISMES ADRENÈRGICS EN EL CONTROL  
DE L'EVACUACIÓ DE L'HUMOR AQUÓS**

Barcelona, Octubre de 1995.

Aquest treball ha estat subvencionat en part, pel FISss (nº de projecte 94/1180)

## *Agraïments.*

*Primerament, m'agradaria agrair per endavant, a totes les persones que potser no sortiran explícitament en aquestes línies, però que són tant o més importants que les que hi són citades, el seu suport i la seva col·laboració per fer el meu treball al Laboratori de Neurofisiologia el més agradable possible.*

*Cal citar inicialment, potser perquè són els que m'han aguantat durant 22 anys, els meus pares, Jordi i Ingrid, el meu germà, Jordi, i tota la resta de la meua família. A tots ells, gràcies per la seva ajuda incondicional en tot moment.*

*També voldria agrair-los, a tots els meus companys i companyes de classe, els bons moments viscuts dins i fora de la facultat, durant els 5 anys de la llicenciatura. A tots vosaltres, gràcies, i perdoneu que no us citi, però potser necessitaria escriure una nova tesina per posar-vos-hi a tots.*

*D'altra banda, als meus amics no farmacèutics, també us agraeixo la vostra amistat i us desitjo el millor en els vostres estudis, feines i, en general, al llarg de tota la vostra vida.*

*Al Laboratori de Neurofisiologia, en general, li agraeixo l'acolliment que em va donar des de l'inici, ara ja fa més de 2 anys, i l'ajuda que sempre m'ha donat. Als seus components: Carme, Pili, Lluís, Josep, Jordi, Artur, Arcadi,*

*Irene, Miquel, Bibets, Rosa i Núria, els dono les gràcies per la seva ajuda, col·laboració, paciència i sobretot simpatia.*

*Voldria agrair específicament, a l'Artur, el meu company de laboratori, i a l'Anna, la fisiòloga vegetal, les estones que han passat amb mi, sobretot durant el llarg estiu, en la realització d'aquesta tesina, el seu suport en tot moment i l'ajuda que sempre m'han donat quan l'he necessitat. A ells dos els desitjo molta sort amb les tesines respectives i sobretot que no perdin la simpatia que els caracteritza.*

*Igualment, a la Yolanda, li vull agrair tota la paciència que ha tingut durant la realització de la present tesina, el suport incondicional que sempre m'ha donat i la seva ajuda en tot moment. A ella li faig arribar els meus agraïments.*

*Finalment, és necessari agrair al Dr. Arcadi Gual tot el que m'ha ensenyat durant la meua estada al Laboratori de Neurofisiologia, les hores m'ha dedicat dins i fora de la facultat i el seu ajut constant en aquest camí de la investigació.*

*A tots vosaltres, moltes gràcies.*

## **ÍNDEX**

# ÍNDIX

<b>1. OBJECTIUS DE L'ESTUDI</b>	01.
<b>2. INTRODUCCIÓ</b>	02.
2.1 Anatomia funcional de les cambres oculars	05.
2.1.1. Fisiologia de l'angle iridocornial	07.
2.1.1.1 La xarxa trabecular	07.
2.1.1.2 El canal d'Schlemm	11.
2.1.2. L'iris i els processos ciliars	13.
2.2. L'humor aquós	16.
2.2.1. Producció de l'humor aquós	17.
2.2.2. Evacuació de l'humor aquós	18.
2.3. La pressió intraocular (IOP)	21.
2.4. Regulació de la pressió intraocular	21.
2.5. Alteracions de la pressió intraocular	25.
2.5.1. Glaucoma	25.
2.5.1.1 Glaucoma d'angle obert	26.
2.5.1.2 Glaucoma d'angle tancat	28.
2.5.1.3 Farmacologia en el tractament del glaucoma	29.
2.5.1.3.1 Epinefrina ( <i>Adrenalina</i> )	34.
2.6. Mètodes d'estudi de l'evacuació de l'humor aquós ( <i>outflow</i> )	35.
2.6.1. Aproximacions metodològiques	35.
2.6.2. Animals d'experimentació	37.
<b>3. ESTAT ACTUAL DEL TEMA</b>	39.
3.1. Inervació de les estructures relacionades amb l'evacuació de l'humor aquós	39.
3.2. Mecanismes colinèrgics que regulen la evacuació de l'humor aquós	40.
3.3. Mecanismes adrenèrgics que regulen la evacuació de l'humor aquós	40.
3.3.1. Receptors implicats	41.
3.3.2. Segons missatgers relacionats amb l'activació dels receptors	42.
3.4. Participació de les prostaglandines	45.
<b>4. MATERIALS I MÈTODES</b>	47.
4.1. Animals d'experimentació, obtenció i condicions de conservació	47.

4.2. Dissecció	47.
4.3. Preparació <i>in vitro</i>	48.
4.4. Tècniques de registre	51.
4.5. Protocol experimental	51.
4.6. Medis, drogues i altres substàncies utilitzades	55.
4.7. Anàlisi de dades	57.
4.7.1. Mètodes estadístics	58.
<b>5. RESULTATS</b>	60.
5.1. Estudi de l'efecte de la epinefrina	60.
5.1.1. Controls	60.
5.1.2. Comprovació de resultats previs	65.
5.2. Estudi de la participació de l'AMPc en la regulació de la facilitat d'evacuació	68.
5.2.1. Forskolina	68.
5.2.2. dibutiril-AMPc	72.
5.2.3. Isobutilmetilxantina (IBMX)	77.
5.2.4. Forskolina + Isobutilmetilxantina	77.
5.2.5. Epinefrina + Isobutilmetilxantina	82.
5.3. Estudi de la participació dels receptors $\alpha_1$ -adrenèrgics en la regulació de la facilitat d'evacuació	83.
5.3.1. Metoxamina	83.
5.3.2. Metoxamina + Fentolamina	86.
5.3.3. Epinefrina + Fentolamina	89.
5.4. Estudi de l'efecte de la indometacina en la regulació de la facilitat d'evacuació	89.
5.4.1. Indometacina	92.
5.4.2. Indometacina + Epinefrina	92.
5.4.3. Indometacina + Metoxamina	94.
<b>6. DISCUSSIÓ</b>	98.
<b>7. CONCLUSIONS</b>	104.
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	106.

# ÍNDIX de FIGURES

<b>Figura 1:</b>	Diagrama de la secció meridional de l'ull humà	03.
<b>Figura 2:</b>	Diagrama del segment anterior ocular. S'hi mostren les cambres oculars i les principals estructures.	06.
<b>Figura 3:</b>	Dibuix de l'angle iridocornial mostrant les estructures per on es drenat l'humor aquós (xarxa trabecular i canal d'Schlemm).	08.
<b>Figura 4:</b>	Representació de les estructures de l'angle de la cambra anterior de l'ull.	09.
<b>Figura 5:</b>	Diagrama esquemàtic de les cèl·lules epitelials pigmentades i no pigmentades de l'epiteli ciliar.	15.
<b>Figura 6:</b>	Representació esquemàtica del segment anterior ocular dels primats. Les sagetes indiquen les vies d'evacuació de l'humor aquós.	19.
<b>Figura 7:</b>	Representació de l'angle iridocornial en diferents tipus de glaucoma.	27.
<b>Figura 8:</b>	Mecanismes intracel·lulars que es poden desencadenar a partir de l'activació dels receptors $\alpha_1$ adrenèrgics.	44.
<b>Figura 9:</b>	Montatge experimental.	49.
<b>Figura 10:</b>	Esquema dels protocols experimentals utilitzats.	53.
<b>Figura 11:</b>	Perfussió amb medi control (DMEM).	61.
<b>Figura 12:</b>	Perfussió amb els vehicles (etanol i DMSO) utilitzats en la dissolució de les drogues utilitzades.	64.



<b>Figura 13:</b>	Perfussió amb epinefrina comparada amb el medi control.	66.
<b>Figura 14:</b>	Perfussió amb forskolina $10^{-5}$ M comparada amb el medi control.	69.
<b>Figura 15:</b>	Perfussió amb forskolina $10^{-6}$ M comparada amb el medi control.	70.
<b>Figura 16:</b>	Perfussió amb dibutiril-AMPc $10^{-6}$ M comparada amb el medi control.	73.
<b>Figura 17:</b>	Perfussió amb dibutiril-AMPc $10^{-7}$ M comparada amb el medi control.	74.
<b>Figura 18:</b>	Perfussió amb isobutilmetilxantina comparada amb el medi control.	76.
<b>Figura 19:</b>	Perfussió amb isobutilmetilxantina + forskolina comparada amb el medi control.	78.
<b>Figura 20:</b>	Perfussió amb isobutilmetilxantina + epinefrina comparada amb el medi control.	81.
<b>Figura 21:</b>	Perfussió amb metoxamina comparada amb el seu control.	84.
<b>Figura 22:</b>	Perfussió amb fentolamina + metoxamina comparada amb el seu control.	87.
<b>Figura 23:</b>	Perfussió amb fentolamina + epinefrina comparada amb el seu control.	88.
<b>Figura 24:</b>	Perfussió amb indometacina comparda amb el medi control.	90.
<b>Figura 25:</b>	Perfussió amb indometacina + epinefrina comparada amb el medi control.	93.
<b>Figura 26:</b>	Perfussió amb indometacina $10^{-6}$ M+ metoxamina comparada amb el seu control.	96.

<b>Figura 27:</b>	Perfussió amb indometacina $10^{-5}M$ + metoxamina comparada amb el seu control.	97.
-------------------	--	-----

## **ÍNDIX de TAULES**

<b>Taula 1:</b>	Dades experimentals DMEM i vehicles (etanol i DMSO).	62.
<b>Taula 2:</b>	Dades experimentals epinefrina.	67.
<b>Taula 3:</b>	Dades experimentals forskolina, dibutiril-AMPC i isobutilmetilxantina.	71.
<b>Taula 4:</b>	Dades experimentals isobutilmetilxantina + forskolina o epinefrina.	79.
<b>Taula 5:</b>	Dades experimentals metoxamina i fentolamina + metoxamina o epinefrina.	85.
<b>Taula 6:</b>	Dades experimentals indometacina i indometacina + epinefrina o metoxamina.	91.

# 1. OBJECTIUS DE L'ESTUDI.

El sistema nerviós simpàtic manté, fonamentalment, la homeòstasi de l'organisme (Cannon, 1932). Autors com Friedenwald i Buschke (1941) van ser els primers en proposar que la dinàmica de l'humor aquós podria estar regulada pel component adrenèrgic del sistema nerviós autònom. D'aquesta manera es va començar a implicar el sistema nerviós simpàtic en la regulació de la dinàmica de l'humor aquós.

Altres autors han sotgerit que la patologia anomenada glaucoma podria ser deguda a una disfunció vascular que es desenvoluparia després de una disfunció dels mecanismes adrenèrgics que regularien la dinàmica de l'humor aquós (Langham, 1971).

La utilització de diferents drogues que actuen sobre receptors adrenèrgics en el tractament d'alguns tipus de glaucoma ha contribuït a l'interès per conèixer el mecanisme d'acció d'aquestes drogues i alhora la fisiologia dels processos implicats.

Un millor coneixement de les estructures oculars, el funcionament d'aquestes, i la seva regulació, tant per mecanismes de tipus nerviós com per altres tipus de mecanismes, pot conduir-nos a un coneixement més profund de les patologies que afecten aquestes estructures i, per tant, a un millor tractament (farmacològic o quirúrgic).

L'objectiu d'aquest estudi ha estat aportar noves dades que permetin conèixer amb més profunditat el/s mecanisme/s de regulació de l'evacuació de l'humor aquós, un dels processos que estan directament implicats en el manteniment de la pressió intraocular (IOP), dins dels límits fisiològics.

El millor coneixement d'aquest procés aportarà a una millor utilització dels fàrmacs usats en el tractament de patologies com el glaucoma i a l'assaig de nous fàrmacs més eficaços.

## 2. INTRODUCCIÓ

L'ull humà i en general el dels mamífers superiors és una estructura sensorial, continguda en la cavitat ocular del crani, connectada amb el cervell a través del nervi òptic. Les 5/6 parts de la superfície del globus ocular estan ocupades per l'esclera la qual es fusiona amb la dura mare que envolta el nervi òptic. L'esclera és la capa blanca i opaca que protegeix externament el globus ocular. L'altre 1/6 de la superfície del globus ocular està ocupat per la còrnia, estructura de naturalesa fibrosa, transparent i convexa, en la qual es produeix la refracció de la llum que hi incideix. La unió d'aquestes dues estructures, es produeix en el limbus esclerocornial (Tripathi, 1984).

L'ull està format principalment per tres capes (túniques). Des de l'exterior cap a l'interior tenim: la túnica fibrosa, la regió uveal i la retina (Fig. 1).

La **túnica fibrosa**, la més externa, està formada per aproximadament tres zones, l'esclera, la còrnia i el limbus esclerocornial (Tripathi, 1984).

L'*esclera*, mencionada anteriorment, és una capa blanca, opaca i resistent, de naturalesa fibrosa que actua recobrint l'ull per l'exterior. Aquesta capa, juntament amb la pressió intraocular (IOP) manté estable les dimensions de l'ull de manera apropiada per a la seva funció òptica.

La *còrnia*, que ocupa la part anterior del globus ocular, és un teixit transparent caracteritzat per l'absència de vasos sanguinis. De forma convexa per l'exterior i còncava per l'interior, té una funció principalment òptica degut a que forma la principal superfície refractant del sistema diòptric de l'ull. La llum atravesa aquesta estructura i, a través de les estructures internes de l'ull, incideix en la retina on l'energia lluminosa (fotònica) es transformada en un senyal elèctric (Waltman i Hart, 1987).

El *limbus esclerocornial* és la zona de transició entre l'esclera i la còrnia i està situat per tant en la part anterior del globus ocular. Aquesta zona nodreix

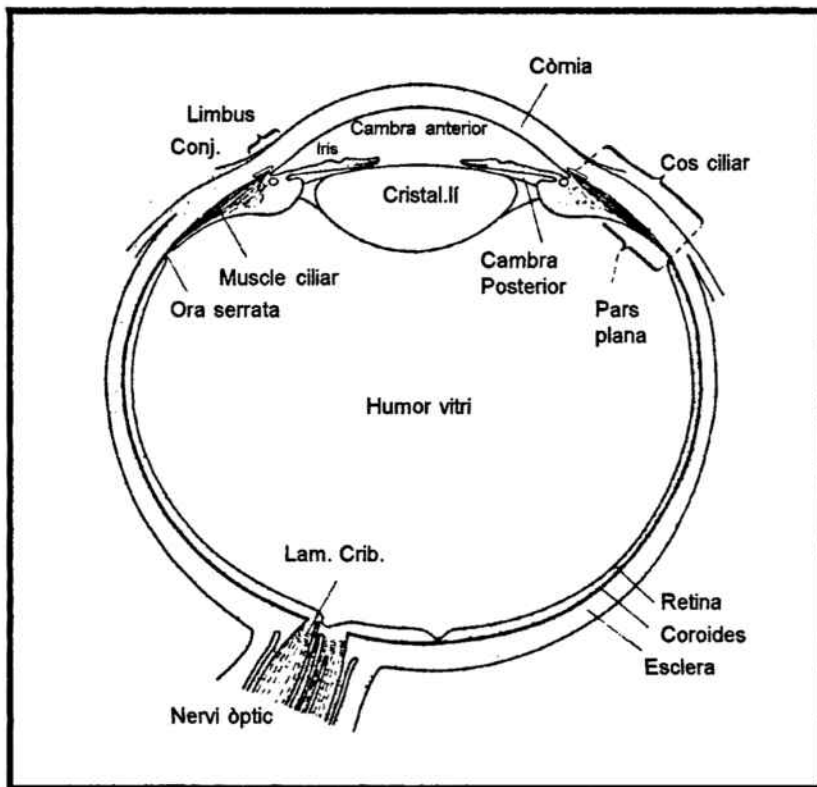


Fig. 1. Diagrama de la secció meridional de l'ull humà. (Cole, 1984)

perifèricament la còrnia a través de petits vasos limbals i conté les estructures per on l'humor aquós es drenat majoritàriament: la xarxa trabecular i el canal d'Schlemm. Alteracions tant estructurals com dinàmiques en aquesta zona acostumen a provocar el desenvolupament d'un glaucoma.

La **regió uveal** o capa intermitja, forma la túnica pigmentada i vascularitzada de l'ull. Es divideix habitualment en tres zones: la coroides, el cos ciliar i l'iris (Tripathi, 1984).

La *coroides* és la part vascularitzada posterior de la regió uveal que té com a funció principal la de proporcionar nutrients a la retina. La coroides s'extén des del punt d'inserció del nervi òptic fins a la ora serrata, punt on comença el cos ciliar.

El *cos ciliar* es troba a continuació de la coroides i de la retina, en la part anterior de l'ull. Té una forma aproximadament triangular i juntament amb l'iris marca la separació de les dues cambres de l'ull, la cambra anterior i la posterior. La part anterior del cos ciliar forma el límit de l'angle iridocornial i continua per la part anterior per formar la xarxa trabecular uveal. La part posterior està composta pels processos ciliars i el múscle ciliar.

L'*iris*, insertat en la part mitja del cos ciliar, marca la separació entre les dues cambres oculars i actua com a diafragma per a la llum que arriba a través de la còrnia. L'iris és una estructura pigmentada que deixa una obertura al centre: la pupil·la. A través de la pupil·la, l'humor aquós format en els processos ciliars passa de la cambra posterior a la anterior.

La capa més interna de les tres està formada per dos components: la capa sensorial de neurones anomenada **retina** i l'epiteli pigmentat (Tripathi, 1984).

L'*epiteli pigmentat* es troba fortament unit a la coroides i s'extén, igual que la coroides des del nervi òptic fins a la ora serrata, on continua l'epiteli ciliar pigmentat.

La retina està més o menys unida a l'epiteli pigmentat i es mostra com una capa transparent. Aquí es on troben els cons i els bastons, cèl·lules on l'estímul lluminós es transforma en estímul elèctric, que som capaços d'interpretar i així obtenir una imatge de l'exterior que ens envolta.

## 2.1. Anatomia funcional de les cambres oculars.

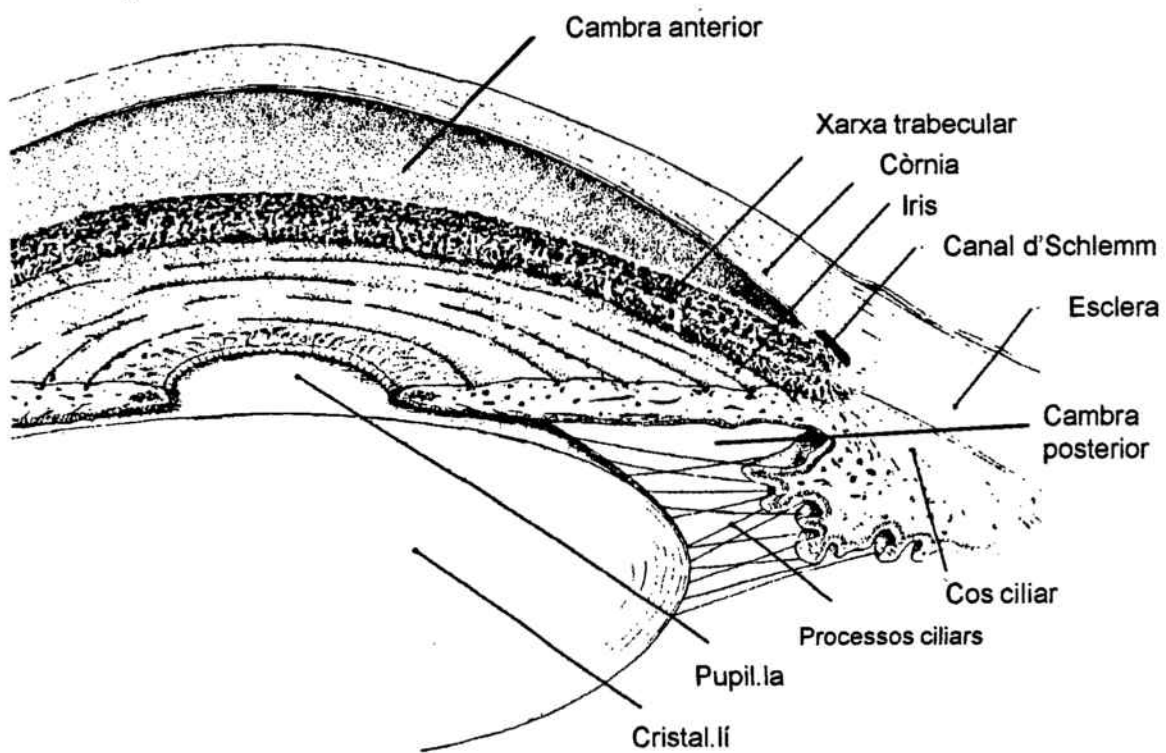
Com s'ha mencionat en l'apartat anterior, l'ull es pot dividir en dues cambres clarament diferenciades, la cambra posterior i la cambra anterior (Fig. 2) (Tripathi, 1984).

La cambra posterior (Fig. 2) es troba delimitada en la part anterior, per l'epiteli pigmentat de la part posterior de l'iris, en la part anteromedial per la zona de contacte de l'iris i el cristal·lí i en la part anterolateral per la zona d'unió entre l'iris i el cos ciliar. El cristal·lí per la part medial, els processus ciliars per la part lateral i l'humor vitri per la part posterior acaben de delimitar la cambra posterior (Tripathi, 1984).

Aquesta cambra, igual que la anterior, es troba banyada per l'humor aquós que es forma en els processus ciliars i que a través de la pupil·la passa a la cambra anterior.

La cambra anterior (Fig. 2) està delimitada per la còrnia en la seva part més anterior. L'iris, conjuntament amb la superfície del cristal·lí, marca la separació entre les dues cambres per la part més posterior. Pels laterals, el límit el marca la part anterior del cos ciliar tot formant l'extrem de l'angle iridocornial. La forma i la profunditat de la cambra ve donada per la curvatura de la còrnia i per la forma de l'iris, paràmetres que varien per a diferents individus (Tripathi, 1984).

La cambra anterior és el reservori on hi trobem l'humor aquós, fluid que és el principal responsable de la pressió intraocular i que conjuntament amb la túnica fibrosa, manté les estructures oculars en unes dimensions estables per a una bona funció visual. A més, l'humor aquós contingut en la cambra anterior, aporta els nutrients necessaris a



**Fig. 2.** Diagrama del segment anterior ocular. S'hi mostren les cambres oculars i les principals estructures (Tripathi, 1984).



la còrnia i a la lent, teixits que, degut a l'absència de vascularització, necessiten obtenir els nutrients d'altres procedències.

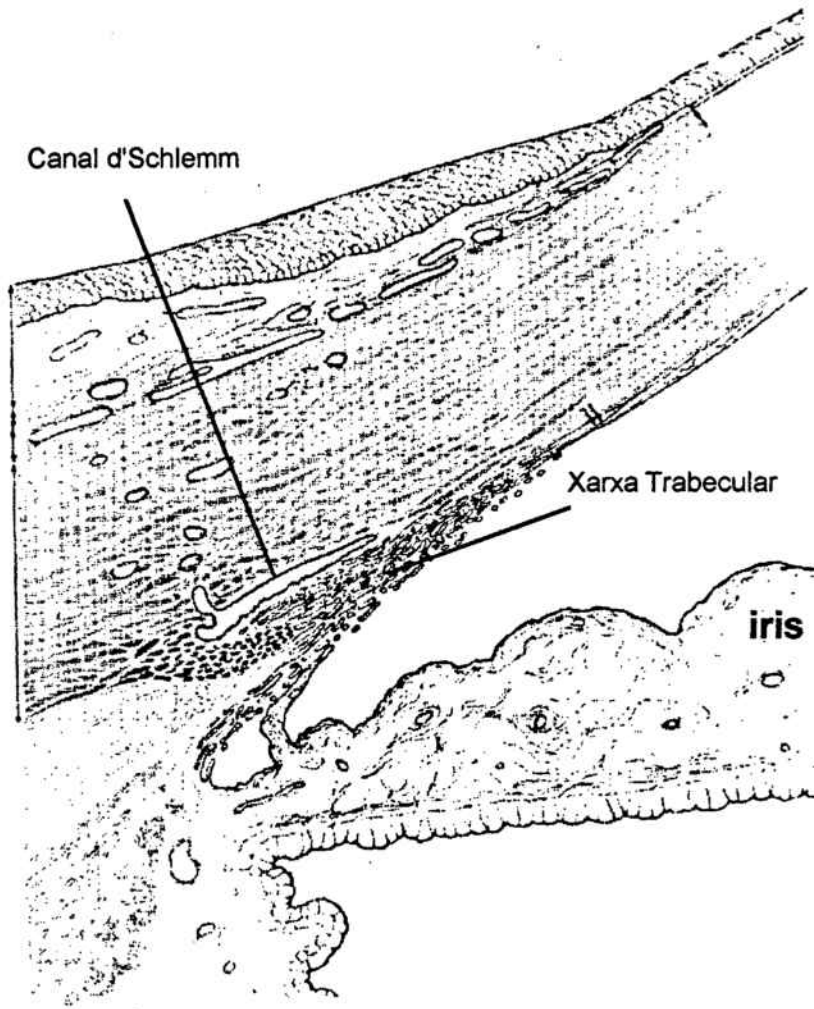
### **2.1.1. Fisiologia de l'angle iridocornial.**

En la cambra anterior de l'ull, la còrnia i l'iris no interseccionen de manera brusca, sinó que formen l'angle iridocornial (Fig. 3) (Tripathi, 1984). Aquest angle és simplement la finalització de la còrnia i l'inici de les estructures de la úvea i no tindria més importància sinó fos perquè en aquest punt és troben les principals estructures que drenen l'humor aquós de la cambra anterior cap a les venes.

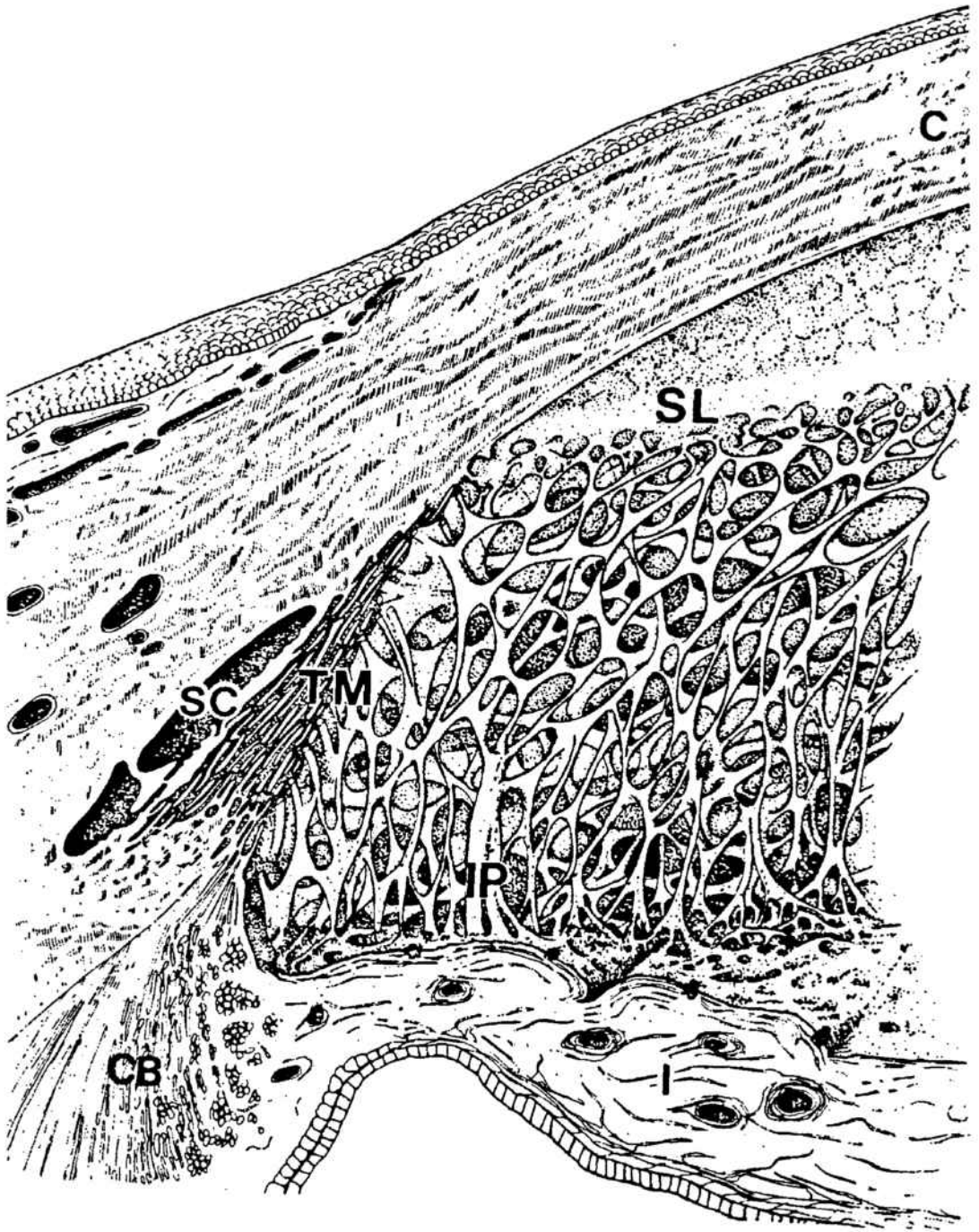
#### **2.1.1.1. La xarxa trabecular.**

La xarxa trabecular (Fig. 4) és una estructura que es troba situada pràcticament en l'extrem de l'angle iridocornial, i com diu el seu nom, està format per cèl·lules organitzades en forma de xarxa, de manera que pels espais intercel·lulars l'humor aquós pot arribar fins al canal d'Schlemm (Tripathi, 1984; Caprioli, 1987).

La xarxa trabecular pot ser dividida en dues parts fonamentalment, la trabècula uveal i la trabècula cornioescleral (Cole, 1984). La trabècula uveal està formada per diferents capes de cèl·lules que representen la continuació tendinosa de les cèl·lules del múscle ciliar (Tripathi, 1984). El teixit connectiu del múscle ciliar s'extén cap a la part anterior i s'organitza per formar les capes de la trabècula uveal. Les capes en contacte amb la cambra anterior tenen una disposició radial i es troben entre el cos ciliar i l'inici de la capa més interna de la còrnia (la membrana de Descemet). Les capes de la trabècula uveal que es troben



**Fig. 3.** Dibuix de l'angle iridocornial mostrant les estructures per on es drenat l'humor aquós (Xarxa trabecular i Canal d'Schlemm) (Cole, 1984).



**Fig. 4.** Representació de les estructures de l'angle de la cambra anterior de l'ull. C, còrnia; SL, línia de Schwalbe; TM, xarxa trabecular; SC, canal d'Schlemm; IP, procés de l'iris; CB, cos ciliar; I, iris (Tripathi, 1992).

més a l'interior de la xarxa trabecular, estan orientades majoritàriament de forma circumferencial i les cèl·lules que les formen tenen una forma més aplanada i els espais que deixen entre elles són més petits (Tripathi, 1984; Cole, 1984).

La trabècula corneoescleral té un aspecte similar a la part més externa de la trabècula uveal i està formada per capes aplanades i perforades de cèl·lules. Les cèl·lules estan orientades de manera circumferencial i paral·lela a la superfície del limbus esclerocornial en un total de entre 8 i 15 capes en l'espècie humana. La trabècula corneoescleral es la continuació dels elements fibrosos de la esclera i s'extén fins a l'inici de la còrnia (Tripathi, 1984; Cole, 1984).

Els espais que deixen les cèl·lules de la xarxa trabecular està ocupat per la matriu extracel·lular, que es compon principalment de fibres de col·lagen de tipus I i de fibres de elastina (Berman, 1991). Aquests dos tipus de fibres són els components funcionals i estructurals majoritaris de la matriu extracel·lular. A més, també s'han trobat altres compostos com fibres de col·lagen de tipus IV, glicosaminoglicans (la xarxa trabecular és rica en aquestes substàncies), fibronectina i laminina (Berman, 1991). Es creu que la matriu extracel·lular pot tenir un paper important en la regulació de la evacuació de l'humor aquós, essent un dels aspectes que s'estudien actualment (Johnson, 1986; Berman, 1991).

Els espais que deixen les cèl·lules de la xarxa trabecular són importants, perquè és per aquests espais per on l'humor aquós arriba al canal d'Schlemm. Aquests espais varien en diàmetre, essent més grans els més interns i més petits conforme anem cap al canal d'Schlemm, per tant els espais de la trabècula uveal són majors que els de la trabècula corneoescleral (Tripathi, 1984; Cole, 1984). En les diferents capes, les obertures no estan disposades de forma ordenada sinó que conformen un camí tortuós cap al canal d'Schlemm. L'humor aquós és capaç de passar per aquest espais i arribar al canal d'Schlemm, però quan aquests espais

es col·lapsen per l'acumulació de substàncies com ara proteïnes, substàncies mucilaginoses o pigment de l'iris, la evacuació es veu dificultada i la conseqüència acostuma a ser un augment en la pressió intraocular (Johnson, 1986). Un apunt important és que els espais de la xarxa trabecular poden augmentar de tamany, segons l'estat del múscul ciliar. Quan aquest múscul es contrau, la porositat de la trabècula augmenta, i el pas de l'humor aquós és més fàcil (Johnson, 1986). Aquest mecanisme és important en el tractament del glaucoma amb drogues de tipus colinèrgic (Berman, 1991).

#### **2.1.1.2. El canal d'Schlemm.**

El canal d'Schlemm (Fig. 3 i 4) és una estructura anular que forma una circumferència completa en la part interna del limbus esclerocornial (Tripathi, 1984). Es troba limitat per la part més interna per la xarxa trabecular i per la part externa per el teixit escleral. El canal té una llum allargada i paral·lela a les diferents capes de cèl·lules que formen la xarxa trabecular. El canal d'Schlemm és una estructura que es troba molt ben formada en la espècie humana i també en altres espècies pròximes, encara que hi ha algunes espècies com el conill, on el canal d'Schlemm és poc desenvolupat (Cole, 1984).

En les parets del canal es poden diferenciar tres capes: el teixit connectiu pericanalicular, la membrana basal i la capa endotelial (Tripathi, 1984).

El *teixit connectiu pericanalicular* es troba entre la part més externa de la xarxa trabecular (la trabècula cornioescleral) i la membrana basal (Tripathi, 1984). Aquesta part també s'ha anomenat *endothelial meshwork* o teixit connectiu juxtacanicular per estar a continuació de la xarxa trabecular. Les cèl·lules d'aquesta zona estan unides a les del seu

voltant i pels espais extracel·lulars que deixen, ocupats en part per substàncies de naturalesa fibrosa, l'humor aquós pot arribar a la capa endotelial del canal (Berman, 1991). Aquestes cèl·lules tenen una capacitat fagocítica important i mostren vacuoles fagocítiques, granuls de pigments i altres partícules estranyes, sobretot en ulls de individus d'edat avançada (Johnson, 1986; Berman, 1991). Aquesta activitat de les cèl·lules es creu que té una funció de neteja dels espais extracel·lulars, per permetre així un bon pas de l'humor aquós cap a l'endoteli del canal. A més, aquestes cèl·lules responen o a substàncies d'origen hormonal, neural o als canvis en la pressió intraocular i a medicacions antiglaucomatoses, alterant la porositat d'aquesta zona.

La *membrana basal* és una làmina que separa el teixit connectiu pericanalicular i la capa endotelial del canal i està formada per una xarxa de granuls de material amorf i de fins filaments (Tripathi, 1984).

La *capa endotelial* del canal està formada per cèl·lules endotelials, solapades i unides entre elles formant una capa paral·lela a la circumferència del canal (Tripathi, 1984). La principal característica de les cèl·lules de la capa endotelial és la capacitat de formar el que s'anomenen vacuoles gegants, que són invaginacions de la membrana de la cèl·lula que s'inicien en la part trabecular i que arriben a formar un vertader canal intracel·lular (Cole, 1984; Caprioli, 1987). Aquestes vacuoles, acaben per tancar-se per la part trabecular i buiden el seu contingut a la llum del canal. Així la cèl·lula endotelial recupera la seva forma inicial.

L'humor aquós contingut en el canal d'Schlemm es drenat a través de tres plexos venosos. La llum del canal està connectada al plexe intraescleral profund per canals col·lectors distribuïts en tota la circumferència del canal (Cole, 1984). El plexe intraescleral profund està connectat a la vegada amb els plexos intraescleral mitjà i epiescleral. Finalment aquests drenen el seu contingut a les venes ciliars anteriors. A

part, una quantitat variable d'humor aquós arriba directament a les venes epiesclerals a través de les venes aquoses, que surten directament del canal i drenen el seu contingut en el plexe epiescleral (Tripathi, 1984).

### **2.1.2. L'iris i els processos ciliars.**

L'iris, com s'ha mencionat anteriorment, és la estructura situada entre la cambra anterior i posterior que actua com a diafragma per a la llum que arriba a l'ull (Fig. 1 i 2) (Tripathi, 1984). La obertura que deixa en el seu centre, la pupil·la, permet la comunicació entre les dues cambres de l'ull. La major part de l'iris queda sobre la superfície anterior del cristal·lí, i en absència de la lent, l'iris s'abomba cap a la cambra posterior, augmentant així el volum contingut en la cambra anterior. El color variable de l'iris depèn de la quantitat de pigmentació en les cèl·lules de l'estroma de cada individu.

Segons l'origen embrionari, podem dividir l'iris en dues parts: l'uveal (mesodèrmica) i la neuroepitelial (retinal) (Tripathi, 1984).

L'estroma de l'iris consisteix en una capa superficial anterior avascular i la capa posterior vascularitzada del propi estroma. La capa més anterior està composta per melanocits pigmentats i fibroblasts, orientats paral·lelament a la superfície de l'iris (Tripathi, 1984). Es poden distingir en la superfície de l'iris les criptes o obertures, formades per l'absència de melanocits i de fibroblasts (Cole, 1984). La capa posterior es diferencia fonamentalment de la capa anterior per la abundant vascularització. Aquesta part conté a més a més, força components extracel·lulars i poques cèl·lules, nervis i el esfínter pupil·lar. Les cèl·lules de l'estroma estan rodejades de teixit connectiu col·laginós i de mucopolisacàrids (Tripathi, 1984). Les fibres de col·lagen es troben disposades de manera radial des de la perifèria cap a la pupil·la i des de la zona posterior a la anterior. Les fibres musculars estan orientades meridionalment i en la zona limitant amb la pupil·la s'orienten circularment.

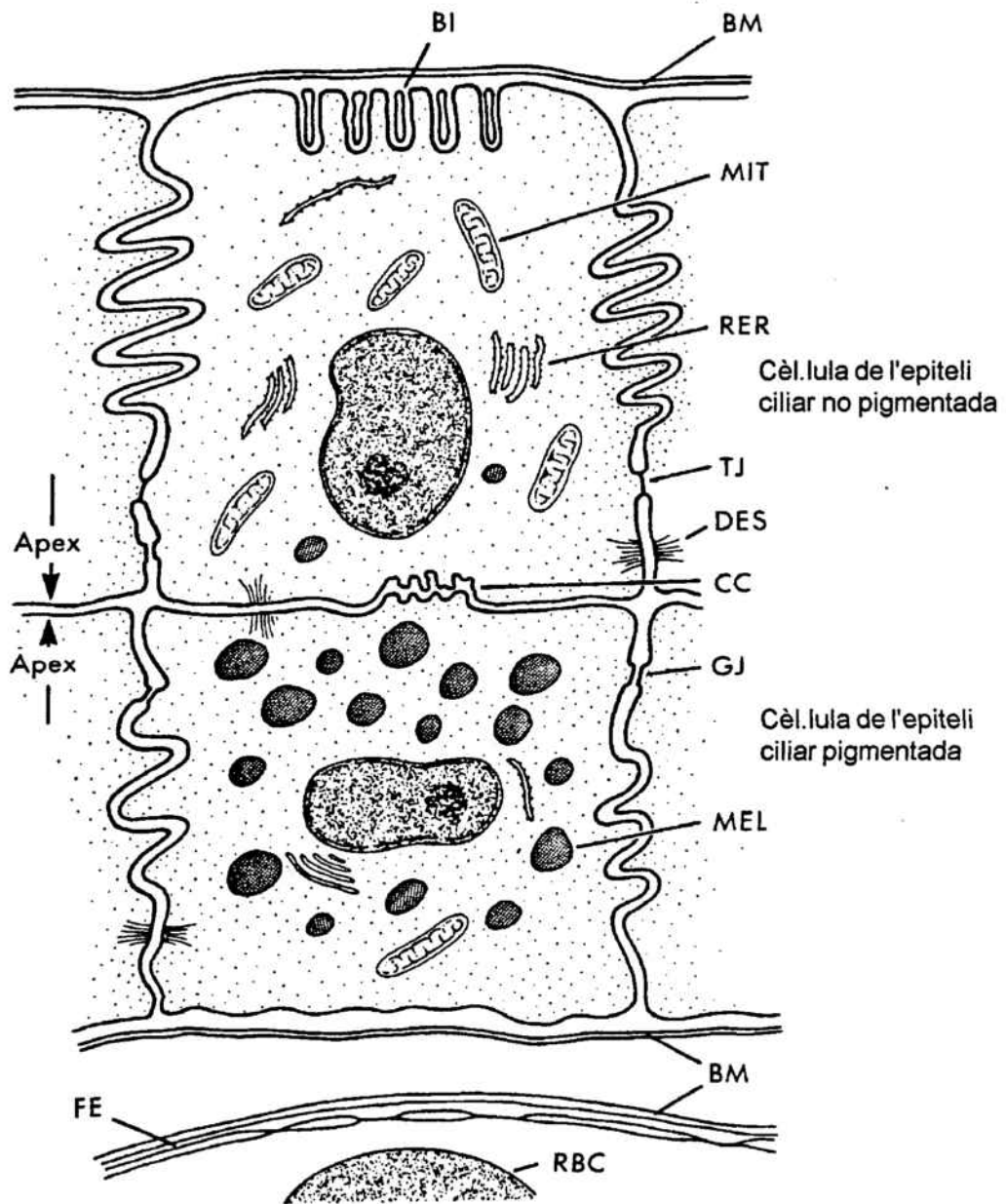
La part neuroepitelial de l'iris està composta per una capa epitelial doble en la part posterior. La part epitelial posterior és la continuació de l'epiteli no pigmentat del cos ciliar i de la part neural de la retina. Aquesta capa de cèl·lules epitelials fa que l'iris tingui una superfície posterior llisa, on s'hi troben solcs concèntrics que permeten la dilatació parcial de la pupil·la (Tripathi, 1984).

Els **processos ciliars** (Fig. 2 i 3) estan compostos per un teixit connectiu central altament vascularitzat i una doble capa de teixit epitelial (Caprioli, 1987). Els capilars de l'estroma tenen un la seva estructura unes grans fenestracions de entre 300 i 1000 Å. Des de la cambra posterior cap a l'estroma (teixit connectiu central) trobem la capa endotelial interna no pigmentada (EINP) (Fig. 5) que està en contacte amb la cambra posterior (Caprioli, 1987). A continuació hi ha la capa epitelial pigmentada externa (EPE) (Fig. 5) que està en contacte amb el teixit connectiu central. Les cèl·lules de la EPE tenen forma de cub i contenen abundants melanosomes en el citoplasma però són pobres en organuls intracel·lulars. A diferència, les cèl·lules de la EINP són columnars i contenen abundants mitocondries i reticle endoplasmàtic, tant llis com rugós. Aquestes cèl·lules es caracteritzen per nombroses invaginacions basals i interdigitacions laterals. Els dos tipus de cèl·lules estan unides per diferents tipus d'unions intercel·lulars com desmosomes o unions en gap (Caprioli, 1987).

La funció principal d'aquesta estructura és la producció de l'humor aquós a partir del plasma sanguini. La producció de l'humor aquós es descriu en el següent punt.

## **2.2. L'humor aquós.**





**Fig. 5.** Diagrama esquemàtic de les cèl·lules epitelials pigmentades i no pigmentades de l'epiteli ciliar. BI, replegaments basals; BM, membrana basal; CC, canals ciliars; DES, desmosomes; FE, endoteli capilar fenestrat; GJ, unió en gap; MEL, melanosoma; MIT, mitocondria; RBC, eritròcit; RER, reticle endoplasmàtic rugós; TJ, unió impermeable. (Caprioli, 1987)

L'humor aquós és el fluid contingut en la cambra anterior i posterior de l'ull. Es creat en els processos ciliars del cos ciliar i drenat cap a la sang majoritàriament a través de la xarxa trabecular i el canal d'Schlemm.

Els components químics de l'humor aquós deriven de diferents llocs. Principalment, la majoria dels components deriven del plasma i de l'epiteli ciliar, però altres substàncies més específiques provenen d'altres teixits com l'endotel·li corneal, el cristal·lí o l'humor vitri (Caprioli, 1987; Berman, 1991).

Les substàncies de l'humor aquós però, no només són secretades o filtrades pels teixits sinó que també algunes d'elles són recaptades com a nutrients per les cèl·lules dels teixits que hi estan en contacte (Cole, 1984).

La composició específica de l'humor aquós mostra com aquest fluid no és només un producte de filtració o de secreció, sinó que la seva composició està controlada acuradament i els seus components són regenerats constantment. La composició de l'humor aquós està controlada per diferents factors i la desregulació d'aquests factors provoca, com a conseqüència, canvis en la composició de l'humor aquós que poden produir diferents patologies en la cambra anterior (Berman, 1991).

L'humor aquós és un fluid transparent i sense color que té una viscositat inferior a la del plasma sanguini degut a que la concentració de proteïnes és menor que la concentració plasmàtica (Berman, 1991). En l'humor aquós humà, la concentració dels principals cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) és similar a la del plasma amb la excepció del  $\text{Ca}^{2+}$  que és troba en una concentració considerablement menor. Els dos principals anions ( $\text{Cl}^-$  i  $\text{HCO}_3^-$ ) també estan en concentració similar a la del plasma. Aquesta composició de les substàncies iòniques és l'adequada per mantenir la neutralitat elèctrica i per obtenir una capacitat tamponadora necessària pels teixits banyats per l'humor aquós (Cole, 1984; Caprioli, 1987; Berman, 1991).

Altres molècules presents en l'humor aquós són l'ascorbat que es troba en una concentració 20 vegades més gran a la del plasma, el glutatió en concentració menor a la plasmàtica i glucosa en una concentració entre el 76 i el 63% de la plasmàtica.

D'altra banda, els aminoàcids lliures es troben en una gran varietat de concentracions, depenent de si són o no filtrats a partir del plasma, o de si són secretats per l'epiteli ciliar (Berman, 1991).

També troben en l'humor aquós altres tipus de substàncies com catecolamines, prostaglandines i hormones en concentracions que varien segons l'estat de individu i de les possibles patologies que pugui tenir. Les proteïnes es troben en una concentració molt inferior (1/500) a la concentració plasmàtica. La proteïna més abundant és l'albumina (50% del total de proteïnes), però també s'hi troben altres proteïnes com la transferrina, prealbumina, orosomuoid i  $\alpha_1$ -glicoproteïna àcida. També s'hi han trobat alguns tipus de immunoglobulines (Ig G i Ig E) (Berman, 1991).

### **2.2.1. Producció de l'humor aquós.**

L'humor aquós es forma en els processos ciliaris com s'ha mencionat anteriorment. Hi ha diversos mecanismes pels quals l'humor aquós podria arribar a la cambra posterior: difusió passiva, transport actiu, ultrafiltració i per l'activitat de l'enzim anhidrasa carbònica (Caprioli, 1987).

La major part de l'humor aquós es forma per transport actiu de soluts per les cèl·lules de la capa endotelial interna no pigmentada (EINP) (Fig. 5) que necessiten per aquest procés energia en forma d'ATP, obtinguda de les abundants mitocondries del seu citoplasma (Caprioli, 1987). El complex enzimàtic  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa és el sistema de transport actiu que es troba en gran concentració en les interdigitacions laterals d'aquestes cèl·lules (EINP). La quantitat d'humor aquós format depèn de la quantitat de soluts transportats activament per l'epiteli ciliar. El model acceptat per la formació d'aquest fluid consisteix en un gradient osmòtic que es manté constant en els canals intercel·lulars laterals. La major concentració de soluts es troba en el canal al voltant de unió intercel·lular entre dues cèl·lules. Aquest fluid hipertònic provoca un flux d'aigua a favor de la pressió osmòtica cap a l'interior del canal

que està en contacte amb la cambra posterior (Caprioli, 1987). La contribució de la ultrafiltració en la producció de l'humor aquós és molt baixa i consisteix en el pas de líquid plasmàtic a través de les unions intercel·lulars cap a la cambra posterior. Aquesta poca contribució de la ultrafiltració és important per al manteniment del gradient osmòtic necessari per al primer procés (Caprioli, 1987).

En la espècie humana, les cèl·lules EINP contenen anhidrasa carbònica de tipus II, la qual a partir de  $\text{CO}_2$  forma  $\text{HCO}_3^-$  que es secretat cap al canal intercel·lular, contribuint en la creació de la pressió osmòtica, a més de ser un dels anions importants de l'humor aquós (Berman, 1991). La inhibició d'aquest enzim comporta una reducció de la producció d'humor aquós, igual que passa si inhibim els complex  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa. Aquests resultats mostren com els dos processos són de màxima importància per a un bon funcionament de la producció d'humor aquós en l'epiteli ciliar.

### 2.2.2. Evacuació de l'humor aquós.

L'humor aquós, com s'ha explicat en l'apartat anterior, és contínuament format i drenat, constituint un sistema dinàmic.

El drenatge de l'humor aquós (l'evacuació del mateix fora de les cambres oculars) es realitza principalment per dues vies: la via convencional (xarxa trabecular i canal d'Schlemm) i la via uveoescleral, essent la primera de les dues la més important (Cole, 1984) (Fig. 6).

La via que s'anomena habitualment **via convencional** consisteix en el pas de l'humor aquós a través de la xarxa trabecular fins a arribar al canal d'Schlemm, per on serà drenat cap a la sang (Fig. 6). Per aquesta via, l'evacuació de l'humor aquós és dependent de pressió (Cole, 1984; Caprioli, 1987). L'humor aquós és sotmès a un gradient de pressió, degut a que la pressió en la cambra

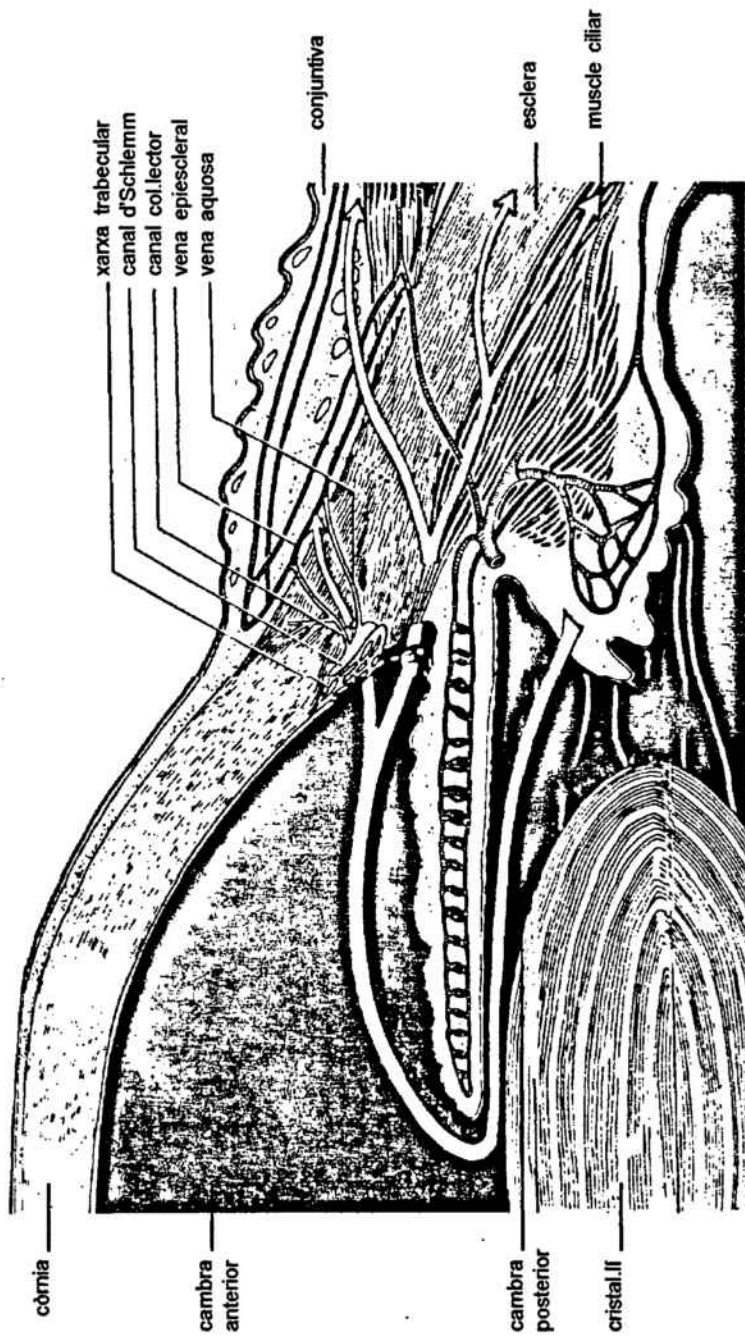


Fig. 6. Representació esquemàtica del segment anterior acular dels primats. Les sagetes indiquen les vies d'evacuació de l'humor aquós (de: Kaufman, P.L. Aqueous humor outflow. *Current topics in eye research*. 4:98.

anterior és major a la del canal i a la de les venes per on és drenat. Així, la diferència de pressions fa que l'humor aquós passi a través dels porus de la xarxa trabecular fins a arribar a la capa endotel·lial del canal d'Schlemm. La dificultat que troba l'humor aquós per a passar a través de la xarxa trabecular i de l'endoteli del canal és el que s'anomena habitualment *resistència*, paràmetre oposat a la *facilitat d'evacuació* (Moses, 1987). Els dos paràmetres poden ser modificats mitjançant l'acció de fàrmacs sobre aquestes estructures o per exemple sobre el múscle ciliar, que pot fer augmentar la porositat de la xarxa trabecular, facilitant l'evacuació de l'humor aquós.

L'endoteli del canal d'Schlemm és pràcticament impermeable, perquè les cèl·lules formen una capa continua i no deixen espais entre elles per on pugui passar l'humor aquós (Tripathi, 1984). El pas d'humor aquós a través de les unions entre les cèl·lules endotel·lials és molt petit i representa una part molt petita del total de la evacuació. La major part de l'humor aquós atravesa la capa endotel·lial mitjançant el que s'anomenen vacuoles gegants (Cole, 1984). Les cèl·lules de l'endoteli del canal són capaces de formar invaginacions en la seva membrana per la part trabecular que arriben a formar un canal transcel·lular temporal per on passa l'humor aquós. El nombre de vacuoles gegants és depenent de la pressió intraocular, encara que està poc clara la relació entre els dos processos (Cole, 1984).

La **via uveoescleral** és la segona de les vies per on l'humor aquós pot ser drenat (Fig. 6). Com a conseqüència del fet de que no existeix una capa limitant en la superfície anterior de l'iris i entre les capes de la xarxa trabecular i les fibres del múscle ciliar, l'humor aquós pot penetrar a través d'aquestes zones i arribar a l'espai supracoroidal. La pressió en l'espai supracoroidal és lleugerament inferior a la pressió intraocular i això sembla suficient per a permetre la evacuació del fluid, encara que aquesta via no és depenent de la pressió intraocular com en la via anterior (Cole, 1984). Un cop el fluid es troba en l'espai supracoroidal, pot arribar a l'exterior del globus ocular a través de l'esclera o per absorció cap als vasos sanguinis.

### **2.3. La pressió intraocular (IOP).**

La pressió intraocular es pot definir com la pressió requerida per previndre la pèrdua d'humor aquós, contingut en la cambra anterior, quan inserim una cànula en aquesta cambra ocular (Davson, 1984).

En l'ull humà la pressió intraocular varia aproximadament entre els valors de 10.5 i 20.5 mmHg, i la majoria dels casos es troben al voltant dels 16 mmHg. Entre els 10 i 70 anys no hi ha gaires diferències en el valor de la pressió intraocular, i tampoc hi ha diferències significatives entre sexes. Per sobre de valors de 21 mmHg es considera que l'ull pot tenir alguna anormalitat i per sobre de 24 mmHg, es considera patològic (Caprioli, 1987).

S'ha mesurat la pressió intraocular en diversos animals utilitzats en experimentació i els valors que s'han trobat són relativament similars als humans. En el conill, la IOP està al voltant de 17 mmHg, en el gat al voltant de 16 mmHg i en els primats la IOP és lleugerament inferior, al voltant de 12-13 mmHg. En els bovins, la pressió intraocular s'ha establert al voltant de 18 mmHg.

### **2.4. Regulació de la pressió intraocular.**

La regulació de la pressió intraocular ve determinada principalment per la relació dinàmica entre la producció d'humor aquós (*inflow*) i evacuació del mateix (*outflow*). Per tal de mantenir la pressió intraocular dintre dels paràmetres fisiològics, és important que no es desregulin els mecanismes que determinen l'*inflow* i l'*outflow*.

El control de la pressió intraocular es de fet, el control sobre l'*inflow* i l'*outflow*, de manera que un increment de l'*inflow* ha d'anar acompanyat per un increment de l'*outflow* i viceversa per que no variï la pressió (Davson, 1984).

El sistema nerviós regula l'activitat secretora de l'epiteli ciliar, igual que és capaç de regular la secreció de suc gàstric o de saliva. Un altre paràmetre a considerar és el flux sanguini de l'epiteli ciliar, factor crític que determina la disponibilitat de substàncies i de fluids per a la producció d'humor aquós. Modificacions en el flux sanguini pel sistema nerviós, pot donar com a conseqüència variacions en la taxa d'humor aquós secretat per l'epiteli ciliar.

Una altre possibilitat és la que s'ha anomenat anteriorment, la qual consisteix en la relaxació o contracció del múscle ciliar, capaç de modificar la resistència de la xarxa trabecular, facilitant més o menys la evacuació d'humor aquós (Leopold, 1984). La innervació directa del teixit trabecular també pot jugar un paper important en la regulació de la resistència de la xarxa trabecular, així com la regulació del volum cel·lular de les cèl·lules d'aquest teixit (Wiederholt, 1994; Gabelt, 1995; O'Donnell, 1995; ZSadunaisky, 1995).

Finalment, la barrera sang-aquós, estructura dels processos ciliars que marca la separació entre la sang i l'humor aquós, també té un paper important regulant el pas de soluts de la sang a l'humor aquós. El trencament d'aquesta barrera per diversos motius pot produir que es filtrin altres substàncies que normalment no ho fan com neurotransmisors (ex: acetilcolina) o autacoids (ex: prostaglandines) (Bito, 1984).

### **Mecanismes automàtics o mecànics de regulació de la pressió intraocular**

Hi ha evidències que mostren l'existència de mecanismes de regulació de la IOP automàtics o mecànics (Alm, 1972; 1973; Gual, 1979). La compressió de vasos, la reducció del contingut i del flux sanguini provoca la disminució de la producció de l'humor aquós (Macri, 1967; Bill, 1971).



La influencia de l'augment de la IOP sobre la formació d'humor aquós s'ha estudiat per nombrosos autors i s'ha vist que en aquest cas la producció d'humor aquós per l'epiteli ciliar, disminueix. Aquesta reducció no és lineal, sinó que a pressions lleugerament superiors a les fisiològiques és petita, mentre que a pressions majors de la IOP la reducció de la formació d'humor aquós és més important (Bill, 1971).

D'altre banda, un augment de la IOP comportaria una ampliació de l'angle iridocornial, que facilitaria la evacuació de l'humor aquós, i contribuiria a disminuir el volum del mateix (Armaly, 1960; Marré, 1968). En aquest mecanisme, la xarxa trabecular actuaria com una vàlvula capaç de variar la seva obertura en relació al valor de la IOP (Johnstone, 1973).

Altres mecanismes de tipus nerviós o hormonal podrien influir modulant aquests mecanismes automàtics o mecànics (Gual, 1979).

### **Mecanismes nerviosos superposats als automàtics o mecànics**

S'han estudiat augments experimentals de la IOP, amb la qual cosa s'han observat disminucions de la producció d'humor aquós (Langham, 1959, Bill, 1971) i de la resistència a evacuació (Sears, 1960) que no són possibles només a factors purament mecànics.

Una obstrucció per cauterització de les venes per on es produeix evacuació (Gazala, 1965), comporta disminucions de la resistència a la evacuació a les 24h, cosa que indica que aquesta no depèn només de factors mecànics i permet suposar que hi intervenen altres mecanismes reflexes capaços de compensar l'efecte de l'obstrucció venosa.

Segons estudis de Belmonte (1969), les modificacions de la IOP per canvis posturals semblen indicar la participació de mecanismes nerviosos, així, la secció dels nervis ciliars o l'anestèsia general redueixen la capacitat de l'ull per adaptar-se a augments del volum intraocular (Belmonte, 1969; Hill, 1963).

D'altra banda, l'observació microscòpica de les estructures oculars mostra l'abundància de terminacions nervioses, encara que no permet distingir entre aferents o eferents. A nivell de l'angle iridocornial es troben nombroses terminacions nervioses en forma de plexe (Holland, 1956; 1957). La inervació del cos ciliar també és molt abundant i s'ha sotgerit la possibilitat de que hi hagi receptors sensibles a la IOP (Kurus, 1955). L'iris és una de les estructures en que s'han descrit fibres sensorials (Minténig et al., 1995) que també podrien tenir un paper sobre la IOP.

La inervació eferent es pot estudiar més fàcilment amb tècniques histoquímiques, i s'ha estudiat la presència d'inervació adrenèrgica que permet la demostració de catecolamines, 5-hidroxitriptamina, monoaminoxidasa i dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (Gual, 1979; Gual, 1983).

A l'angle iridocornial s'ha demostrat l'existència d'una xarxa nerviosa abundant, especialment en la zona uveal de la xarxa trabecular i l'estudi d'aquestes terminacions ha permès establir en moltes d'elles el caràcter adrenèrgic (Ehinger, 1971; Laties, 1966; Staflova, 1969). També s'ha demostrat la presència en aquesta xarxa de terminacions colinèrgiques a diverses espècies d'animals (Laties, 1966; Niemi, 1964) i s'ha assenyalat l'existència de fibres simpàtiques i parasimpàtiques en la xarxa trabecular, un terç de les quals són adrenèrgiques (Nomura, 1974).

D'altra banda, el cos ciliar presenta abundant inervació colinèrgica, especialment localitzada en el múscle ciliar (Ehinger, 1971).

Diversos experiments en relació amb la inervació simpàtica (Gual, 1979), mostren que variacions en la pressió intraocular són amortiguades pel sistema nerviós simpàtic. A més, s'ha demostrat la existència de fibres que responen a canvis en la IOP, unes augmentant la seva descàrrega amb increments de la pressió i altres que la disminueixen.

Finalment, Gual (1985; 1989) va proposar, en funció de les dades obtingudes, l'existència d'un reflexe regulador de la IOP que tindria com a finalitat amortiguar els

augment d'aquesta, on la via efectora principal serien les fibres simpàtiques i en menor grau les parasimpàtiques. Aquestes fibres s'activarien en resposta als increments de la IOP i a les disminucions de la pressió sanguínea ocular.

## **2.5. Alteracions de la pressió intraocular.**

La pressió intraocular sofreix variacions al llarg del dia segons un cicle circadiari i també degut a l'edat de la persona. Les variacions de la pressió intraocular no tenen caràcter patològic, però quan aquestes elevacions passen de certs paràmetres, es pot desenvolupar un estat patològic derivat.

### **2.5.1. Glaucoma.**

Habitualment pensem amb el *Glaucoma* com una única patologia, però en realitat aquest nom fa referència a un grup de patologies en les quals la pressió intraocular està el suficientment elevada per afectar a les estructures sensorials que resulta amb una pèrdua d'agudes visual que pot arribar a ceguesa completa (Johnson, 1986; Kanski, 1992).

Com s'ha mencionat anteriorment, la pressió interna de l'ull ve donada pel volum dels elements que conté, però l'ull només pot modificar i controlar el volum d'un dels components interns: l'humor aquós. Així, quan es produeix alguna anomalia que modifiqui el volum d'humor aquós, aquest augmentarà donant com a resultat un glaucoma.

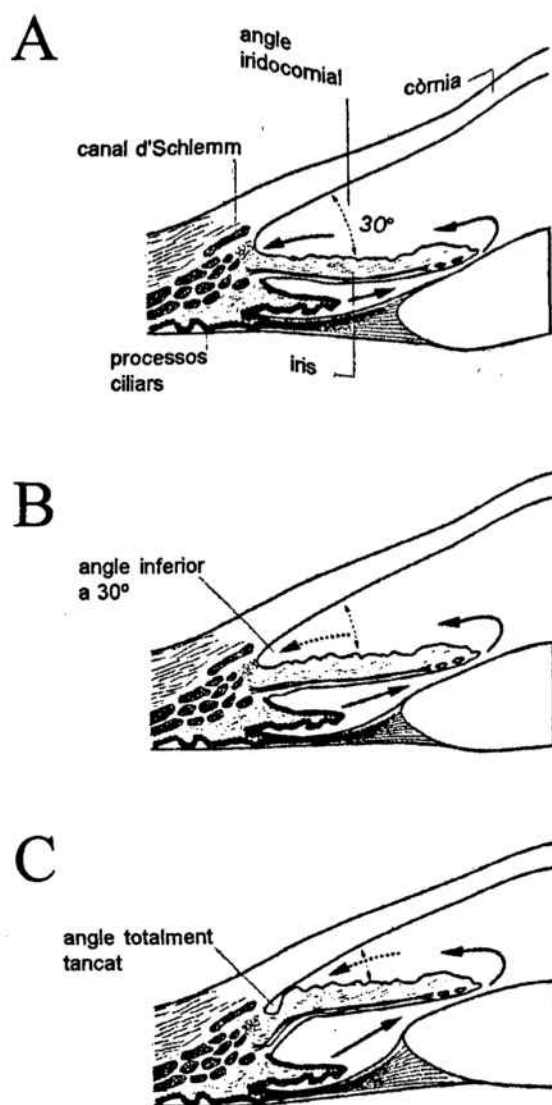
El glaucoma és una patologia freqüent, sobretot a partir dels 40 anys. A partir d'aquesta edat, afecta entre un 2 i un 4% de la població i està considerada una de les principals causes de ceguesa en l'edat adulta.

Els diferents tipus de glaucoma es classifiquen en primer lloc com a *d'angle obert* o *d'angle tancat* (Fig. 7), segons la forma de l'angle iridocornial, el qual té un aspecte aparentment normal en el primer cas i és més petit (més tancat) en el segon. A més, el glaucoma pot ser *primari* o *secundari*, depenent de l'absència o presència de factors associats que contribueixin a l'augment de la IOP. Si tenim en compte l'edat, també tenim glaucomes *congènits*, *infantil*, *juvenil* o *adult* (Kanski, 1992).

Com a conseqüència de l'increment de la IOP, es produeixen una sèrie de manifestacions. S'alteren els medis refractants de l'ull que generaran símptomes com visió borrosa o aurèoles de colors. A més, es pot produir una congestió vascular que produeix un envermelliment de l'ull. L'efecte més important d'aquesta elevació de la IOP, és la compressió a que es veu sotmesa la retina, la capa sensorial de l'ull, així com el cap del nervi òptic. Degut a aquesta compressió, s'altera transitòriament la funció dels cossos de les cèl·lules nervioses i de les fibres del nervi òptic, que es poden lesionar de manera irreversible. Normalment, es comença a perdre la visió del camp visual perifèric i es va extenent fins a perdre la capacitat visual en tot el camp (ceguesa completa), i com que s'han lesionat les fibres nervioses de manera irrecuperable, la ceguesa és irreversible (Armaly, 1973; Johnson, 1986).

#### **2.5.1.1. Glaucoma d'angle obert.**

En aquest tipus de glaucoma l'augment de la IOP es degut a un increment de la resistència de les vies d'evacuació de l'humor aquós (Fig. 7). La principal àrea de resistència es troba provablement en la xarxa trabecular o bé en l'endoteli del canal d'Schlemm. També és possible que el sistema de drenatge del canal no funcioni amb normalitat (Johnson, 1986; Kanski, 1992).



**Fig. 7.** Representació de l'angle iridocornial en diferents tipus de glaucoma. A, glaucoma d'angle obert. B, glaucoma crònic d'angle tancat. C, glaucoma agut d'angle tancat.

Aquest tipus de glaucoma és, segurament, el més complicat i és força desconegut precisament per aquest motiu. D'altra banda, l'absència de models animals limita el coneixement de la patologia (Armaly, 1973).

Sembla ser que alguns ulls pateixen una exageració dels processos d'envelliment i en estudis amb microscopi electrònic s'han trobat alguns canvis específics com un excés de col·lagen i de material fibrilar extracel·lular en el teixit trabecular que semblen ser les substàncies predominants, encara que això també es pot trobar en ulls de certa edat (Johnson, 1986). Si més no, aquests canvis no participen en la totalitat de la resistència a la sortida d'humor aquós que observem en aquest tipus de glaucoma. Les cèl·lules trabeculars secreten substància extracel·lular i sembla ser que canvis en la quantitat d'aquesta substància poden contribuir al glaucoma.

També s'ha observat en primats una marcada absència de vacuoles en els ulls glaucomatosos, a part dels canvis anteriorment citats en la xarxa trabecular.

D'altra banda s'ha vist que les cèl·lules de la xarxa trabecular disminueixen en nombre amb l'edat, dada que també trobem en els ulls glaucomatosos (Johnson, 1986). Les cèl·lules trabeculars podrien tenir capacitat fagocítica i mantenir els espais de la xarxa trabecular lliures. Un nombre inadequat o una activitat disminuïda podrien produir canvis secundaris que blocarien l'evacuació de l'humor aquós.

### **2.5.1.2. Glaucoma d'angle tancat.**

Aquest tipus de glaucoma es produeix per tancament total o parcial de l'angle iridocornial (Fig. 7), de manera que no es pot drenar

suficientment l'humor aquós, cosa que comporta un increment de la IOP (Johnson, 1986; Kanski, 1992).

Hi ha una gran varietat de causes que poden provocar aquest tipus de glaucoma. D'entre les més importants caldria destacar:

- configuració anatòmica anormal: segment anterior petit, cambra anterior poc profunda, malformacions del cos ciliar, iris abombat, augment de del cristal·lí, ectopia del cristal·lí.
- midriasi (produeix un tancament de l'angle)
- miosi (que bloqueja la pupila)
- congestió del cos ciliar
- hipersecreció d'humor aquós
- hipertensió retrocristal·lina
- altres: insomni, emoció intensa, excés d'ingesta de líquids.

El tancament de l'angle es pot produir de manera ràpida amb la qual cosa tenim un glaucoma agut d'angle tancat, o bé pot passar que l'angle no s'arribi a tancar del tot però sigui més estret. En aquest cas tenim un glaucoma crònic en que cada cert temps es produeixen atacs de glaucoma agut. Entre els diferents atacs aguts la IOP però, continua estant per sobre del normal.

### **2.5.1.3. Farmacologia en el tractament del glaucoma.**

Des de principis de segle fins a l'actualitat s'han utilitzat una gran varietat de fàrmacs, com a alternativa a les intervencions quirúrgiques,

per al tractament dels diferents tipus de glaucoma. Moltes de les drogues utilitzades inicialment han estat substituïdes per altres de més potents o amb menys efectes secundaris (Bonne, 1993). Per aquests motius encara actualment no s'ha trobat el tractament perfecte, però s'utilitzen una gran varietat de fàrmacs que ajuden a controlar la patologia dins d'uns límits que no facin perillar el bon funcionament de les estructures oculars.

Els fàrmacs utilitzats en el tractament del glaucoma es poden dividir en diferents grups, els més importants dels quals són:

- Colinèrgics
- Agrenèrgics
- Inhibidors de la anhidrasa carbònica
- Eicosanoids

### *Colinèrgics*

Les drogues de caràcter colinèrgic es poden dividir en dos grups tenint en compte sobre el receptor que actuen. Així, podem parlar de drogues que actuen sobre receptors nicotínics i d'altres que actuen sobre receptors muscarínics. En les estructures relacionades amb la producció i evacuació de l'humor aquós, la principal inervació colinèrgica la trobem en el cos ciliar, especialment en el múscle ciliar, i en l'iris (Leopold, 1984).

L'administració ocular d'agonistes muscarínics produeix contracció de la pupila, contracció del múscle ciliar, dilatació dels vasos de la conjuntiva i de l'iris i increment en la evacuació de l'humor aquós. Tots aquests efectes probablement ajuden en la disminució de la pressió intraocular produïda per aquests fàrmacs.



La disminució de la IOP després de l'administració de parasimpaticomimètics provoca principalment la estimulació de la musculatura de l'iris i del cos ciliar. Quan s'apliquen a l'ull, aquests fàrmacs incrementen el to del múscle que contrau la pupila i del múscle ciliar, provocant una disminució de la resistència a la evacuació de l'humor aquós que condueix a la mencionada disminució de la pressió intraocular (Leopold, 1984, Berman, 1991).

S'han proposat dues explicacions per aquest procés: (1) La contracció de l'iris i del múscle ciliar provoca que aquestes estructures *estirin* la xarxa trabecular, augmentant la porositat d'aquesta, cosa que condueix a un augment de la evacuació de l'humor aquós. (2) Els canals col·lectors i les venes perifèriques al canal d'Schlemm poden ser dilatades pels fàrmacs colinèrgics, produint un augment de volum en tot el sistema de drenatge que facilita l'evacuació (Leopold, 1984).

La acetilcolina com a fàrmac no s'utilitza pràcticament per al tractament del glaucoma degut a que penetra la còrnia difícilment i a més, és ràpidament degradada per les colinesterases. Els fàrmacs més utilitzats d'aquest grup són la pilocarpina i el carbacol. Aquests fàrmacs són poc destruïts per les colinesterases i a més, la pilocarpina es pensa que també pot inhibir en part la producció d'humor aquós, afavorint la reducció de la IOP (Johnson, 1986).

Altres fàrmacs utilitzats són els inhibidors de la acetilcolinesterasa (Fisostigmina, Neostigmina), que impedeixen la degradació de la acetilcolina que pot actuar durant més temps.

### ***Adrenèrgics***

La utilització de drogues de caràcter adrenèrgic per al tractament del glaucoma comporta avantatges considerables respecte al tractament amb drogues colinèrgiques. Aquests fàrmacs són capaços de reduir la pressió intraocular sense presentar els efectes col·laterals dels colinèrgics que afecten la visió del pacient, a més de tenir una acció més llarga, amb la qual cosa no són necessàries tantes administracions.

Com a conseqüència de la complexitat dels processos que regulen la pressió intraocular, hi ha una gran varietat de drogues adrenèrgiques capaces de reduir la pressió intraocular de manera significativa. Així, ens trobem amb la paradoxa de que tant fàrmacs simpaticomimètics i simpaticolítics són capaços de produir un descens en la IOP. Això es degut a que alguns d'ells actuen sobre la producció d'humor aquós i d'altres sobre la evacuació del mateix, a part de tenir la capacitat d'actuar sobre diferents tipus de receptors adrenèrgics (Tripathi, 1992).

La formació d'humor aquós en els processos ciliars és incrementada pels agonistes  $\beta$  adrenèrgics (isoproterenol, albuterol) mentre que els antagonistes  $\beta$  la inhibeixen (Timolol, betaxolol, levobunolol i metipranolol). L'efecte dels fàrmacs  $\beta$  adrenèrgics sobre la evacuació de l'humor aquós no es coneix bé i depèn molt de l'espècie que estudiem; alguns estudis mostren un increment de la evacuació d'humor aquós en ulls tractats amb  $\beta$  agonistes per la via uveoescleral, a més d'alguna possible acció sobre les cèl·lules trabeculars (Johnson, 1986; Tripathi, 1992).

D'altra banda, els agonistes  $\alpha$  adrenèrgics no es coneix bé el seu lloc d'acció, però s'ha vist que els antagonistes  $\alpha_1$  com la prazosina i la bunazosina tenen un efecte hipotensor en l'home i en els animals. També s'ha trobat que la alfuzosina (antagonista  $\alpha_1$ ) produeix una reducció de la IOP en primats, per inhibició de la formació d'humor aquós. La clonidina (agonista  $\alpha_2$ ) s'utilitza en el tractament del glaucoma per tenir

un efecte hipotensor, probablement com a conseqüència d'una acció depressora de la secreció d'humor aquós (Tripathi, 1992).

### ***Inhibidors de l'anhidrasa carbònica***

La acetazolamida i la metazolamida disminueixen la pressió intraocular com a resultat de la depressió en la formació d'humor aquós que produeixen. La anhidrasa carbònica és un enzim que trobem en molts teixits del cos humà i que també es troba en l'ull. Aquest enzim catalitza el pas de diòxid de carboni ( $\text{CO}_2$ ) a àcid carbònic que es transforma en bicarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ), component necessari per a la formació de l'humor aquós. La inhibició de l'enzim per part d'aquests fàrmacs produeix una disminució en la formació d'humor aquós que resulta en una disminució de la IOP (Johnson, 1986). Durant les hores de vigília, la combinació de timolol i acetazolamida disminueix la secreció d'humor aquós entre un 45 i un 50%. Mentre la persona dorm, la secreció d'humor aquós es disminuïda al 50%, de la taxa de secreció durant el dia, endògenament i cap de les dues drogues és capaç de disminuir-la més.

El principal problema d'aquests fàrmacs són la gran quantitat d'efectes secundaris que produeixen (acidosi sistèmica, formació de càlculs renals,...), i que no són gaire ben tolerats per la majoria de pacients

### ***Eicosanoids***

Les prostaglandines, a la dosi apropiada, produeixen una disminució de la pressió intraocular, de manera que podrien ser

utilitzades com a tractament del glaucoma (Bito, 1984). Les dosis massa altes de prostaglandines poden produir un trencament de la barrera sang-aquós, cosa que produeix un augment de la IOP en lloc d'un descens de la mateixa. Cal destacar que en els conills, les prostaglandines tenen un comportament diferent que en la resta d'animals, probablement degut a les característiques especials de l'ull d'aquests animals (cascada de l'àcid araquidònic, estabilitat de la barrera sang-aquós,...) (Bito, 1984).

El mecanisme d'actuació d'aquests compostos sobre la producció i la evacuació de l'humor aquós no es coneix amb exactitud, però es creu que podrien augmentar la evacuació i també disminuir la formació d'aquest (Bito, 1984; Berman, 1991).

#### **2.5.1.3.1. Epinefrina (Adrenalina)**

La epinefrina és una de les substàncies àmpliament utilitzada en el tractament del glaucoma des de mitjans de segle, encara que no es coneixia el seu mecanisme d'actuació per a la reducció de la IOP que indueix.

Aquesta substància és capaç d'actuar sobre els receptors  $\alpha$  i  $\beta$  adrenèrgics, i encara ara no es coneix bé si és l'estimulació dels receptors  $\alpha$  el que incrementa la evacuació de l'humor aquós, si és a través dels receptors  $\beta$  o bé si tots dos receptors estan implicats en el procés (Tripathi, 1992).

A part de l'activació sobre els receptors adrenèrgics, en estudis *in vitro* (Tripathi, 1992) han mostrat que la epinefrina és capaç d'induir canvis en el citoesquelet de les cèl·lules

trabeculars, canvis que poden modificar la seva morfologia i les seves activitats fagocítiques i mitòtiques.

D'altra banda tampoc està clar l'efecte de la epinefrina sobre la producció d'humor aquós, de manera que hi ha estudis que han proposat que la epinefrina és capaç de disminuir-ne la producció a llarg terme i d'altres que és capaç d'estimular-la a curt terme.

## **2.6. Mètodes d'estudi de l'evacuació de l'humor aquós (*outflow*).**

Una de les necessitats actuals és un model animal ben establert i reproduïble que pugui ser utilitzat per a desenvolupar noves drogues per al tractament del glaucoma i conèixer millor el mecanisme d'actuació sobre l'*outflow* de les que s'utilitzen actualment. Sobretot, cal un model que reproduïxi el més exactament possible la patologia, i en el que es pugui estudiar l'*outflow* de manera específica.

### **2.6.1. Aproximacions metodològiques.**

Alguns models com la injecció d'eritocits, partícules de la lent, proteïnes sèriques o granuls de pigment en la cambra anterior, comporten un increment en la IOP degut a la obstrucció que provoquen sobre les vies d'evacuació. En aquests casos es produeix una variabilitat en el valor de la IOP degut a una evacuació reduïda i a petits canvis en la producció d'humor aquós (per exemple en els períodes de son/vigília) que fan els resultats difícils d'interpretar pels investigadors, per aquest motiu aquestes tècniques s'han utilitzat per a estudis dels efectes de la pressió sobre la retina, el nervi òptic, etc. (Bartels, 1984).

L'ull animal no té exactament la mateixa morfologia que l'ull humà en els teixits implicats en l'*outflow*, amb la excepció d'alguns primats, i no desenvolupen glaucomes de manera natural, amb la excepció d'algunes espècies de gossos que s'han pogut utilitzar en alguns casos concrets (Bartels, 1984).

Les tècniques per mesurar la IOP *in vivo* i els canvis en aquest paràmetre com a conseqüència de l'acció de diverses drogues, es basen en la mesura de la IOP principalment amb dos tipus de mètodes. D'una banda es pot utilitzar un tonòmetre (aparell que mesura la IOP exercint una pressió sobre la còrnia, la resistència de la còrnia a la pressió externa està en relació directe al valor de la IOP) que té com a principal avantatge la particularitat de ser un mètode no invasiu. D'altra banda, la canulació de la cambra anterior a través de la còrnia és un altre dels mètodes més utilitzats per mesurar la IOP.

Quan el que ens interessa és mesurar la facilitat d'evacuació per veure els possibles efectes de les drogues que estem estudiant sobre l'*outflow*, s'utilitzen diverses tècniques. La perfussió és la tècnica més utilitzada per avaluar la facilitat d'evacuació tant *in vivo* com en ulls enucleats. La perfussió de l'ull, mitjançant una cànula inserida en la cambra anterior o posterior, amb un medi similar a l'humor aquós pot fer-se a pressió constant o a flux constant, i en cada tipus de perfussió es determina la facilitat de manera diferent. Aquestes tècniques permeten avaluar l'acció de diverses drogues sobre la facilitat d'evacuació, però cal tenir en compte que aquestes drogues també poden modificar altres paràmetres com la producció d'humor aquós, la contracció de l'iris i el múscle ciliar, que poden afectar el valor de la facilitat d'evacuació (Bartels, 1984).

En els últims anys s'han posat a punt algunes tècniques que permeten estudiar de manera específica l'evacuació de l'humor aquós, sense que altres paràmetres pugin modificar-ne la seva avaluació. Principalment, consisteixen en sotmetre a perfussió el segment anterior ocular *in vitro*, després de eliminar les estructures que no estan directament relacionades amb l'*outflow*. La tècnica desenvolupada per Erickson-Lamy (1988, 1991) consisteix a sotmetre a

perfusió a pressió constant el segment anterior ocular, mentre que la desenvolupada per Johnson (1987) manté el flux com a paràmetre constant. Ambdues tècniques permeten avaluar els efectes de diferents drogues sobre la facilitat d'evacuació de manera específica. Altres autors, han desenvolupat tècniques similars amb petites modificacions (Wiederholt, 1995; Dijkstra, 1995; Bielski, 1995) que podrien aportar altres resultats.

Com es descriu en el Material i Mètodes, en el nostre laboratori s'ha posat a punt la tècnica descrita per Erickson-Lamy (1988, 1991) amb petites modificacions que milloren sobretot el registre i l'anàlisi de dades.

### **2.6.2. Animals d'experimentació.**

La utilització de models animals com a test per a les drogues susceptibles de poder-se utilitzar per tractar el glaucoma ha estat comentat en l'apartat anterior. Degut a diferències funcionals i morfològiques no tots els animals són susceptibles de ser utilitzats. Com s'ha comentat anteriorment, segons la droga a avaluar (prostaglandines), alguns animals no tenen una resposta equiparable a l'ull humà (Bito, 1984).

Els principals animals utilitzats en aquests estudis són el conill, el gat, algunes espècies de primats. El conill és habitualment l'animal més utilitzat pel seu baix cost i la facilitat per treballar amb ell. El gat s'utilitza sobretot en estudis de caràcter electrofisiològic com per exemple estudis dels mecanismes nerviosos que controlen la IOP. La utilització de primats és potser, la que més s'adapta a les necessitats morfològiques per poder comparar amb l'ull humà, però el seu alt cost econòmic i les dificultats per treballar amb ells els fan de difícil utilització. També els gossos s'han utilitzat en alguns casos pel fet de que alguns d'aquests animals són capaços de patir glaucoma. Finalment, també s'utilitzen actualment ulls enucleats de boví, per la seva gran facilitat d'obtenció i el seu

baix cost on, com en altres animals, es poden fer estudis farmacològics sobre la evacuació de l'humor aquós (Bartels, 1984).



### **3. ESTAT ACTUAL DEL TEMA**

#### **3.1. Inervació de les estructures relacionades amb l'evacuació de l'humor aquós.**

Les estructures relacionades amb l'evacuació de l'humor aquós a través de la via convencional (xarxa trabecular i canal d'Schlemm) mostren abundant inervació de diferent tipus (Ten Tusscher, 1994). En la part posterior de la xarxa trabecular s'han trobat terminacions nervioses de tipus colinèrgic (Kaufman, 1984), aparentment situades justament en la part anterior de la inserció de les fibres longitudinals del múscle ciliar. De fet, aquestes fibres musculars i els seus tendons s'extenen anteriorment cap a l'esclera i la xarxa trabecular, inserint-se en la zona subendotelial de la paret interna del canal d'Schlemm.

Encara que s'ha vist la presència de terminacions nervioses colinèrgiques en aquestes estructures, no es coneix exactament quines estructures estan inervades de manera específica, si aquestes terminacions nervioses són realment terminacions colinèrgiques funcionals i quina significació funcional poden tenir en la regulació de la pressió intraocular.

La inervació de tipus adrenèrgic també s'ha estudiat en aquestes estructures, i s'ha trobat que la xarxa trabecular està inervada per fibres nervioses simpàtiques (Tripathi, 1992), la qual cosa indica que les cèl·lules trabeculars són influenciades d'alguna manera pels agents adrenèrgics com la epinefrina i la norepinefrina.

En l'angle iridocornial s'ha demostrat la existència d'una xarxa nerviosa abundant, especialment en la zona uveal de la xarxa trabecular i l'estudi d'aquestes terminacions ha permès establir en moltes d'elles el caràcter adrenèrgic. També s'ha assenyalat l'existència de fibres simpàtiques i parasimpàtiques en la xarxa trabecular, un terç de les quals són adrenèrgiques.

### **3.2. Mecanismes colinèrgics que regulen la evacuació de l'humor aquós.**

Com s'ha mencionat anteriorment els fàrmacs colinèrgics com la pilocarpina, administrats tòpicament o sistèmicament disminueixen la IOP incrementant la facilitat d'evacuació de l'humor aquós (Tripathi, 1992). Alguns estudis han demostrat l'existència de canvis de forma i de mida dels espais intertrabeculars després de l'administració de pilocarpina, encara que si es desinserta el múscle ciliar, la resposta a la pilocarpina desapareix. La exposició de les cèl·lules trabeculars *in vitro* a pilocarpina no mostra cap canvi apreciable en la morfologia cel·lular ni en les proteïnes contractils.

Actualment, es pensa que els fàrmacs colinèrgics podrien exercir algun efecte directe sobre la xarxa trabecular, però s'accepta que l'increment de la facilitat d'evacuació que produeixen aquests fàrmacs està mitjançat pels canvis estructurals que indueixen en la xarxa trabecular, causats per la contracció del múscle ciliar que produeixen (Schroeder, 1994).

### **3.3. Mecanismes adrenèrgics que regulen la evacuació de l'humor aquós.**

Des de la utilització de diferents drogues de caràcter adrenèrgic com la epinefrina, la norepinefrina i la isoprenalina (isoproterenol) per al tractament del glaucoma, s'han estudiat els mecanismes adrenèrgics relacionats amb la regulació de la pressió intraocular i dins d'aquests, més específicament els relacionats amb la evacuació de l'humor aquós (Eakins, 1964; Norton, 1972).

Alguns autors han estudiat durant anys la participació del sistema adrenèrgic com a modulador de la evacuació de l'humor aquós (Sears, 1975). En aquests estudis, l'efecte de la epinefrina sobre la IOP es va pensar que podria ser produït per una disminució de l'*inflow* i un augment de l'*outflow*.

Altres autors han associat l'efecte hipotensor produït per la epinefrina i la norepinefrina a un augment de la facilitat de evacuació per la via convencional (xarxa trabecular i canal d'Schlemm) i no per la via no convencional (via uveoescleral) (Kaufman, 1981)

En alguns estudis s'ha detectat la presència de catecolamines en l'humor aquós humà (Trope, 1985) en persones amb una IOP normal sotmeses a l'extracció de la lent, mentre que s'han trobat valors inferiors en pacients que patien un glaucoma d'angle obert.

Estudis més recents (Erickson-Lamy, 1992; 1994) han estudiat específicament l'efecte de la epinefrina sobre l'*outflow* i s'han decantat per la possibilitat de que l'efecte de la epinefrina sobre la evacuació de l'humor aquós sigui mitjançat a través de receptors  $\beta$  adrenèrgics i no  $\alpha$  com sotgereixen altres estudis (Eakins, 1964)

D'altra banda, l'efecte de la epinefrina sobre la xarxa trabecular podria desencadenar altres mecanismes en les cèl·lules d'aquest teixit que produirien canvis en el citoesquelet, en la morfologia cel·lular i en les seves activitats fagocítiques i mitòtiques (Tripathi, 1992), encara que de moment no es coneix la seva significació sobre la via convencional d'evacuació de l'humor aquós.

### **3.3.1. Receptors implicats.**

Els mecanismes d'actuació de les drogues adrenèrgiques impliquen un descens en la producció d'humor aquós i un augment en la facilitat d'evacuació. Per aquest últim mecanisme, es creu que la xarxa trabecular és el lloc d'actuació d'aquestes drogues.

Dels possibles llocs d'actuació de la epinefrina (receptors  $\alpha$  o  $\beta$  adrenèrgics) sembla que són els receptors  $\alpha$  adrenèrgics els que més influeixen sobre l'*outflow* en estudis amb conills (Potter, 1981a; 1981b), alhora que pràcticament no s'han trobat receptors  $\beta$  adrenèrgics en la xarxa trabecular en estudis de *binding*. En la mateixa línia, altres estudis han implicat els receptors  $\beta$  com a moduladors de l'efecte sobre l' *outflow* produït per l'activació dels receptors  $\alpha$  (Potter, 1981a; 1981b).

Alguns autors han sotgerit que la major participació en la regulació de l'*outflow* correspondria als receptors  $\beta_2$  adrenèrgics (Tripathi, 1992; Erickson-Lamy, 1992; 1994), ja que aquests s'han trobat a la xarxa trabecular de l'ull humà.

Un aspecte important es l'espècie que estudiem, i com a exemple cal destacar que en el conill tant les drogues  $\alpha$  adrenèrgiques com les  $\beta$ , incrementen la facilitat d'evacuació de l'humor aquós (Tripathi, 1992), mentre que en humans i primats no està clar, existint estudis que impliquen ambdós tipus de receptors en aquest efecte.

D'altra banda, tant els agonistes com els antagonistes  $\alpha_1$  adrenèrgics tenen un efecte sobre la IOP, però el seu lloc d'acció no està clar en les humans, mentre que en primats s'ha observat que l'efecte de l'antagonista  $\alpha_1$  alfuzosina, redueix la pressió intraocular disminuint la formació d'humor aquós.

Alhora, també s'utilitzen agonistes  $\alpha_2$  adrenèrgics com la clonidina, la qual té diversos llocs d'actuació (epiteli ciliar, venes epiesclerals, via convencional d'evacuació de l'humor aquós) i no es coneix el seu efecte sobre l'*outflow*, mentre que sobre l'*inflow* se sap que inhibeix la adenilat ciclase, que resulta amb una disminució de la producció d'humor aquós.

### **3.3.2. Segons missatgers relacionats amb l'activació dels receptors.**

Com es sabut, l'activació dels receptors  $\alpha_1$  adrenèrgics produeix l'activació de la fosfolipasa C que donarà com a segons missatgers intracel.lulars diacilglicerol (DAG) i inositoltrifosfat (IP3), alhora que produeix un augment de la concentració de calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracel.lular (Fig. 8).

Per la seva banda, l'activació dels receptors  $\alpha_2$  adrenèrgics produirà una acció inhibidora sobre la adenilat ciclasa, enzima que sintetitza l'AMPc.

L'activació dels receptors  $\beta$  adrenèrgics tenen un efecte contrari a l'efecte que produeix, sobre el segon missatger intracel.lular AMPc, l'activació dels receptors  $\alpha_2$  adrenèrgics, estimulant la adenilat ciclasa i per tant augmentant la concentració intracel.lular d'AMPc.

Nombrosos estudis han demostrat que es produeix una disminució de la pressió intraocular i un augment de la facilitat d'evacuació de l'humor aquós quan s'estimula d'alguna manera la producció d'AMPc i per tant augmenta la concentració intracel.lular d'aquest segon missatger (Neufeld, 1973; 1975; Bartels, 1981; Gregory, 1981; Crawford, 1991; Erickson-Lamy, 1992; Mittag, 1993).

Busch i col.laboradors (1993) han demostrat recentment la existència de la enzima adenilat ciclasa en la xarxa trabecular humana i bovina, i que aquesta pot ser estimulada per un activador específic (forskolina), per algunes prostaglandines.

Alguns d'aquests estudis han associat la producció d'AMPc a l'activació dels receptors  $\beta$  adrenèrgics (Crawford, 1991; Erickson-Lamy, 1992; 1994), mentre que altres no han determinat a través de quins mecanismes pot produir-se aquesta síntesi d'AMPc (Neufeld, 1973; 1975; Bartels, 1981; Gregory, 1981), o bé l'han associat a l'activació d'altres tipus de receptors (Bhattacharjee, 1977;

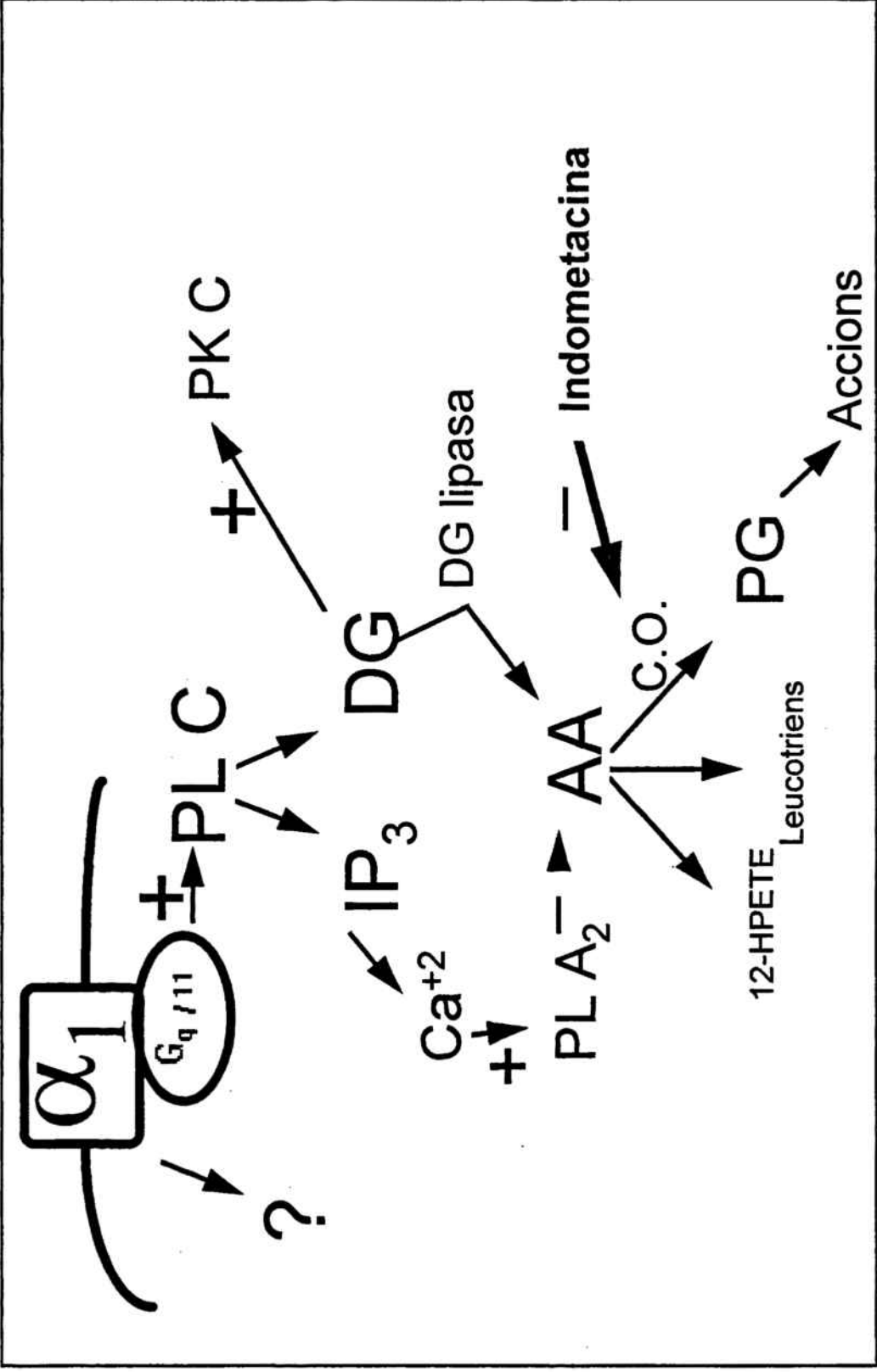


Fig. 8. Mecanismes intracel·lulars que es poden desencadenar a partir de l'activació dels receptors  $\alpha_1$  adrenèrgics.

Anderson, 1990). Hoyng i Busch (1992) han associat l'increment de l'AMPc produït per la epinefrina a l'activació dels receptors  $\beta$  adrenèrgics però a més a més han sotgerit un paper regulador d'aquest increment associat als receptors  $\alpha_1$  adrenèrgics.

La hipòtesi referent a que l'increment de la concentració intracel·lular d'AMPc indueix un augment en la facilitat d'evacuació, sembla clarament acceptada per la majoria d'autors, però actualment encara no es coneix amb seguretat quins mecanismes són necessaris per que es produeixi aquest increment.

D'altra banda, altres autors (Mittag, 1993) han relacionat l'increment d'AMPc amb el calci com a segon missatger, a través de la seva unió a la calmodulina, per tant sembla ser que hi pot haver altres segons missatgers implicats en aquest procés.

### **3.4. Participació de les prostaglandines.**

Els primers estudis de l'efecte de les prostaglandines sobre la pressió intraocular van mostrar que quan aquestes substàncies eren aplicades tòpicament o dins de la cambra anterior, es produïa un increment en la pressió intraocular, per tant tenien un efecte hipertensor (Bito, 1984; Stjernschantz, 1984). Aquest increment de la pressió intraocular es va veure, posteriorment, que estava produït per una dosi massa elevada, la qual produïa un trencament de la barrera sang-aquós, induint una hipertensió.

Estudis posteriors han mostrat que aquestes substàncies, a dosis baixes, produeixen un increment de la evacuació de l'humor aquós (Bito, 1984; Stjernschantz, 1984; Poyer, 1992), mentre que per exemple, processos inflamatoris provoquen una elevada síntesi de prostaglandines que indueix un augment en la IOP, provablement degut al trencament de la barrera sang-aquós.

Altres estudis han mostrat que l'efecte hipotensor de la epinefrina pot ser inhibit mitjançant l'administració de indometacina, amb la qual cosa sembla que s'estableix algun tipus de relació entre la epinefrina i les prostaglandines (Bhattacharjee, 1977).

Alguns dels estudis específics sobre l'*outflow* mostren que, efectivament, la indometacina bloqueja l'efecte de la epinefrina (Anderson, 1990), mentre que altres no han trobat aquesta associació (Erickson, 1994).

D'altra banda, es ben sabut que les prostaglandines poden estimular la producció d'AMPc per l'adenilat ciclase a través dels seus receptors i s'ha pensat en la possibilitat de que l'efecte de la epinefrina sigui mitjançat per les prostaglandines i que aquestes indueixin l'increment en l'AMPc que alhora augmenta l'evacuació d'humor aquós (Anderson, 1990; Tripathi, 1992). De fet, s'han trobat receptors de prostaglandines acoblats a la adenilat ciclase en l'iris i en el cos ciliar (Bhattacharjee, 1993), teixits col·lindants a la xarxa trabecular, i a més, s'ha vist que la norepinefrina és capaç d'induir la síntesi de prostaglandines en l'iris de conill i de bovins (Yousufzai, 1983) (Fig. 8).



## 4. MATERIALS I MÈTODES

### 4.1. Animals d'experimentació, obtenció i condicions de conservació.

Els estudis de la fisiologia i la fisiopatologia del globus ocular han utilitzat clàssicament diverses espècies animals: conills, gats, rates, ratolins, primats i bovins. També s'han utilitzat ulls humans, però l'utilització d'animals com a models experimentals per conèixer la fisiologia dels ulls humans, és més útil per diverses circumstàncies: són de fàcil adquisició, tenen un baix cost i es poden obtenir en condicions de conservació adequades per a l'experimentació.

En aquest estudi s'han utilitzat ulls bovins per les seves semblances tant fisiològiques com anatòmiques amb les estructures de l'ull humà i la seva facilitat d'obtenció en condicions adequades de conservació per a la seva utilització.

S'han utilitzat ulls de vedella de entre 3 i 6 mesos d'edat (Foto 1), obtinguts de l'escorxadador (Mercabarna) enucleats entre les 1 i les 3 hores posteriors al sacrifici de l'animal. Els ulls van ser immediatament submergits en PBS (Phosphate Buffered Saline) a 4<sup>0</sup>C i pH 7.42 el qual se li ha afegit antibiòtics per evitar contaminacions bacterianes i fúngiques (penicil·lina 50 UI/ml, estreptomycina 50 µg/ml i amfotericina B 5 µg/ml).

### 4.2. Dissecció.

El globus ocular tot just després de l'enucleació (Foto 1), es dissecciona per al muntatge de la preparació *in vitro*. S'eliminen tant la conjuntiva com els múscles oculars externs del globus ocular. Aquest es bisecciona per l'equador, desestimant la part posterior.

L'humor vitri, el cos ciliar, l'iris i el cristal·lí són disseccionats del segment anterior ocular, deixant únicament els teixits que participen en l'evacuació de l'humor aquós que resten en el límit esclero-cornial (Foto 1). El pigment procedent de l'iris i de l'esclera es netejat, així com altres restes de teixit disseccionat per tal de que no obstrueixin les vies d'evacuació de l'humor aquós.

El segment anterior disseccionat es submergit en medi de cultiu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) per rentar les restes de pigment.

### **4.3. Preparació *in vitro***

La preparació utilitzada en aquests estudis ha està basada en la descrita per Erickson-Lamy (1988; 1991), encara que ha estat sotmesa a nombroses modificacions per a millorar la perfusió i sobretot, l'adquisició de dades (Fig. 9; Foto 2). Consisteix en sotmetre els segments oculars, en condicions de cultiu d'òrgans, a perfusió amb medi de cultiu. El medi de cultiu DMEM conté 4.5 mg/ml de glucosa, 50 UI/ml penicil·lina, 50 µg/ml estreptomina i 5 µg/ml d'amfotericina B pH del medi de perfusió s'ajusta a 7.42 a una temperatura de 36<sup>0</sup>C, i l'osmolaliat a 300 mOs/Kg.

Els segments anteriors són situats a la cambra de perfusió i subjectats en el seu lloc mitjançant un anell. L'anell permet que el segment anterior ocular es mantingui al seu lloc i forma un segell, per compressió de l'esclera perilimbal amb la base de la cambra de perfusió, que impossibilita la sortida del medi de perfusió per aquest lloc, essent les vies fisiològiques d'evacuació de l'humor aquós les úniques que permeten la sortida d'aquest (Foto 3).

La cambra de perfusió està especialment construïda per al tamany dels ulls bovins i consisteix bàsicament en una plataforma circular tallada d'una esfera on s'hi col·loca el

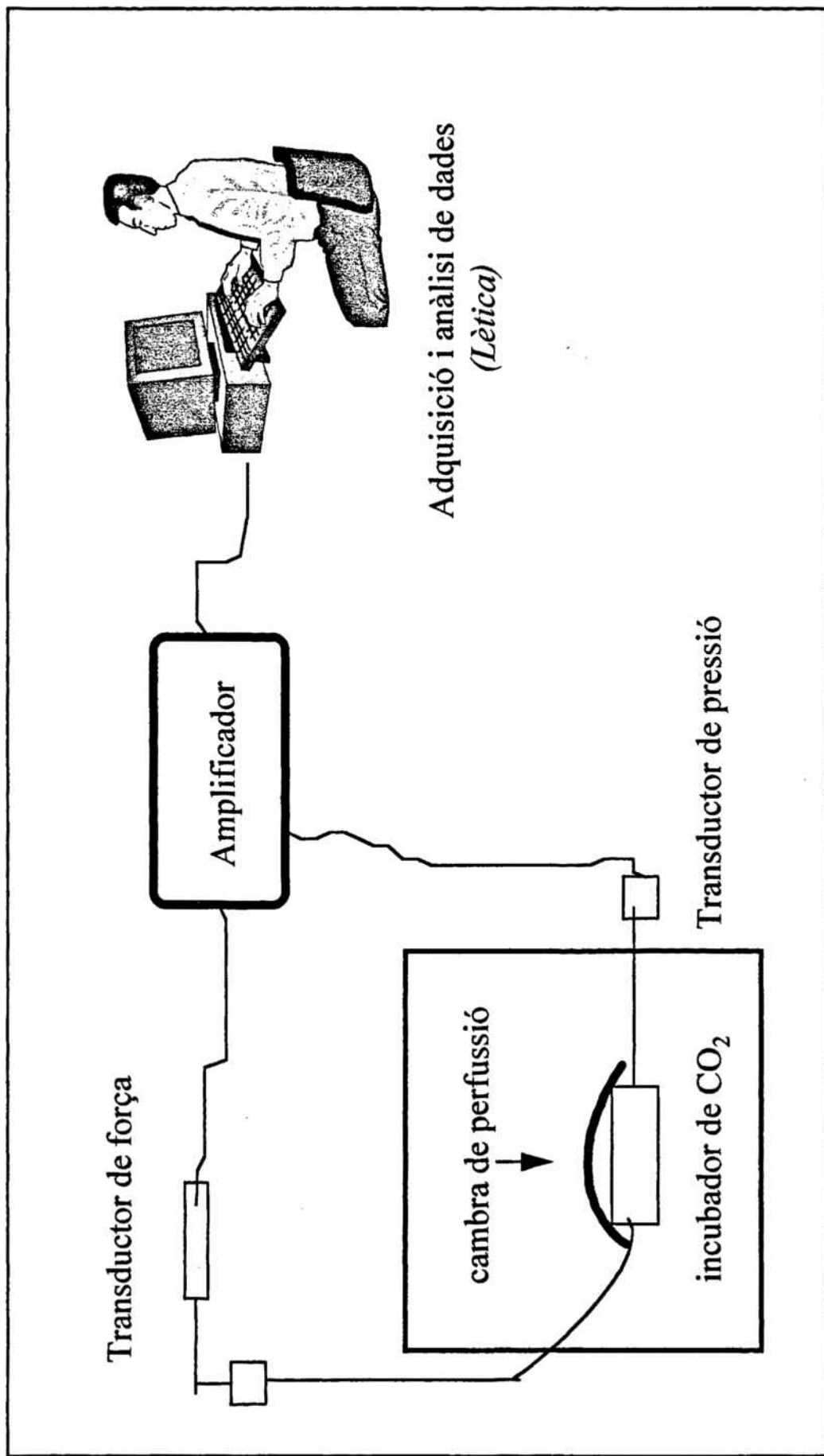


Fig. 9. Montatge experimental. Modificat de Erickson-Lamy et al. *Curr Eye Res* 7:799 (1988)

segment anterior ocular. L'anell que es col·loca a sobre, permet subjectar el segment anterior i impedeix la sortida del medi de perfusió per la base de la cambra de perfusió.

La cambra de perfusió, mitjançant dos canals centrals en la base, es connecta amb tub de polietilè amb un reservori ple de medi de perfusió, que situat a l'altura adequada, manté sempre constant una pressió de 10 mmHg. És important la utilització de tub de polietilè per la seva permeabilitat al CO<sub>2</sub>, paràmetre important per a un bon manteniment de l'homeòstasi cel·lular.

El pes del reservori amb medi és mesurat amb un transductor de tensió (Lètica), que connectat a través d'un amplificador a una terminal d'ordinador IBM-PC, determina el flux d'entrada de medi a la cambra de perfusió, paràmetre que és directament proporcional al flux de sortida de medi de perfusió del segment anterior ocular per les vies d'evacuació d'humor aquós (Fig. 9).

La perfusió del segment anterior té lloc en un incubador de CO<sub>2</sub> (Selecta, 4000602, Spain), que es manté a 36<sup>0</sup>C de temperatura en una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

La composició del medi de perfusió que conté el reservori pot ser modificada en qualsevol moment del l'experiment permetent avaluar l'acció de diferents substàncies o fàrmacs i de canvis en paràmetres fisico-químics com la osmolaritat o el pH.

En la mateixa preparació també es pot modificar l'alçada del reservori de perfusió i per tant la pressió de perfusió, cosa que permet avaluar l'efecte de diferents pressions sobre la evacuació del medi de perfusió.

#### **4.4. Tècniques de registre**

La utilització de l'ordinador per al registre de les dades permet mesurar de manera continua i precisa els paràmetres que es determinen al llarg d'un experiment. Per al registre de les dades s'ha utilitzat un ordinador de tipus PC386 amb un software adequat (Lètica) que pren una mostra cada 5 segons (Fig. 9; Foto 2). Per a cada experiment s'ha balancejat l'amplificador i s'ha calibrat el sistema de registre, dada que permet al programa calcular automàticament els paràmetres que registra.

Durant aquests experiments el paràmetre que es registra és el que es coneix com *facilitat d'evacuació*, que consisteix en la relació entre el flux en  $\mu\text{l}/\text{min}$  i la pressió de perfusió. El fluxe es mesura mitjançant el transductor de tensió i l'altura del reservori determina la pressió de perfusió que és constant. Amb aquests dos paràmetres es pot calcular en tot moment la facilitat d'evacuació.

#### **4.5. Protocol experimental.**

En tots els estudis realitzats s'han utilitzat principalment dos tipus de protocols. Tots els experiments realitzats amb aquesta tècnica requereixen, prèviament a l'estudi de l'efecte de diferents fàrmacs, una sèrie de experiments control per determinar la validesa de la tècnica, i alhora, l'estabilitat de la preparació amb el temps en les condicions de perfusió utilitzades.

### **a. Protocol Control**

Per a determinar la funcionalitat de la preparació en el temps i l'estabilitat de la mateixa, es va utilitzar un protocol control que consisteix en la perfusió amb medi de cultiu DMEM durant un període de 5 hores.

Aquesta perfusió control és precedida per un període, d'aproximadament 30 minuts, d'estabilització de la perfusió a les condicions experimentals. Després d'aquest període es sotmeten els segments anteriors oculars a perfusió durant les 5 hores anteriorment mencionades per determinar la facilitat d'evacuació basal i l'estabilitat de la mateixa en el temps.

### **b. Protocol experimental tipus 1**

Tots els protocols descrits en aquest estudi s'inicien amb un període d'aproximadament 30 minuts de estabilització de la perfusió a les condicions experimentals. A partir d'aquest punt comença vertaderament el protocol experimental (Fig. 10).

El protocol experimental de tipus 1 consisteix en tres períodes de 90 minuts cada un; període basal, període de perfusió amb droga i període de retorn a les condicions de perfusió basal.

*Període basal:* consisteix en 90 minuts de perfusió amb medi de cultiu DMEM únicament. D'aquest període se'n obté la facilitat de evacuació basal ( $C_0$ ).

*Període de perfusió amb droga:* en aquest període s'afegeix al medi de perfusió DMEM la droga que s'utilitzi a la concentració requerida. Aquest període també és de 90 minuts al igual que l'anterior i se'n obté la facilitat d'evacuació en presència de droga ( $C_d$ ).

## Protocol 1

Baseline  
(DMEM)

---

90 min

Droga

---

90 min

Post droga  
(DMEM)

---

90 min

## Protocol 2

Baseline  
(DMEM)

---

90 min

Antagonista

---

30 min

Agonista +  
Antagonista

---

60 min

Post droga  
(DMEM)

---

90 min

Fig. 10. Esquema dels protocols experimentals utilitzats.

*Període de retorn a les condicions de perfusió basal:* després del període de perfusió amb droga es retorna a les condicions de perfusió inicials per tal de determinar possibles variacions de la facilitat respecte a la facilitat basal. Com en els altres casos aquest període també es manté durant 90 minuts i n'obtenim la facilitat d'evacuació post-droga ( $C_{pd}$ ).

### **c. Protocol experimental tipus 2**

Aquest protocol essent molt semblant al de tipus 1, es diferencia principalment en el segon període. En aquest cas el període de perfusió amb droga està subdividit en dos períodes, encara que el temps total de perfusió és el mateix (Fig. 10).

*Període basal:* consisteix en 90 minuts de perfusió amb medi de cultiu DMEM. D'aquest període se'n obté la facilitat de evacuació basal ( $C_0$ ).

*Període de perfusió amb droga A:* en aquest període s'afegeix al medi de perfusió DMEM la droga A que s'utilitzi a la concentració requerida. Normalment utilitzem aquest període per fer un pretractament en la preparació amb una droga de caràcter antagonista per, posteriorment, determinar els possibles efectes de l'agonista en presència de l'antagonista. Aquest període es manté només durant 30 minuts per passar, posteriorment, al següent període de perfusió amb dues drogues alhora.

*Període de perfusió amb droga A més droga B:* amb una durada de 60 minuts, es manté la perfusió amb la droga A i, a més, s'afegeix al medi de perfusió una segona droga (B) per tal de determinar els efectes de les dues drogues juntes en la preparació de segment anterior ocular *in vitro*. Obtenim d'aquest període la facilitat d'evacuació en presència de droga ( $C_d$ ) igual que en el protocol de tipus 1.



*Període de retorn a les condicions de perfusió basal:* com en el protocol anterior, després del període de perfusió amb droga es retorna a les condicions de perfusió inicials. Com en el protocol anterior aquest període també es manté durant 90 minuts i n'obtenim la facilitat d'evacuació post-droga ( $C_{pd}$ ).

#### **4.6. Medis, drogues i altres substàncies utilitzades.**

##### **a. Medis**

En aquest estudi s'han utilitzat principalment dos tipus de medis, un per a la conservació dels ulls enucleats i l'altre per a l'experiment propiament dit com a medi de perfusió.

Un cop enucleat l'ull del cap de l'animal, aquest es submergit en PBS (17-512F, Bio-Whittaker), a pH 7.42, al qual se li ha afegit prèviament antibiòtics: penicil·lina 50 UI/ml (A-2213, Seromed-Biochrom), estreptomicina 50 µg/ml (A-2213, Seromed-Biochrom) i amfotericina B 5 µg/ml (295876, Boehringer mannheim). Els ulls enucleats es mantenen a 4<sup>0</sup>C fins a arribar al laboratori on es procedeix a la dissecció dels mateixos en condicions estèrils.

El medi utilitzat per a la perfusió és DMEM (12-733F, Bio-Whittaker) per a cultiu de cèl·lules, al qual se li ajusta el pH a 7.42 i l'osmolalitat a 300 mOs/Kg. També se li afegeixen els antibiòtics anteriorment mencionats: penicil·lina 50 UI/ml (A-2213, Seromed-Biochrom), estreptomicina 50 µg/ml (A-2213, Seromed-Biochrom) i amfotericina B 5 µg/ml (295876, Boehringer mannheim).

## **b. Drogues.**

Les drogues utilitzades en aquest estudi han estat:

Estudi de la participació de la Epinefrina:

Epinefrina (E-4250, Sigma Espanya)

Estudi de la participació de l'AMPc:

Forskolina (F-6886, Sigma Espanya)

Dibutiril-AMPc (D-0627, Sigma Espanya)

Isobutilmetilxantina (I-5879, Sigma Espanya)

Estudi de la participació dels receptors  $\alpha_1$ -adrenèrgics:

Metoxamina (M-6524, Sigma Espanya)

Fentolamina (P-7547, Sigma Espanya)

Estudi de la participació de les prostaglandines:

Indometacina (Inacid<sup>®</sup>I.M., Merck Sharp&Dohme, Espanya)

## **c. Altres substàncies utilitzades.**

En aquest estudi s'han utilitzat, per a la dissolució de les drogues en el medi de perfusió, alguns cosolvents en les dissolucions prèvies a la dissolució final en el medi de perfusió.

Per a millorar la solubilització d'algunes de les drogues utilitzades s'ha utilitzat etanol (983, Merck) o bé dimetilsulfòxid (DMSO) (D-5879, Sigma Espanya).

#### 4.7. Anàlisi de dades.

La mesura que s'ha utilitzat en aquest estudi ha estat la *facilitat d'evacuació (C)* que com s'ha mencionat anteriorment consisteix en la relació entre el flux en  $\mu\text{l}/\text{min}$  i la pressió de perfusió (10 mmHg).

$$\text{Facilitat d'evacuació (C)} = \frac{\mu\text{l medi filtrats / minut}}{\text{pressió de perfusió (mm Hg)}}$$

Aquest paràmetre es registrat per l'ordinador cada 5 segons. La mitja de tots els punts d'un període de 15 minuts constitueix la facilitat d'evacuació d'aquest període. S'utilitza la mitja de dos períodes de 15 minuts consecutius per a obtenir una mesura de la facilitat d'evacuació cada 30 minuts.

En cada experiment individual s'ha considerat, com a facilitat d'evacuació basal, la facilitat d'evacuació en el minut 60 del primer període de cada protocol (període basal) i amb aquesta dada s'ha calculat, per a cada punt de l'experiment, la relació (*Ratio*) entre la facilitat en un punt determinat i la facilitat basal en el minut 60 del període basal.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{facilitat en un punt}}{\text{facilitat basal en el minut 60}}$$

La utilització de la *Ratio*, en lloc de la facilitat d'evacuació, per fer les mitjanes i les comparacions entre diferents grups permet minimitzar les diferències interindividuals entre els diferents animals i obtenir unes dades que permeten comparar grups diferentment tractats.

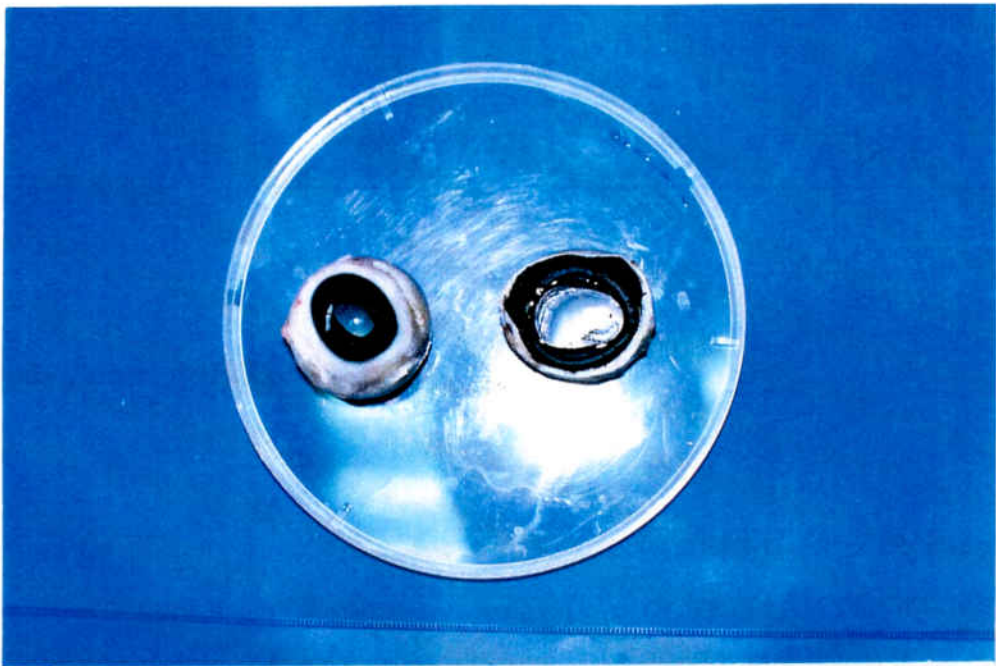
Els resultats s'han expressat com la mitja $\pm$ SEM

#### 4.7.1. Mètodes estadístics.

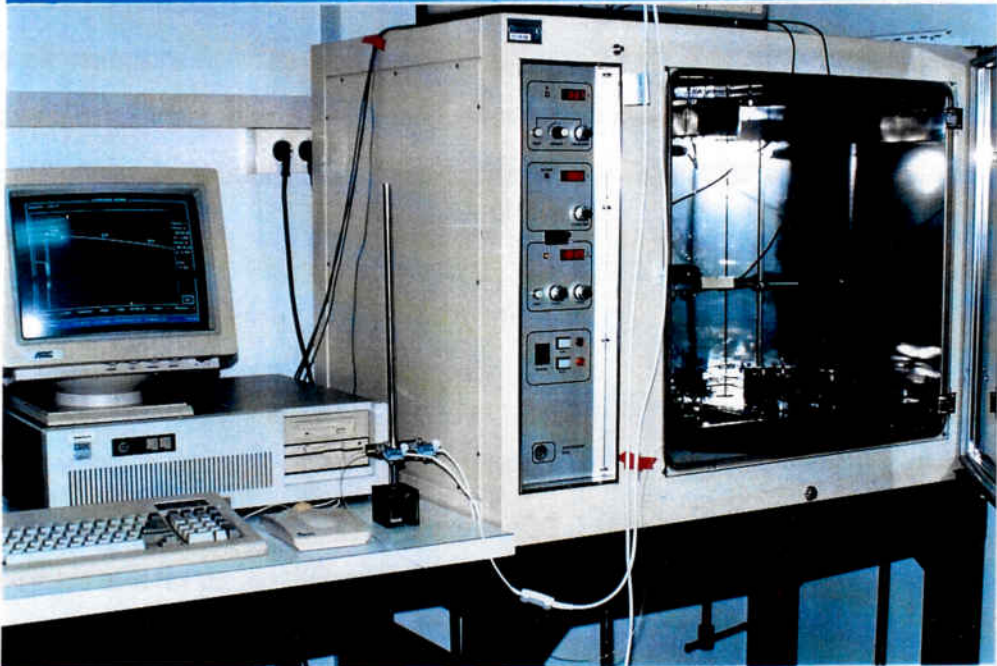
Per establir diferències entre els diferents tractaments de l'estudi s'han utilitzat dos tipus de tests estadístics.

Per a les possibles significacions estadístiques entre punts, dins del mateix protocol, s'ha utilitzat un test de ANOVA per mesures repetides que ha estat corregit amb la correcció de Bonferroni. La significació s'ha establert en  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*)

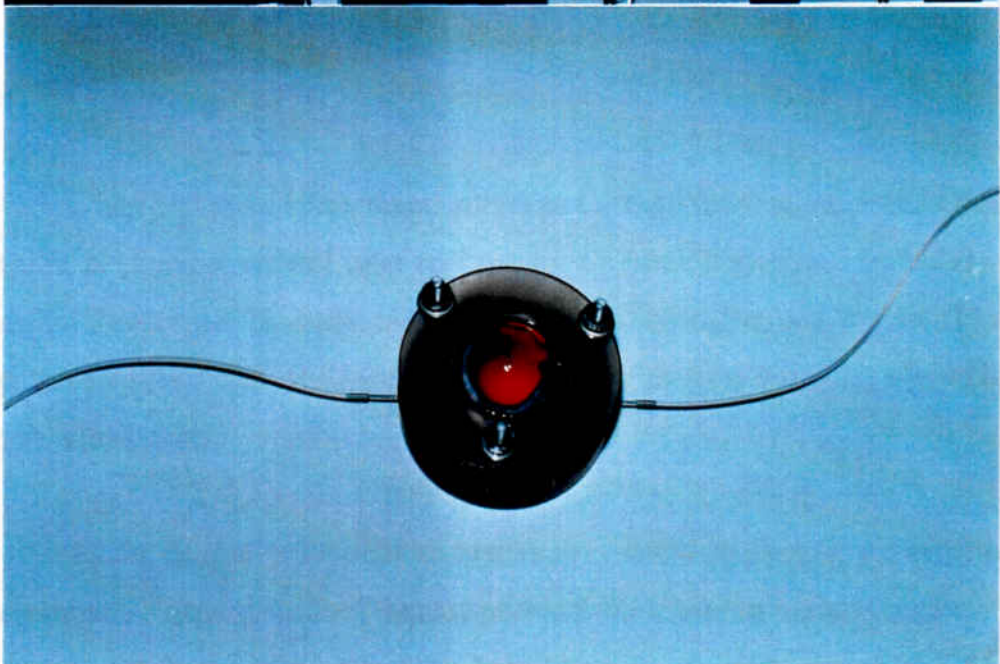
Per a les significacions estadístiques entre punts homòlegs de dos protocols diferents s'ha utilitzat un test de ANOVA ordinari igualment corregit amb la correcció de Bonferroni. La significació s'ha establert en  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (xx),  $p < 0.001$  (xxx).



1



2



3

**Fotografia 1:** Ull enucleat (esquerra) i segment anterior (dreta) bovins. **Fotografia 2:** Muntatge experimental **Fotografia 3:** Segment anterior d'ull boví a la cambra de perfusió.

## 5. RESULTATS

### 5.1. Estudi de l'efecte de la Epinefrina.

L'estudi de l'efecte de la epinefrina sobre la facilitat d'evacuació de l'humor aquós, s'ha utilitzat com a punt de partida en aquest estudi. El motiu de l'utilització d'aquesta droga en patologies relacionades amb l'evacuació de l'humor aquós ja ha estat mencionat en anteriors apartats i, a més, existeixen dades d'aquest efecte en estudis d'altres autors (Erickson-Lamy, 1992). Així, tant com a punt de partida o com a control, és important l'efecte de la epinefrina per a la interpretació posterior d'altres resultats.

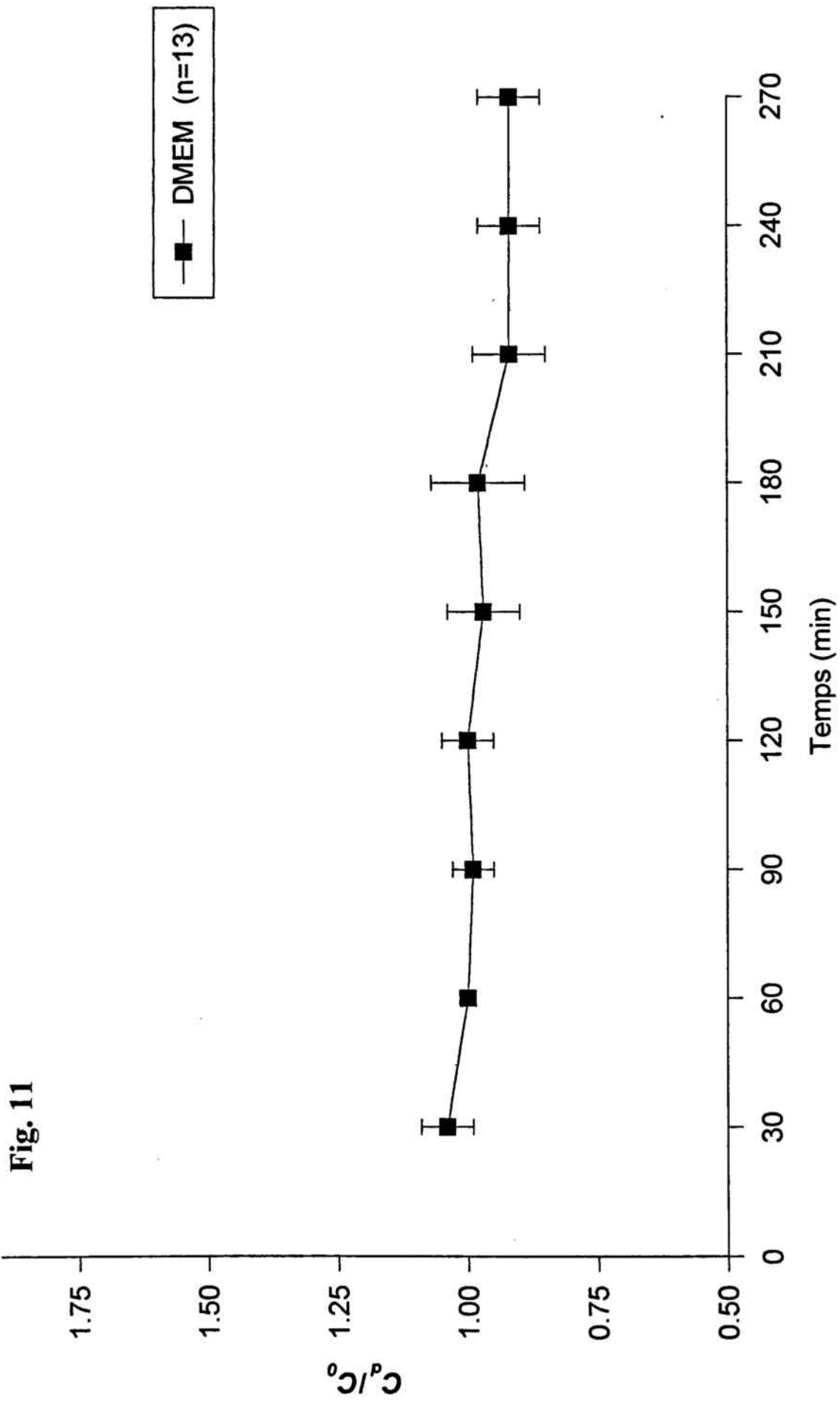
#### 5.1.1. Controls.

Com a control de tots els protocols en que s'ha utilitzat alguna droga s'han realitzat diversos grups controls, que s'han utilitzat per a comparar els possibles efectes de les diferents drogues respecte als mateixos protocols però en absència de la droga en qüestió.

##### *Control basal:*

S'han perfundit 13 segments anteriors bovins amb medi de cultiu DMEM seguint el protocol control citat en l'apartat 4.5. dels Materials i Mètodes. La facilitat d'evacuació es manté al llarg de tot el protocol (Taula 1, Figura 11) i no existeixen diferències significatives entre la facilitat en el minut 60 i la facilitat en els altres punts.

El fet de que la facilitat es mantingui estable al llarg de tot el període experimental permet utilitzar aquest protocol com a grup control respecte als protocols en els que s'avalua l'efecte d'una droga.



**Fig. 11**

TEMPS DE PERFUSSIÓ (min)

Perfusions control	n	TEMPS DE PERFUSSIÓ (min)												
		30	60	90	120	150	180	210	240	270				
Facilitat d'evacuació														
<i>DMEM</i>	13	1.22±0.22	1.08±0.22	1.02±0.20	1±0.19	0.96±0.18	0.92±0.18	0.92±0.18	0.92±0.18	0.91±0.18	0.88±0.18			
					Vehicles									
<i>Etanol 1%</i>	7	0.69±0.29	0.69±0.29	0.69±0.30	0.66±0.29	0.66±0.28	0.71±0.30	0.68±0.27	0.77±0.32	0.77±0.32	0.79±0.32			
<i>DMSO 1%</i>	5	0.77±0.23	0.74±0.21	0.71±0.21	0.69±0.20	0.74±0.22	0.63±0.18	0.69±0.24	0.71±0.25	0.71±0.25	0.71±0.25			
Ratio														
<i>DMEM</i>	13	1.05±0.05	1±0	0.99±0.04	1±0.05	0.98±0.07	0.92±0.07	0.92±0.06	0.92±0.06	0.92±0.06	0.90±0.05			
					Vehicles									
<i>Etanol 1%</i>	7	1±0.02	1±0	1±0.01	0.97±0.07	0.96±0.02	1.02±0.03	1.05±0.08	1.04±0.03	1.04±0.03	1.04±0.04			
<i>DMSO 1%</i>	5	1.03±0.03	1±0	0.94±0.02	0.92±0.03	1.01±0.06	1.08±0.08	0.99±0.08	1.03±0.09	1.03±0.09	1.02±0.08			



Cal destacar que en tot el període de perfusió no es produeix el fenomen anomenat *washout*, que es defineix com un augment progressiu de la facilitat d'evacuació en el temps degut a un efecte de rentat de les proteïnes i altres materials extracel·lulars de la xarxa trabecular.

#### *Control dels vehicles utilitzats:*

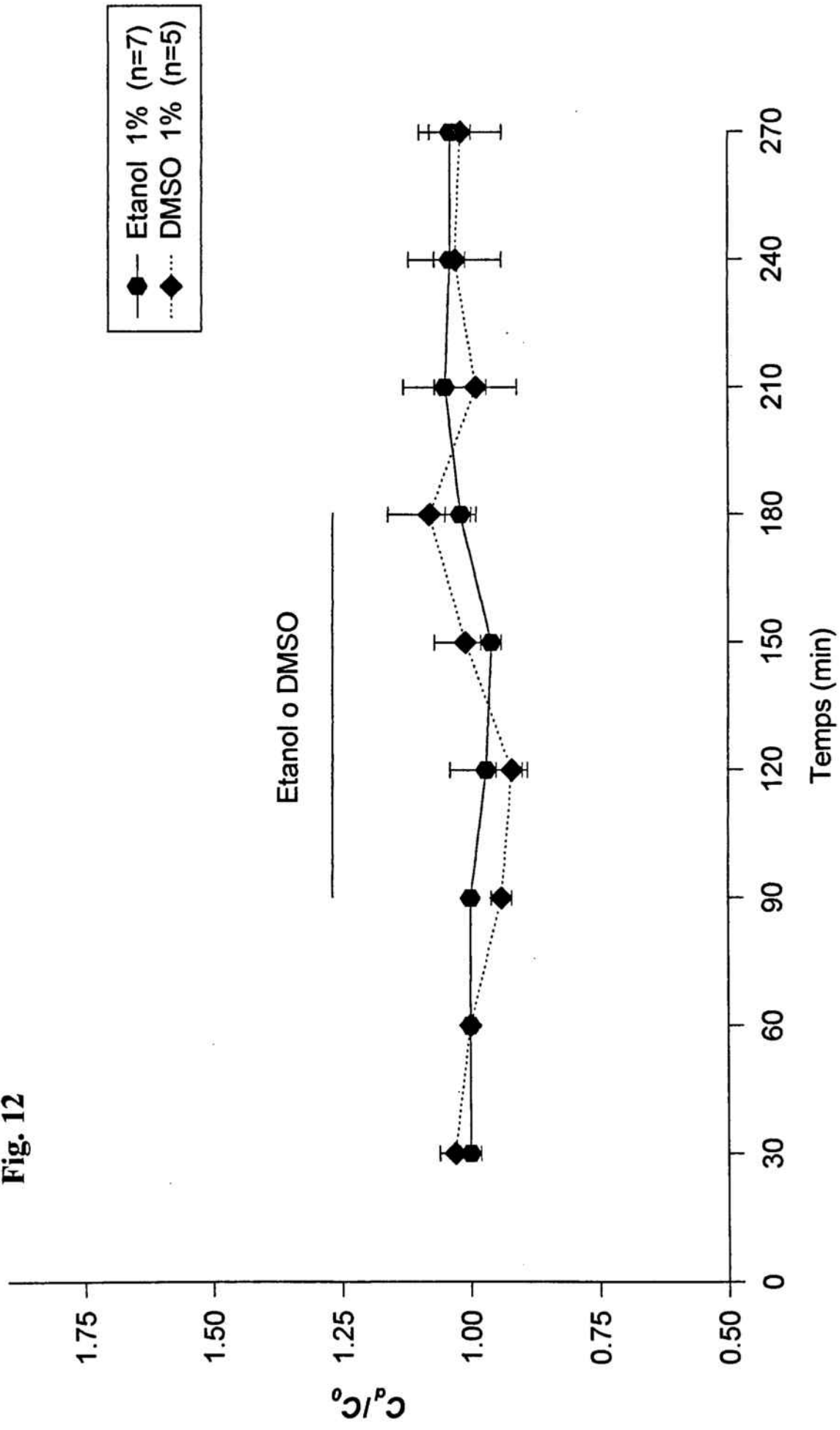
Com s'ha dit anteriorment s'han utilitzat, en alguns experiments, cosolvents com a vehicles per ajudar a la predissolució de les drogues utilitzades. Com a conseqüència d'aquesta utilització s'han realitzat un grup control per a cada vehicle utilitzat, en que s'ha afegit al medi de perfusió habitual, el vehicle en la concentració final a que es troba en el medi de perfusió quan s'utilitza en un protocol amb droga.

#### *Etanol:*

S'han perfundit 7 segments anteriors seguint el protocol experimental de tipus 1 amb la única diferència que en aquest cas no s'ha afegit la droga, sinó només l'etanol (1%). En la perfusió amb etanol no s'han observat canvis significatius en la facilitat d'evacuació durant tot el període de perfusió amb el vehicle ni tampoc en el període posterior de perfusió amb medi control (Taula 1, Figura 12).

L'anàlisi estadístic dels experiments realitzats en aquest grup, no mostra cap significació estadística respecte al minut 60 del primer període de perfusió d'aquest protocol. Tampoc s'obtenen significacions estadístiques quan es compara la perfusió amb etanol i la perfusió amb medi control DMEM.

Fig. 12



### *DMSO (dimetilsulfòxid):*

La perfusió de 5 segments anteriors oculars amb medi de cultiu al que se li ha afegit el vehicle utilitzat (DMSO 1%), seguint el protocol experimental de tipus 1, no mostra diferències estadísticament significatives respecte a la perfusió en absència del vehicle (Taula 1, Figura 12). Tampoc el període de perfusió amb medi, després de la perfusió amb medi que conté DMSO, mostra diferències significatives respecte als altres dos períodes anteriors.

L'anàlisi estadístic, igual que en el cas de l'etanol, no mostra diferències significatives, ni dins del mateix protocol ni quan aquest protocol es compara amb la perfusió amb medi DMEM.

#### **5.1.2. Comprovació de resultats previs: Perfusió amb Epinefrina**

En aquest grup experimental s'ha utilitzat epinefrina a la dosi de  $10^{-6}$ M. S'ha seguit el protocol experimental de tipus 1 que consta de un període de *Baseline*, seguit per 90 minuts de perfusió amb medi que conté epinefrina  $10^{-6}$ M i un altre període de perfusió amb medi sense droga per finalitzar.

El resultat de la perfusió (Taula 2, Figura 13) mostra com als 30 minuts de perfusió en presència de droga, la facilitat d'evacuació augmenta en un 22% ( $p < 0.05$ ), per seguir augmentant fins a un 27% ( $p < 0.01$ ) en el segon període del protocol. En l'últim període del protocol la facilitat d'evacuació continua elevada en valors similars als assolits en el temps de perfusió amb la droga.

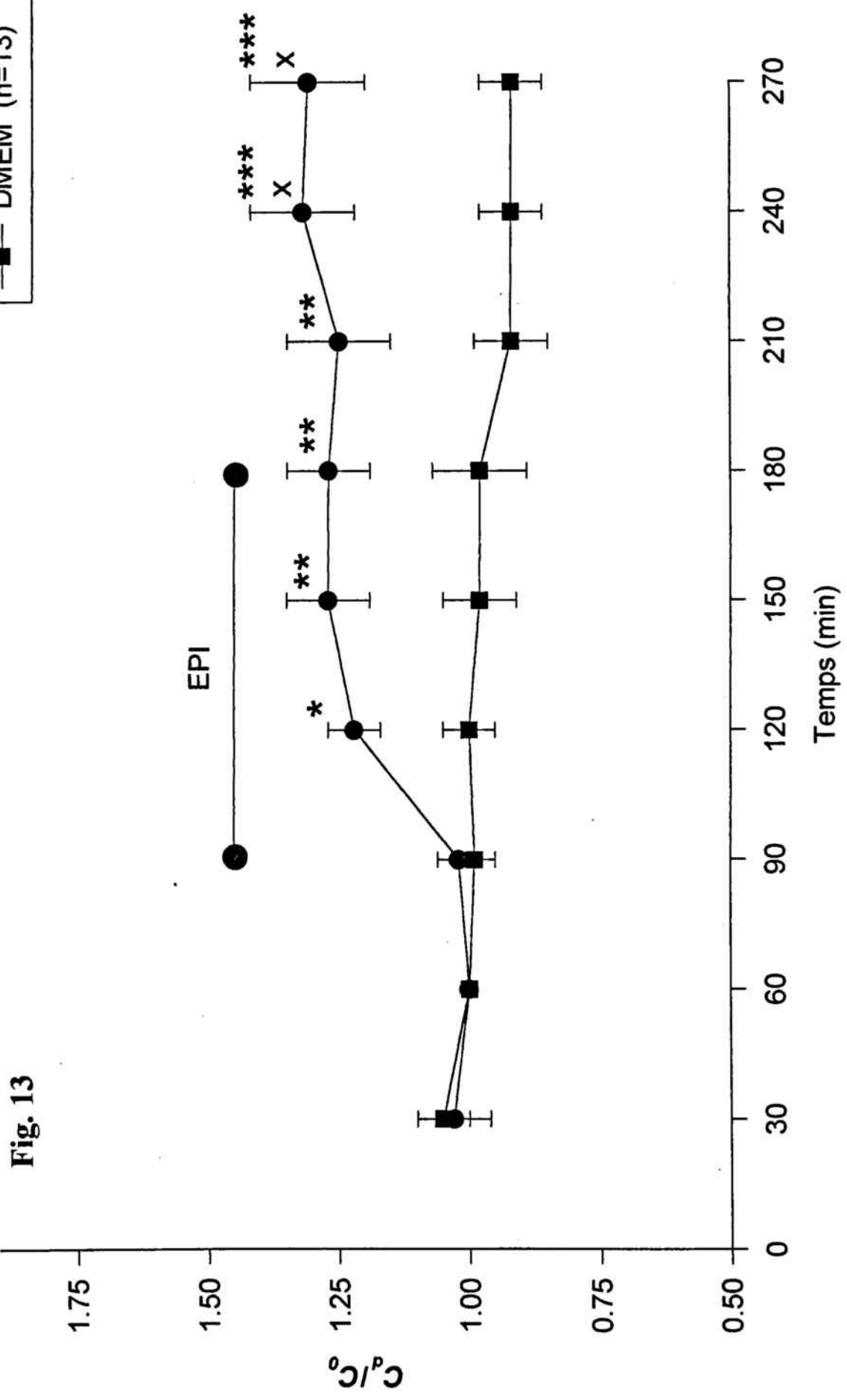


Fig. 13

● EPI  $10^{-6}M$  (n=6)  
 ■ DMEM (n=13)

Droga	n	BASELINE				DROGA				RETURN				
		30	60	90	120	150	180	210	240	270				
Facilitat d'evacuació														
<i>EPINEFRINA 10<sup>-6</sup> M</i>	6	0.71±0.23	0.69±0.23	0.71±0.24	0.83±0.26	0.92±0.32	0.94±0.35	0.94±0.35	0.99±0.36	1±0.38				
Ratio														
<i>EPINEFRINA 10<sup>-6</sup> M</i>	6	1.03±0.07	1±0	1.02±0.04	1.22±0.05	1.27±0.08	1.27±0.08	1.25±0.1	1.32±0.1	1.31±0.11				

Taula 2

En aquest grup experimental s'han realitzat comparacions estadístiques de dues maneres: dins del propi grup i entre aquest grup i el grup control, com es mostra en la Figura 13.

Les comparacions s'han realitzat entre el minut 60 de perfusió amb medi control (*Baseline*) i els altres punts de la corba, sempre utilitzant les dades en forma de *Ratio*. Existeixen punts significatius en els minuts 120 ( $p < 0.05$ ), 150 ( $p < 0.01$ ), 180 ( $p < 0.01$ ), 210 ( $p < 0.01$ ), 240 ( $p < 0.001$ ) i 270 ( $p < 0.001$ ) com es mostra en la Figura 13.

També existeixen diferències significatives entre la corba de perfusió amb epinefrina i la corba control, en els minuts 240 ( $p < 0.05$ ) i 270 ( $p < 0.05$ ). Aquestes dades mostren com efectivament la epinefrina augmenta la facilitat d'evacuació en segments anteriors perfundits *in vitro*, cosa que concorda amb les dades d'altres autors anteriorment mencionats.

## **5.2. Estudi de la participació de l'AMPc en la regulació de la facilitat d'evacuació.**

Per a la realització d'aquests estudis s'han utilitzat drogues que actuen en diferents punts de la cascada de reaccions intracel·lulars que provoquen la síntesi de l'AMPc i la degradació del mateix. D'aquesta manera, mitjançant l'activació o bé la inhibició d'algunes reaccions s'ha augmentat la concentració intracel·lular d'aquest segon missatger, la presència del qual sembla tenir conseqüències sobre la facilitat d'evacuació.

### **5.2.1. Forskolina**

Aquesta droga, la forskolina, actua a nivell intracel·lular activant l'enzim adenilat ciclase, la qual és l'encarregada de la síntesi del segon missatger AMPc.

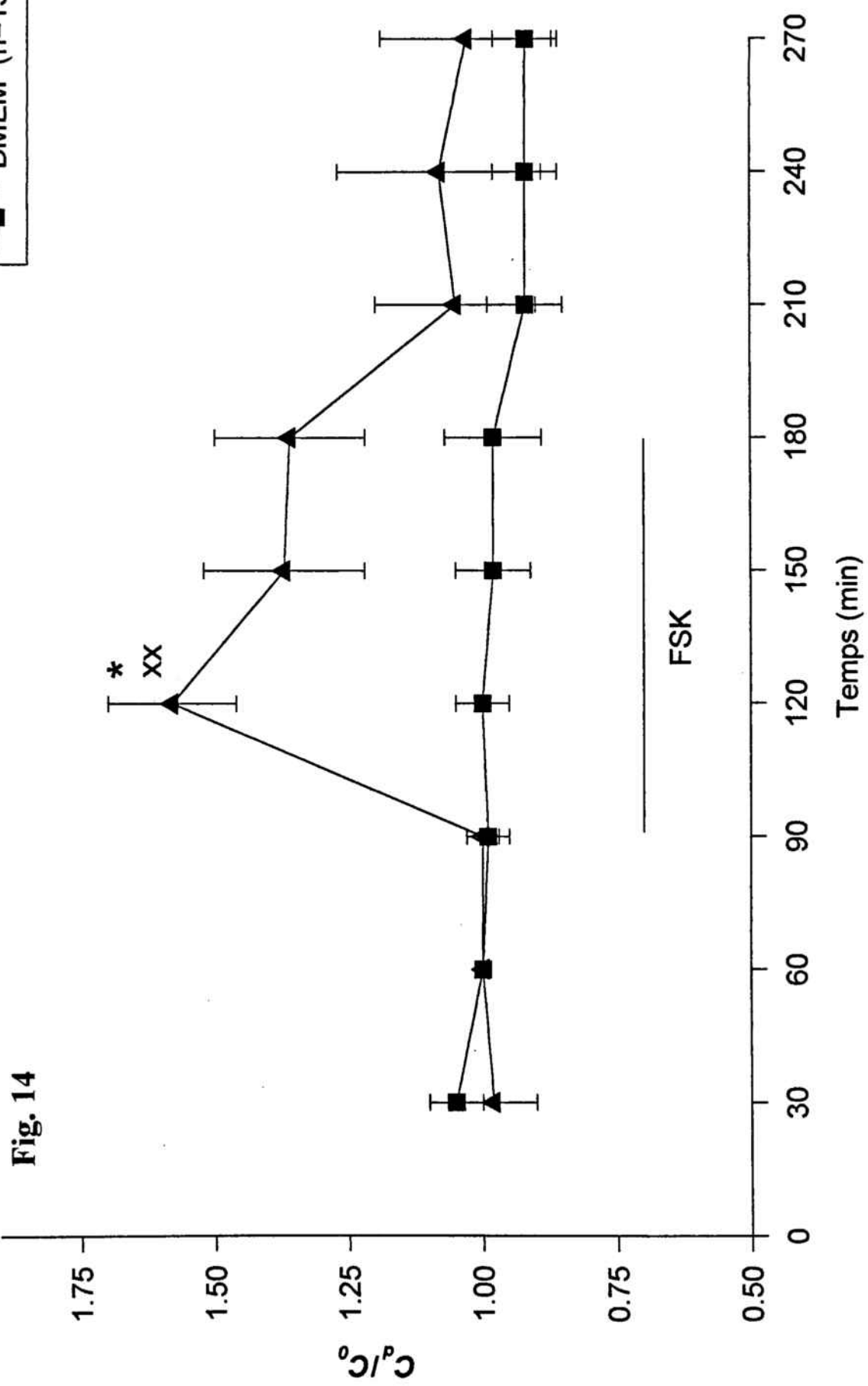


Fig. 14

▲ FSK  $10^{-5}M$  (n=6)  
 ■ DMEM (n=13)

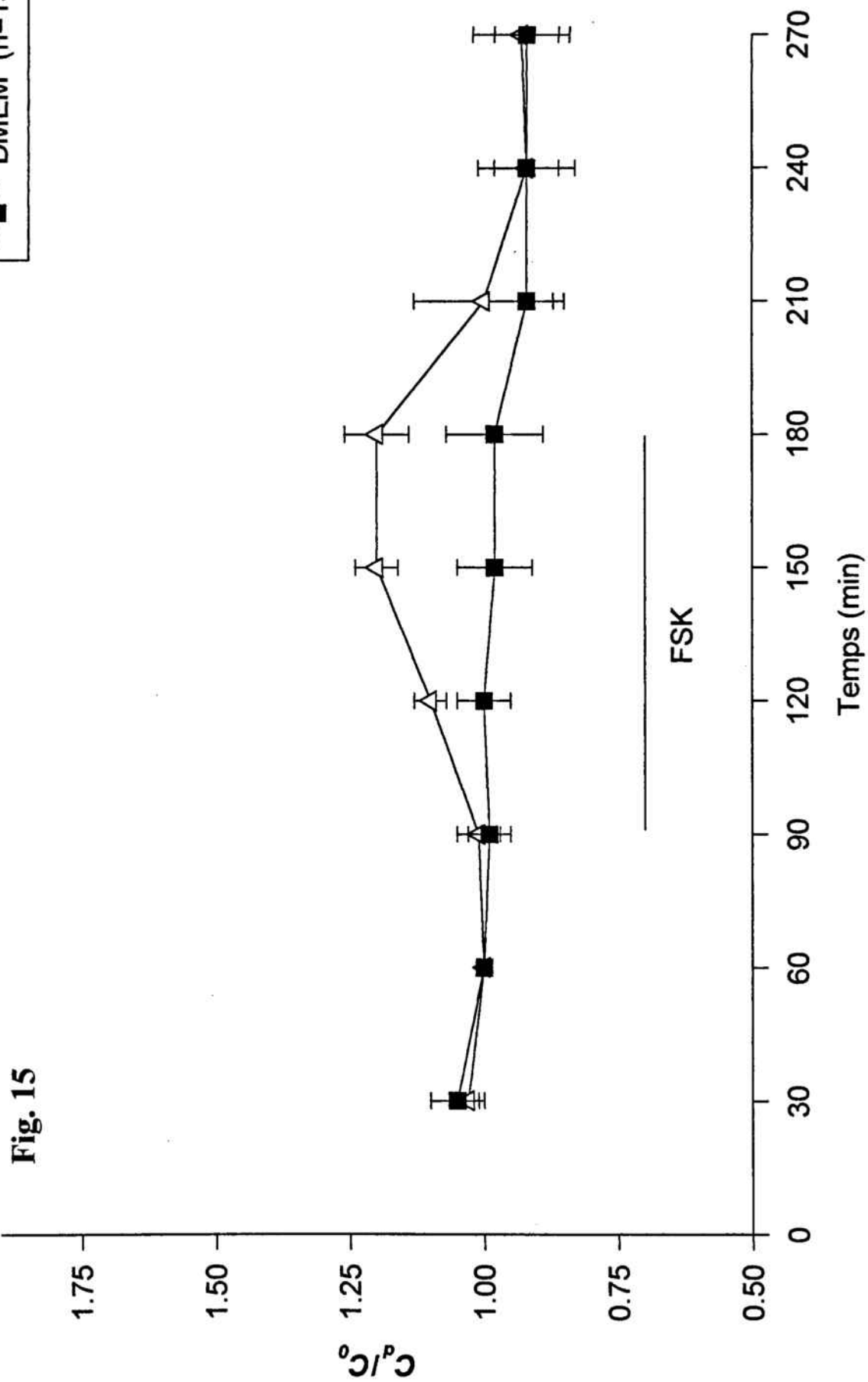


Fig. 15

$\triangle$  FSK  $10^{-6}M$  (n=6)  
 $\blacksquare$  DMEM (n=13)



Droga	n	BASELINE					DROGA					RETURN					
		30	60	90	120	150	180	210	240	270							
Facilitat d'evacuació																	
<i>FORSKOLINA 10<sup>-5</sup> M</i>	6	0.98±0.23	0.89±0.19	0.9±0.19	1.42±0.28	1.17±0.17	1.15±0.19	1.01±0.25	0.95±0.17	0.95±0.24							
<i>FORSKOLINA 10<sup>-6</sup> M</i>	6	1.18±0.23	1.15±0.23	1.22±0.28	1.25±0.25	1.33±0.28	1.39±0.29	1.15±0.30	1.13±0.28	1.18±0.31							
<i>db-AMPC 10<sup>-6</sup> M</i>	6	0.8±0.18	0.87±0.19	0.84±0.19	1.14±0.29	1.36±0.33	1.31±0.36	1.20±0.28	1.37±0.35	1.30±0.32							
<i>db-AMPC 10<sup>-7</sup> M</i>	6	0.9±0.16	0.85±0.13	0.93±0.14	1.14±0.18	1.17±0.17	1.28±0.23	0.98±0.15	1.12±0.17	1.06±0.16							
<i>IBMX 10<sup>-6</sup> M</i>	6	0.50±0.15	0.56±0.19	0.58±0.20	0.63±0.21	0.66±0.19	0.67±0.20	0.64±0.20	0.69±0.20	0.70±0.20							
Ratio																	
<i>FORSKOLINA 10<sup>-5</sup> M</i>	6	0.98±0.08	1±0	1±0.03	1.58±0.12	1.37±0.15	1.36±0.14	1.05±0.15	1.08±0.19	1.03±0.16							
<i>FORSKOLINA 10<sup>-6</sup> M</i>	6	1.03±0.02	1±0	1.01±0.04	1.10±0.03	1.2±0.04	1.20±0.06	1±0.13	0.92±0.09	0.93±0.09							
<i>db-AMPC 10<sup>-6</sup> M</i>	6	0.97±0.07	1±0	0.98±0.07	1.28±0.16	1.52±0.22	1.43±0.12	1.44±0.13	1.58±0.13	1.43±0.09							
<i>db-AMPC 10<sup>-7</sup> M</i>	6	1.03±0.03	1±0	1.08±0.04	1.33±0.06	1.43±0.10	1.48±0.09	1.18±0.13	1.35±0.13	1.25±0.15							
<i>IBMX 10<sup>-6</sup> M</i>	6	0.94±0.07	1±0	1.05±0.04	1.14±0.03	1.26±0.07	1.27±0.07	1.20±0.07	1.33±0.08	1.36±0.09							

Taula 3

Per tant l'estimulació d'aquest enzim provocarà un augment en la concentració intracel·lular d'AMPc.

La perfusió amb aquesta droga s'ha realitzat seguint el protocol experimental de tipus 1 i s'han utilitzat dues concentracions de la mateixa:  $10^{-5}M$  i  $10^{-6}M$ . S'han perfundit 6 cambres anteriors oculars bovines per a cada concentració de la droga.

La concentració major de forskolina produeix un increment de la facilitat d'evacuació (Taula 3, Figura 14), ja des de l'inici del període, en un 57% ( $p < 0.05$ ). Aquest punt també és molt significatiu respecte a la perfusió control sense la droga ( $p < 0.01$ ). Posteriorment la facilitat resta elevada però en uns valors lleugerament inferiors (36%). En el període següent la facilitat es recupera fins a assolir valors molt lleugerament per sobre dels basals.

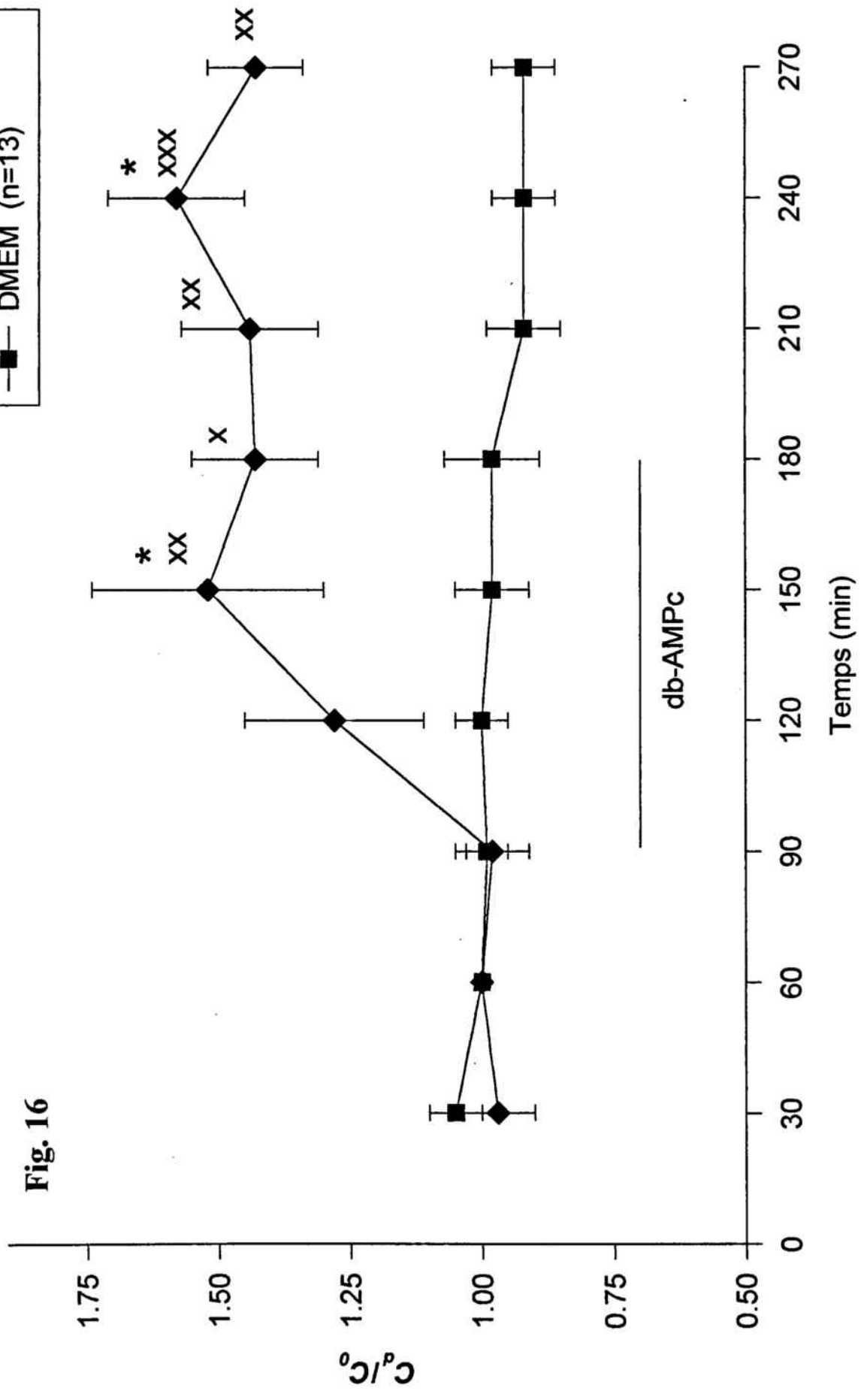
La concentració menor de la droga ( $10^{-6}M$ ) també produeix un augment de la facilitat d'evacuació (Taula 3, Figura 15), encara que aquest increment en la facilitat és inferior al produït per la concentració major i no mostra significacions estadístiques. En el període de perfusió amb la droga, la facilitat augmenta en un 20%. En el període post droga, la facilitat recupera totalment els valors basals.

Tenint en compte aquestes dades, sembla ser que l'augment de l'AMPc provoca un increment en la facilitat d'evacuació i que l'augment produït per la forskolina sembla ser dosi dependent.

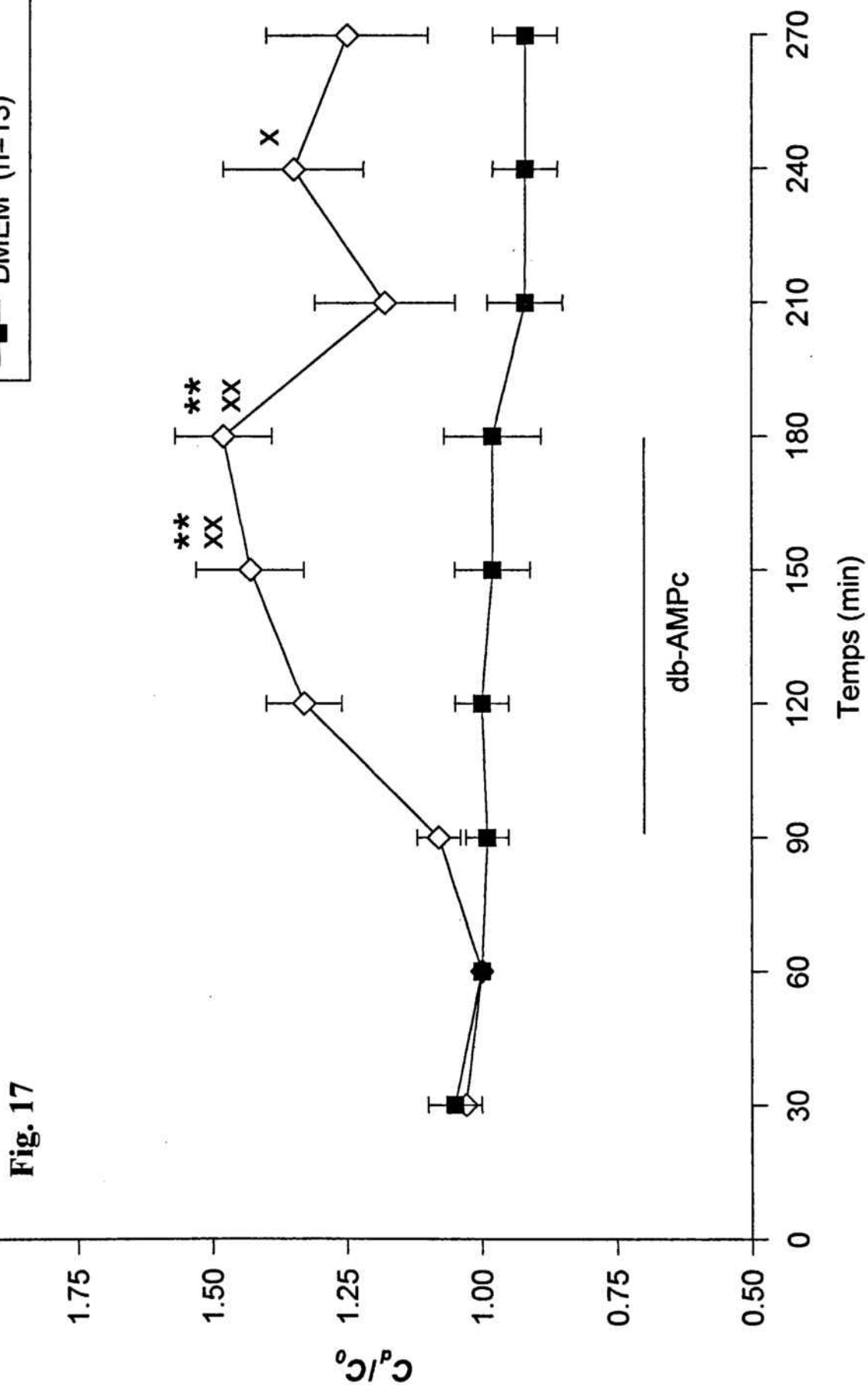
### **5.2.2. Dibutiril-AMPc.**

El dibutiril-AMPc està considerada una droga que actua com un anàleg de l'AMPc. Aquesta droga és capaç d'atravessar la membrana de la cèl·lula i actuar com a segon missatger, com ho fa l'AMPc.

Fig. 16



◆ db-AMPC  $10^{-6}M$  (n=6)  
■ DMEM (n=13)



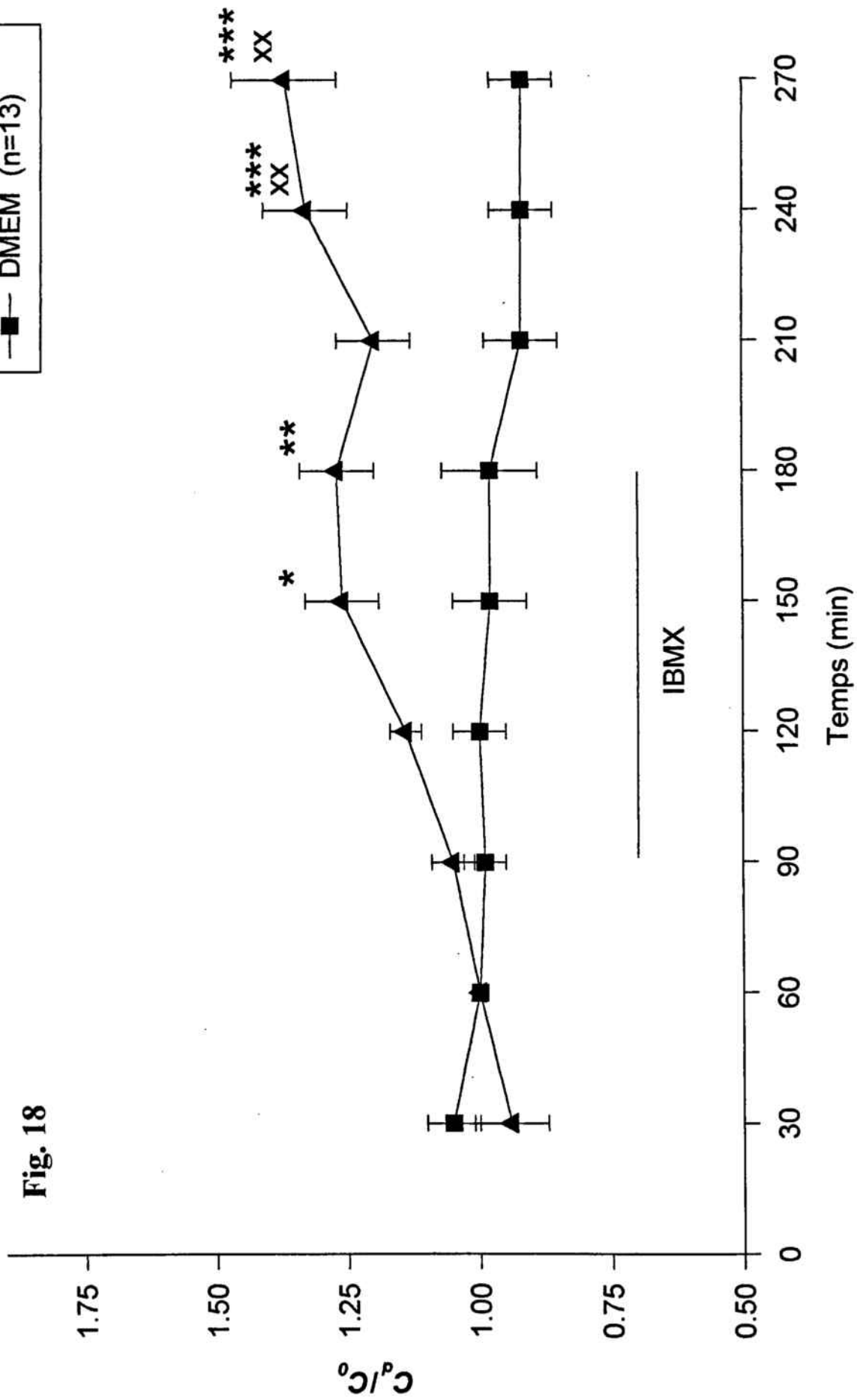
Per a aquesta droga s'han assajat dues concentracions,  $10^{-6}\text{M}$  i  $10^{-7}\text{M}$  i s'ha seguit en ambdós grups experimentals el protocol experimental de tipus 1.

La dosi de  $10^{-6}\text{M}$  produeix un augment progressiu de la facilitat d'evacuació (Taula 3, Figura 16) que incrementa en un 28% als 30 minuts de perfusió amb la droga i en un 52% als 60 minuts ( $p<0.05$ ). En el període de perfusió post droga, la facilitat resta elevada per sobre de la facilitat basal en valors similars assolits en el període de perfusió amb la droga. La perfusió en presència de la droga s'ha comparat amb la perfusió en absència de la mateixa, cosa que mostra diferències estadísticament significatives en els minuts 150 ( $p<0.01$ ), 180 ( $p<0.05$ ), 210 ( $p<0.01$ ), 240 ( $p<0.001$ ) i 270 ( $p<0.01$ ).

La perfusió amb dibutiril-AMPc a la concentració de  $10^{-7}\text{M}$  s'ha realitzat amb la intenció de poder veure un retorn de la facilitat d'evacuació als valors basals en el període de perfusió post droga. El resultat de la perfusió amb aquesta concentració mostra com, igual que en el cas anterior, la facilitat d'evacuació augmenta des de l'inici de la perfusió amb droga (Taula 3, Figura 17). Així als 30 minuts de perfusió amb droga, la facilitat ha augmentat un 33%, un 43% ( $p<0.01$ ) als 60 minuts i un 48% ( $p<0.01$ ) als 90 minuts. En el període de perfusió post droga la facilitat decreix però no s'arriben a recuperar els valors basals, encara que no apareixen diferències estadísticament significatives.

Per a aquesta última concentració de la droga, també es troben significacions estadístiques respecte a la perfusió sense la droga en els minuts 150 ( $p<0.01$ ), 180 ( $p<0.01$ ) i 240 ( $p<0.05$ ).

Fig. 18



### **5.2.3. Isobutilmetilxantina (IBMX).**

La isobutilmetilxantina és una droga, el mecanisme d'actuació de la qual és la inhibició de l'enzim encarregat de la degradació de l'AMPc, la fosfodiesterasa. Aquesta droga és capaç de penetrar dins de la cèl·lula i inhibir l'acció de l'enzim, la qual cosa provoca que s'acumuli l'AMPc al no degradar-se.

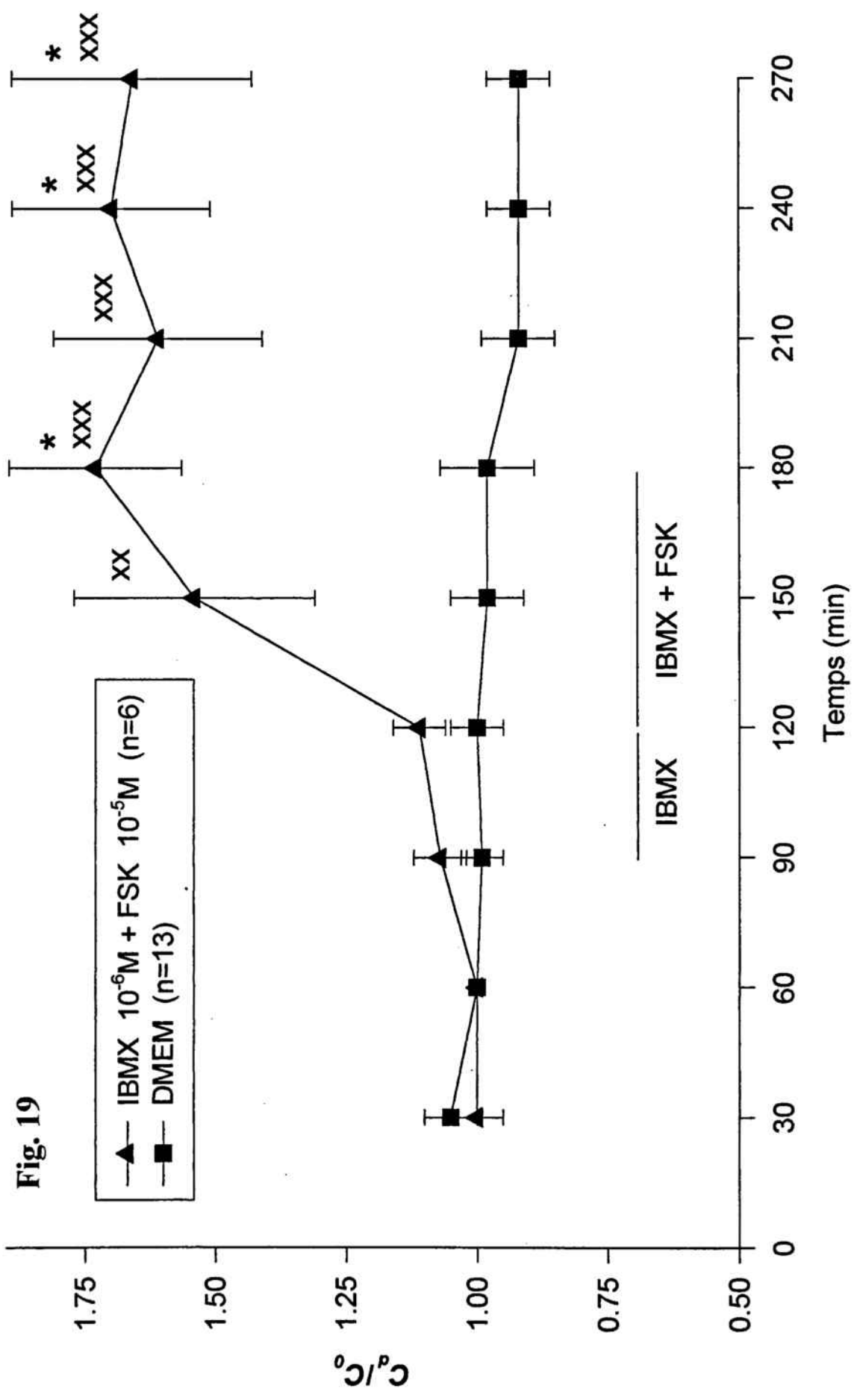
Per aquest grup experimental s'han realitzat un total de 6 casos, seguint el protocol experimental de tipus 1. La concentració de droga utilitzada ha estat de  $10^{-6}$ M.

Els resultats obtinguts (Taula 3, Figura 18) mostren com en el període de perfusió amb la droga, la facilitat augmenta fins a obtenir en el minut 150 un 26% ( $p < 0.05$ ) d'increment de la facilitat respecte a la facilitat basal i en el 180 un 27% ( $p < 0.01$ ). En el període següent de perfusió post droga, la facilitat continua elevada i trobem punts estadísticament significatius ( $p < 0.001$ ) en els minuts 240 i 270. Aquests últims punts també són estadísticament significatius respecte a la perfusió control sense la droga ( $p < 0.01$ ).

Tant els resultats obtinguts amb aquesta droga com amb l'anterior, semblen mostrar com l'acumulació de l'AMPc, en les cèl·lules del teixit que es sotmet a perfusió, té un efecte d'increment de la facilitat d'evacuació.

### **5.2.4. Forskolina + Isobutilmetilxantina.**

En aquest grup experimental, s'ha avaluat l'efecte sobre la facilitat d'evacuació de la mescla de dues de les drogues anteriorment utilitzades. La utilització de les dues drogues conjuntament tindria, teòricament, un efecte additiu sobre la concentració intracel·lular de AMPc. Per una banda, la forskolina incrementa la síntesi d'aquest segon missatger i d'altra banda, la isobutilmetilxantina n'inhibeix la degradació, per la qual cosa l'efecte total és un increment de la concentració intracel·lular del segon missatger.





Droga	n	BASELINE					DROGA			RETURN		
		30	60	90	120	150	180	210	240	270		
Facilitat d'evacuació						IBMX	IBMX + FSK o EPI					
<i>IBMX 10<sup>-6</sup> M + FSK 10<sup>-5</sup> M</i>	6	1.32±0.34	1.52±0.56	1.62±0.62	1.56±0.53	2.10±0.57	2.20±0.53	1.95±0.43	2.14±0.55	2.12±0.56		
<i>IBMX 10<sup>-6</sup> M + EPI 10<sup>-6</sup> M</i>	6	0.61±0.16	0.62±0.20	0.63±0.22	0.72±0.25	0.84±0.28	0.94±0.31	0.95±0.30	1.03±0.31	1.04±0.31		
Ratio												
<i>IBMX 10<sup>-6</sup> M + FSK 10<sup>-5</sup> M</i>	6	1±0.05	1±0	1.07±0.05	1.11±0.05	1.54±0.24	1.73±0.20	1.61±0.20	1.70±0.22	1.66±0.23		
<i>IBMX 10<sup>-6</sup> M + EPI 10<sup>-6</sup> M</i>	6	1.04±0.05	1±0	1±0.03	1.14±0.04	1.30±0.11	1.47±0.12	1.54±0.14	1.70±0.16	1.70±0.16		

Taula 4

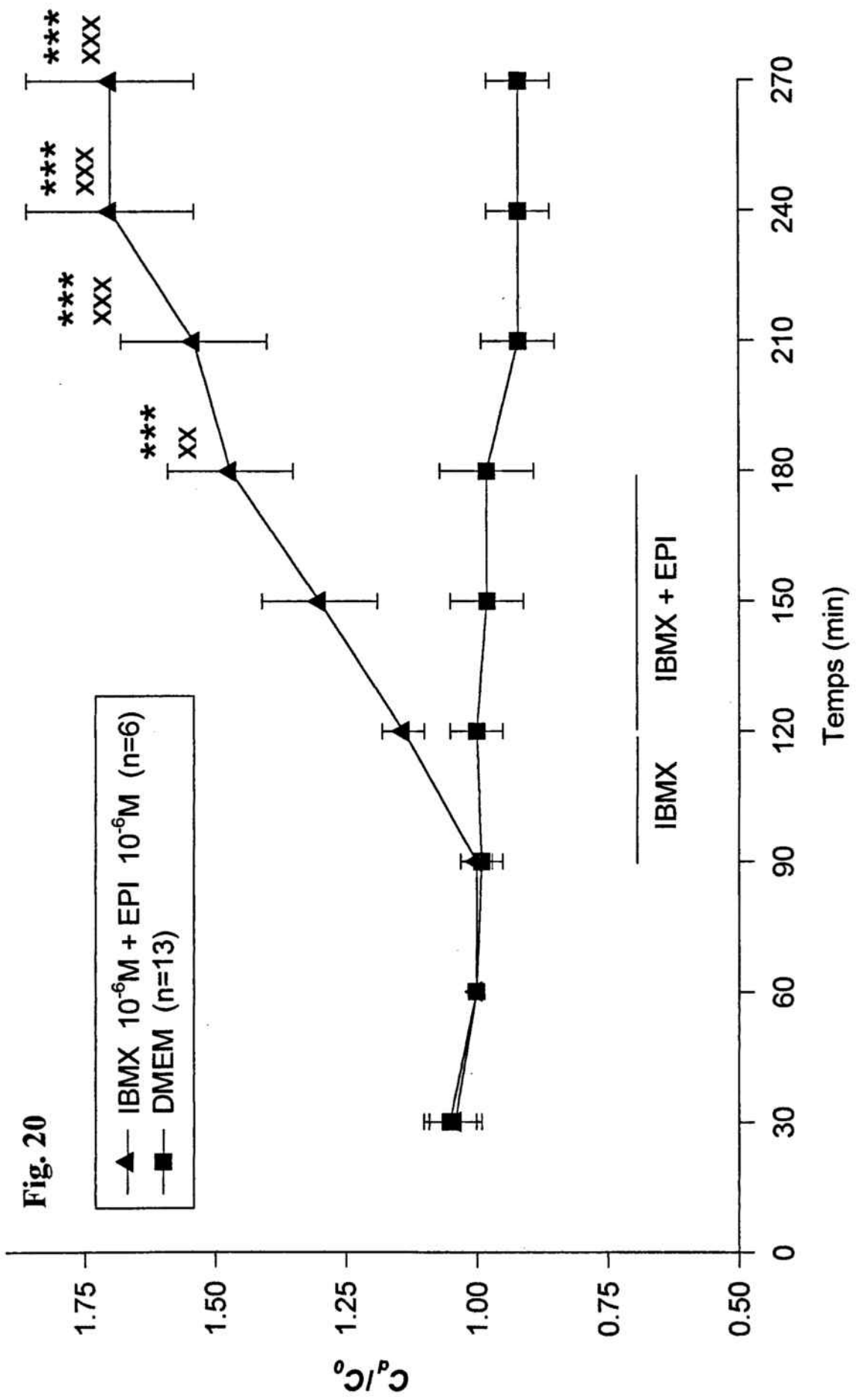
Per aquest grup s'ha utilitzat el protocol experimental de tipus 2, que consisteix en aquest cas en 90 minuts de perfusió amb medi DMEM, 30 minuts de perfusió amb IBMX, 60 minuts de perfusió amb IBMX i forskolina i finalment 90 minuts de perfusió post droga amb medi control.

Les concentracions utilitzades de les drogues han estat  $10^{-6}$ M per la IBMX i  $10^{-5}$ M per la forskolina i s'han perfundit un total de 6 segments anteriors oculars seguint aquest protocol.

Els resultats (Taula 4, Figura 19) mostren com en el període de 30 minuts de perfusió amb IBMX, la facilitat d'evacuació incrementa lleugerament en un 11%, molt similar al primer punt de perfusió del protocol de perfusió amb IBMX sol. El període següent de perfusió amb ambdues drogues, produeix un major increment de la facilitat fins a un 54% al minut 150 i 73% ( $p < 0.05$ ) al minut 180. Posteriorment a la perfusió amb les dues drogues, en el període de perfusió amb medi altre cop, la facilitat continua elevada en valors al voltant del 65% i s'observen diferències estadísticament significatives en els minuts 240 ( $p < 0.05$ ) i 270 ( $p < 0.05$ ).

Cal destacar que comparant aquesta corba amb la resultant de la perfusió amb IBMX sol, s'observen nombroses diferències estadísticament significatives en els minuts 150 ( $p < 0.01$ ), 180 ( $p < 0.001$ ), 210 ( $p < 0.001$ ), 240 ( $p < 0.001$ ) i 270 ( $p < 0.001$ ).

Analitzant aquests resultats, es pot interpretar que efectivament, com era d'esperar, les dues drogues tenen un efecte additiu que es manifesta en un increment de la facilitat d'evacuació.



### 5.2.5. Epinefrina + Isobutilmetilxantina.

Com es ben sabut, la epinefrina és capaç d'activar tant els receptors  $\alpha$ -adrenèrgics com els  $\beta$ -adrenèrgics. L'activació dels receptors  $\beta$ -adrenèrgics provoca, com a conseqüència, la síntesi de AMPc i per aquest motiu els efectes de les dues drogues d'aquest grup experimental podrien tenir un efecte similar al que s'ha vist en l'anterior grup, tenint en compte que l'augment de l'AMPc sembla provocar un augment de la facilitat d'evacuació, encara que això no vol dir que hagi de ser necessàriament a través d'aquests receptors.

Per aquest grup s'han perfundit 6 segments anteriors oculars seguint el protocol experimental de tipus 2. La concentració d'isobutilmetilxantina i epinefrina utilitzada ha estat de  $10^{-6}$ M.

El període de perfusió amb isobutilmetilxantina mostra com la facilitat d'evacuació incrementa en la mateixa magnitud que s'ha vist en altres grups (14%) (Taula 4, Figura 20). El següent període de perfusió amb les dues drogues alhora, mostra un increment progressiu de la facilitat obtenint-se en el minut 180 un valor estadísticament molt significatiu del 47% ( $p < 0.001$ ). Posteriorment, en el retorn a les condicions de perfusió basals la facilitat d'evacuació es manté elevada en valors entre el 50 i el 70%, tots ells estadísticament significatius ( $p < 0.001$ ).

D'altra banda, si es compara aquesta corba respecte a la perfusió amb IBMX sol, també s'obtenen significacions estadístiques en diferents punts de la corba com es mostra en la Figura 20.

### **5.3. Estudi de la participació dels receptors $\alpha_1$ -adrenèrgics en la regulació de la facilitat d'evacuació.**

Si tenim en compte el resultat de la perfusió amb epinefrina sobre la facilitat d'evacuació, es pot pensar que els possibles mecanismes d'actuació d'aquesta droga a nivell cel·lular pot ser via receptors de dos tipus:  $\alpha$  i  $\beta$  adrenèrgics.

En aquest estudi hem intentat discernir si els receptors  $\alpha_1$ -adrenèrgics tenen algun paper en la regulació de la facilitat d'evacuació.

#### **5.3.1. Metoxamina.**

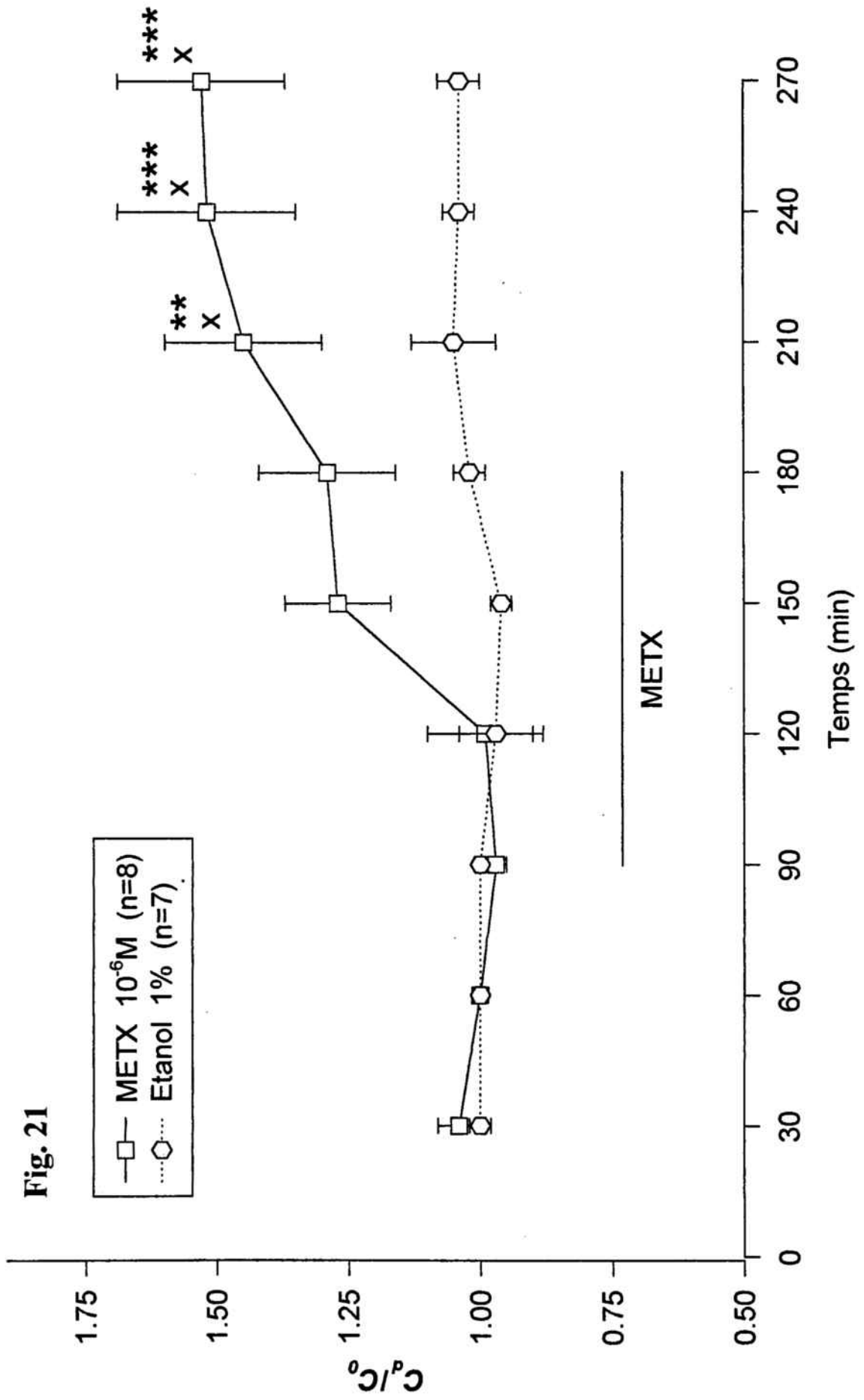
La metoxamina és una droga que actua com a agonista  $\alpha$ -adrenèrgic i és una de les drogues que té més selectivitat pels receptors  $\alpha_1$ -adrenèrgics respecte als receptors  $\alpha_2$ .

S'han perfundit, en aquest grup, 8 segments anteriors oculars bovins, seguint el protocol experimental de tipus 1 i s'ha utilitzat metoxamina a la concentració de  $10^{-6}$ M.

La perfusió amb aquesta droga mostra com en el període en que aquesta s'afegeix al medi, la facilitat d'evacuació no augmenta des dels primers 30 minuts, sinó que no és fins als 60 minuts quan la facilitat assoleix valors per sobre dels valors basals (27%) (Taula 5, Figura 21). En el període de perfusió post droga, la facilitat continua incrementant fins a valors al voltant del 50% en els minuts 210 ( $p < 0.01$ ), 240 ( $p < 0.001$ ) i 270 ( $p < 0.001$ ).

Si es compara la corba resultant d'aquesta perfusió amb el control de perfusió sense la droga, s'obtenen diferències estadísticament significatives en els minuts 210 ( $p < 0.05$ ), 240 ( $p < 0.05$ ) i 270 ( $p < 0.05$ ).

Fig. 21



Droga	n	BASELINE					DROGA					RETURN			
		30	60	90	120	150	180	210	240	270					
Facilitat d'evacuació															
<i>METOXAMINA 10<sup>-6</sup> M</i>	8	0.81±0.23	0.81±0.23	0.79±0.23	0.85±0.33	1±0.34	1.02±0.34	1.24±0.41	1.19±0.34	1.16±0.32					
<i>FEN 10<sup>-6</sup> M + METX 10<sup>-6</sup> M</i>	6	0.75±0.27	0.73±0.26	0.70±0.25	0.69±0.26	0.76±0.33	0.78±0.35	0.96±0.39	0.99±0.41	1.03±0.44					
<i>FEN 10<sup>-6</sup> M + EPI 10<sup>-6</sup> M</i>	5	0.62±0.15	0.64±0.18	0.63±0.19	0.67±0.21	0.69±0.21	0.70±0.23	0.75±0.25	0.51±0.25	0.49±0.25					
Ratio															
<i>METOXAMINA 10<sup>-6</sup> M</i>	8	1.05±0.04	1±0	0.97±0.02	0.99±0.11	1.27±0.1	1.29±0.13	1.44±0.15	1.52±0.17	1.53±0.16					
<i>FEN 10<sup>-6</sup> M + METX 10<sup>-6</sup> M</i>	6	1.05±0.03	1±0	0.96±0.02	0.93±0.04	0.92±0.1	1.02±0.17	1.18±0.11	1.24±0.08	1.28±0.1					
<i>FEN 10<sup>-6</sup> M + EPI 10<sup>-6</sup> M</i>	5	1±0.03	1±0	0.97±0.02	1.07±0.04	1.06±0.05	1.07±0.06	1.12±0.07	1.06±0.07	1.04±0.05					

Aquests resultats semblen implicar els receptors  $\alpha_1$ -adrenèrgics en la regulació de la facilitat d'evacuació.

### **5.3.2. Metoxamina + Fentolamina.**

La utilització d'una droga antagonista  $\alpha$ -adrenèrgic, sembla, lògicament, el següent pas per reconfirmar la hipòtesi anterior de la participació dels receptors  $\alpha_1$ -adrenèrgics en la regulació de la facilitat d'evacuació.

La fentolamina és una antagonista  $\alpha$ -adrenèrgic no selectiu pels receptors  $\alpha_1$  o  $\alpha_2$ , però ha estat utilitzada en altres estudis anteriorment i es coneix que no produeix cap efecte per si sola sobre la facilitat d'evacuació.

S'han utilitzat metoxamina  $10^{-6}$ M i fentolamina, també  $10^{-6}$ M, en un total de 6 segments anteriors oculars perfundits seguint el protocol experimental de tipus 2.

El període de perfusió amb fentolamina durant 30 minuts no mostra diferències entre la facilitat basal i la facilitat d'aquest període (Taula 5, Figura 22). Quan s'afegeix la metoxamina durant 60 minuts, l'efecte que produïa en l'anterior grup experimental, no es produeix en aquest cas o es produeix en menor grau. En el període post drogues, la facilitat augmenta lleugerament però sempre en valors inferiors a la perfusió amb metoxamina sola.

Aparentment existeix una reducció de la facilitat que induïa la metoxamina, després d'una perfusió prèvia amb fentolamina que s'ha mantingut durant 90 minuts en total. De qualsevol forma, aquesta reducció no és estadísticament significativa.



**Fig. 22**

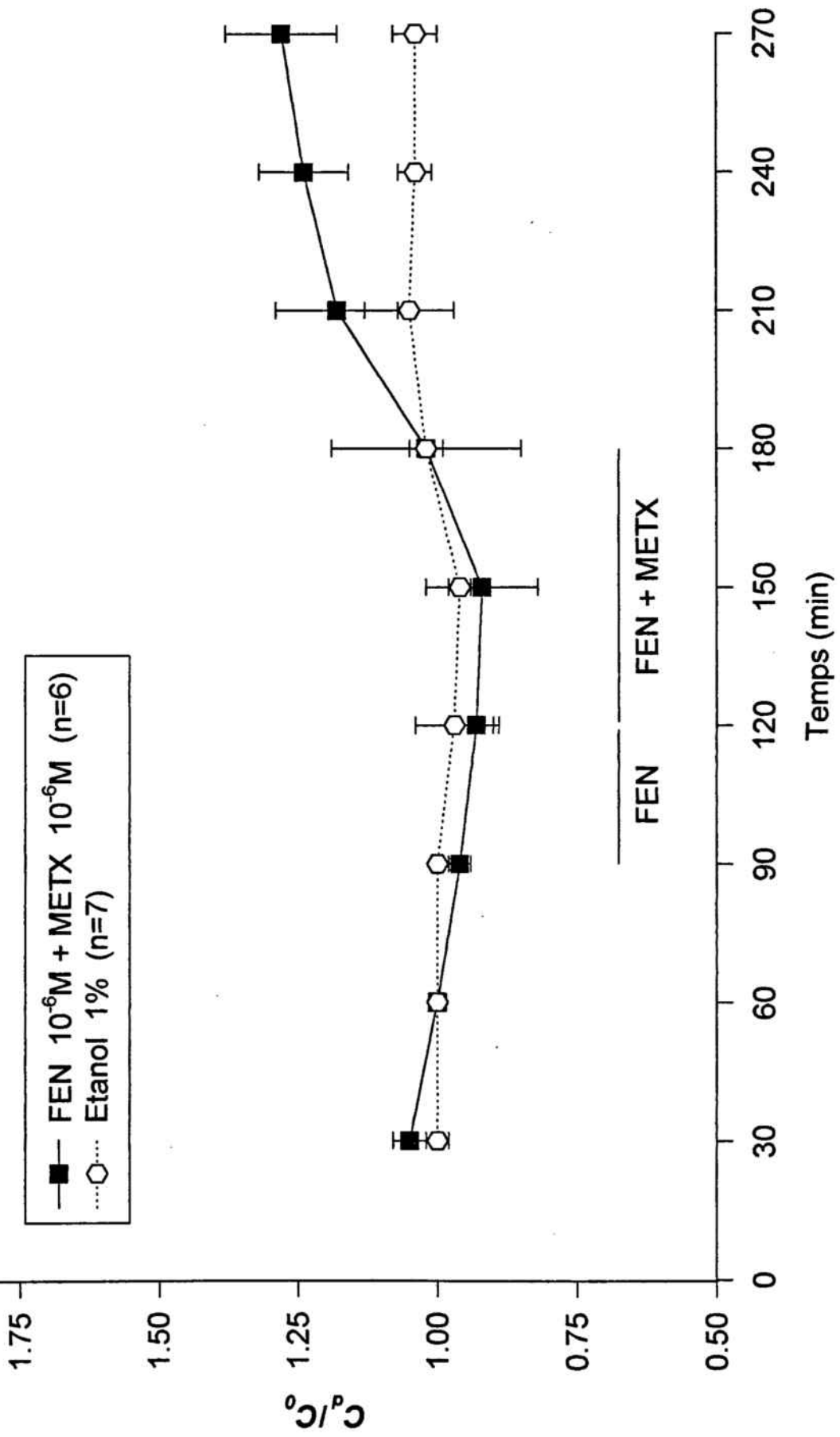
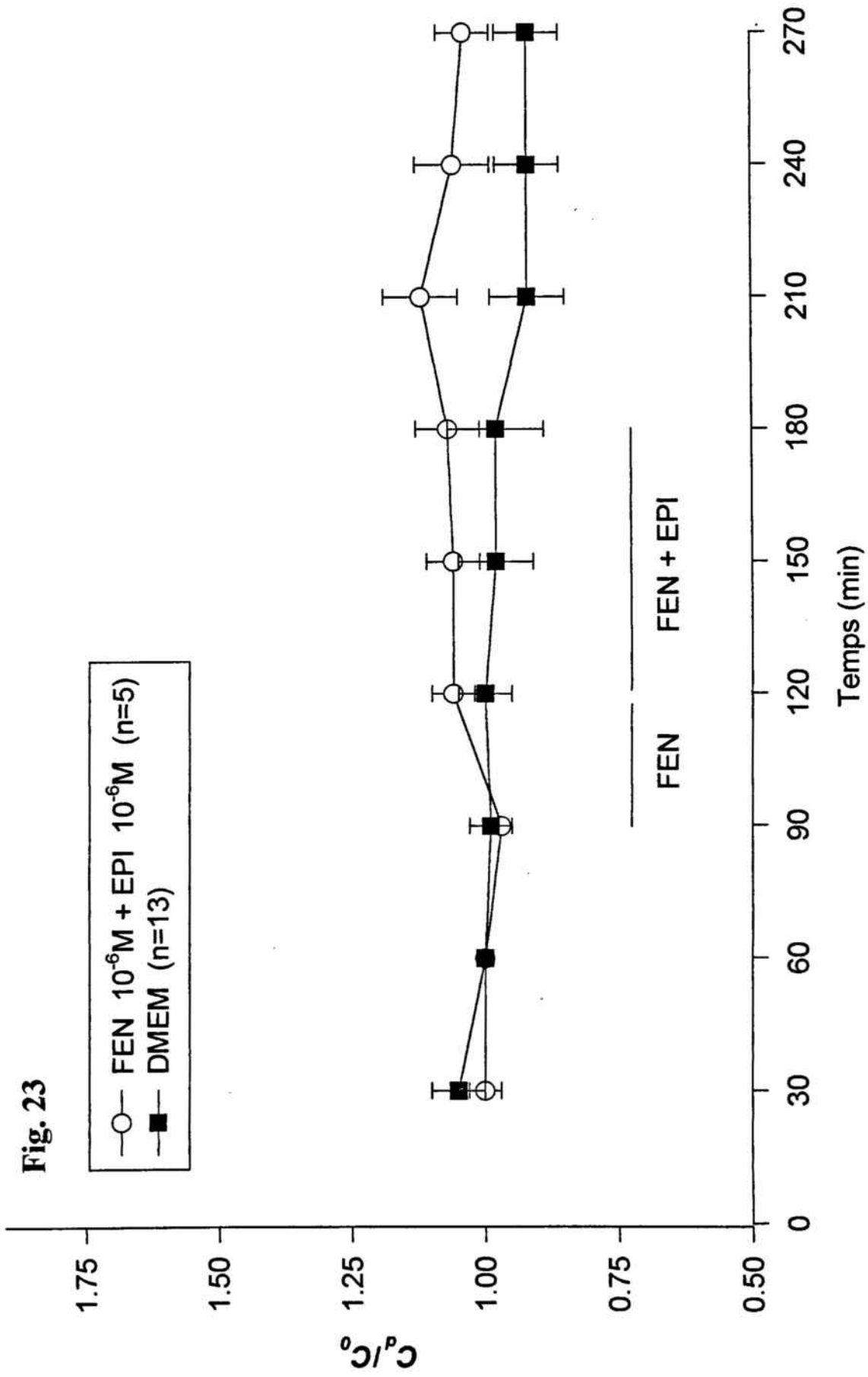


Fig. 23



### **5.3.3. Epinefrina + Fentolamina.**

Es ben conegut que la epinefrina té en la seva acció un component  $\alpha$ -adrenèrgic i per aquest motiu és d'interès veure si el antagonista  $\alpha$ -adrenèrgic és capaç de bloquejar l'efecte induït per aquesta droga.

Tant la epinefrina com la fentolamina s'han utilitzat a la concentració anteriorment utilitzada ( $10^{-6}M$ ), i s'han perfundit 5 segments anteriors oculars seguint el protocol experimental de tipus 2.

En el període de perfusió amb fentolamina, la facilitat d'evacuació no mostra diferències apreciables respecte a la facilitat basal (Taula 5, Figura 23). El següent període, l'efecte que induïa la epinefrina sembla bloquejat per la fentolamina i no existeixen diferències respecte a la facilitat basal. Per últim, la perfusió sense les drogues mostra un lleuger increment en la facilitat però molt inferior al produït per la epinefrina.

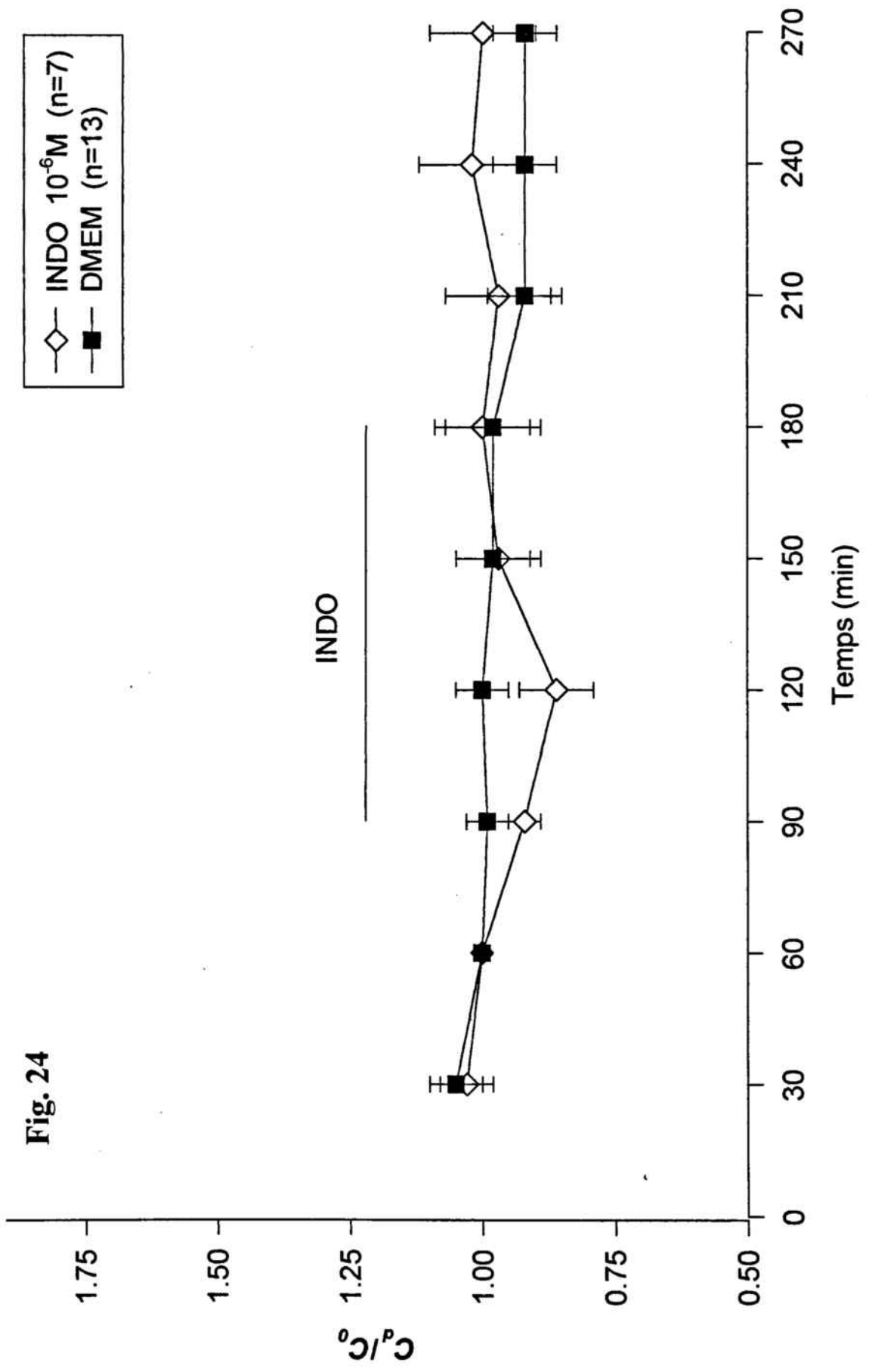
Si comparem aquesta corba amb la perfusió amb epinefrina sola, es pot apreciar com l'efecte induït per la epinefrina és bloquejat, quasi completament, per la fentolamina.

Per tant, les dades semblen mostrar que la epinefrina podria tenir un component  $\alpha$ -adrenèrgic en l'efecte sobre la facilitat d'evacuació.

### **5.4. Estudi de l'efecte de la indometacina en la regulació de la facilitat d'evacuació.**

Altres estudis han descrit que la síntesi de prostaglandines pot ser induïda després de l'activació de receptors  $\alpha$ -adrenèrgics. Aquesta possibilitat ha estat estudiada en part en els grups experiments que segueixen.

Fig. 24



Droga	n	BASELINE					DROGA					RETURN			
		30	60	90	120	150	180	210	240	270					
Facilitat d'evacuació															
INDOMETACINA $10^{-6}$ M	7	0.41±0.06	0.38±0.04	0.36±0.05	0.34±0.06	0.38±0.06	0.39±0.07	0.39±0.07	0.41±0.07	0.41±0.08					
INDO $10^{-6}$ M + EPI $10^{-6}$ M	6	0.71±0.13	0.71±0.14	0.66±0.16	0.66±0.15	0.67±0.16	0.67±0.18	INDO + EPI o METX	0.71±0.19	0.71±0.18	0.71±0.18				
INDO $10^{-5}$ M + METX $10^{-6}$ M	6	0.3±0.07	0.31±0.05	0.32±0.05	0.29±0.07	0.28±0.07	0.26±0.06		0.33±0.09	0.36±0.08	0.32±0.08				
INDO $10^{-6}$ M + METX $10^{-6}$ M	6	0.38±0.06	0.35±0.05	0.32±0.05	0.33±0.06	0.35±0.05	0.39±0.06		0.4±0.07	0.42±0.08	0.41±0.08				
Ratio															
INDOMETACINA $10^{-6}$ M	7	1.03±0.05	1±0	0.92±0.03	0.86±0.07	0.97±0.08	1±0.09		0.97±0.1	1.02±0.1	1±0.1				
INDO $10^{-6}$ M + EPI $10^{-6}$ M	6	1.01±0.04	1±0	0.98±0.04	0.89±0.05	0.89±0.06	0.88±0.06	FEN + METX o EPI	0.92±0.09	0.94±0.08	0.94±0.1				
INDO $10^{-5}$ M + METX $10^{-6}$ M	6	0.94±0.06	1±0	0.87±0.07	0.96±0.05	0.88±0.09	0.84±0.09		1±0.1	1.15±0.13	0.95±0.09				
INDO $10^{-6}$ M + METX $10^{-6}$ M	6	1.08±0.04	1±0	0.92±0.07	0.93±0.07	0.96±0.1	1.14±0.04		1.15±0.05	1.21±0.03	1.23±0.03				

#### **5.4.1. Indometacina.**

La indometacina és un fàrmac utilitzat habitualment, que té la propietat de inhibir l'enzim ciclooxigenasa, enzim de la via de síntesi de les prostaglandines. Per tant la inhibició d'aquest enzim resulta en la no alliberació de prostaglandines i que, per tant, no es produeixin els efectes derivats d'aquestes.

En aquest grup s'han perfundit 7 segments anteriors oculars segons el protocol experimental de tipus 1. S'ha utilitzat la indometacina a la concentració de  $10^{-6}$ M.

En el període de perfusió amb la droga, no s'observen alteracions en la facilitat d'evacuació respecte a la facilitat basal (Taula 6, Figura 24). Tampoc en el període de perfusió post droga, la facilitat experimental varia respecte a la facilitat basal i no s'observa cap significació estadística.

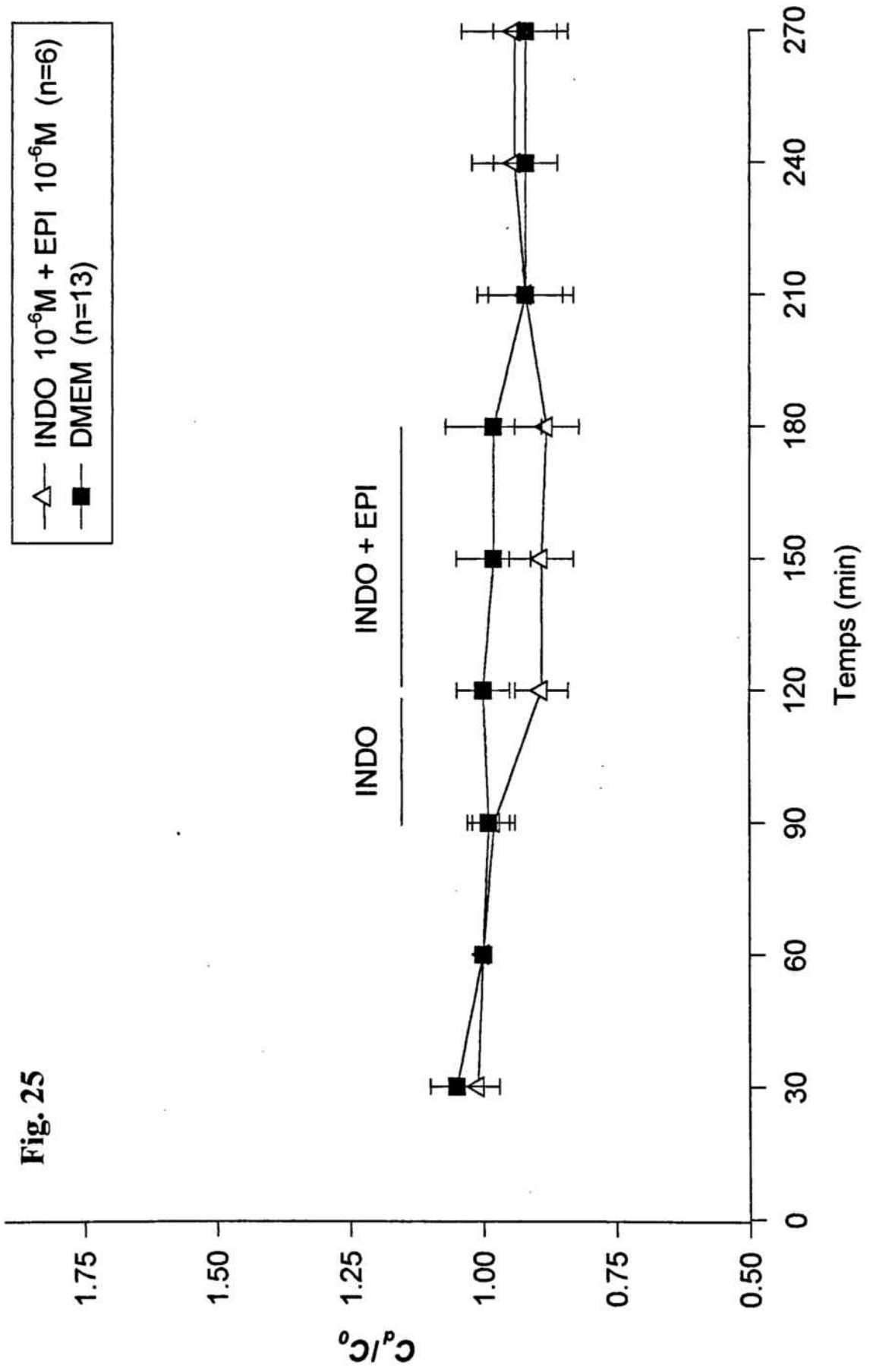
La comparació de la corba resultant amb la corba control sense indometacina, no mostra cap significació estadística i per tant es dedueix que aquesta droga no produeix cap efecte, per si sola, sobre la facilitat d'evacuació.

#### **5.4.2. Indometacina + Epinefrina.**

La perfusió de 6 segments anteriors oculars segons el protocol experimental de tipus 2, utilitzant les concentracions de droga anteriorment utilitzades ( $10^{-6}$ M), mostra els següents resultats.

El primer període de perfusió amb indometacina durant 30 minuts no mostra, com en casos anteriors, variacions en la facilitat d'evacuació (Taula 6, Figura 25). El període de perfusió amb les dues drogues alhora, mostra com la facilitat d'evacuació no sofreix cap tipus de variació respecte a la facilitat basal.

Fig. 25



Així mateix, tampoc en el període de perfusió post drogues, la facilitat experimenta cap increment.

La comparació d'aquesta corba amb la corba de perfusió amb epinefrina dona, com a resultat, significacions estadístiques en diferents minuts: 30 ( $p < 0.05$ ), 60 ( $p < 0.01$ ), 90 ( $p < 0.01$ ), 120 ( $p < 0.05$ ) i 150 ( $p < 0.01$ ).

#### **5.4.3. Indometacina + Metoxamina.**

Després de veure l'efecte bloquejant de la indometacina sobre l'efecte que induïa la epinefrina, cal veure si això també es produeix en l'efecte induït per la metoxamina.

S'han utilitzat dues concentracions de indometacina,  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$ M i únicament una de metoxamina,  $10^{-6}$ M. El protocol utilitzat és, com en el cas anterior, el protocol experimental de tipus 2 i s'han perfundit 6 segments anteriors oculars per a cada dosi de indometacina.

La concentració  $10^{-6}$ M de indometacina no mostra variacions significatives en la facilitat d'evacuació en el període de 30 minuts de perfusió amb aquesta droga (Taula 6, Figura 26). En el període de perfusió amb les dues drogues, la facilitat augmenta progressivament a partir dels 60 minuts de perfusió en presència de metoxamina, increment que continua en el període de perfusió post drogues, obtenint-se punts significatius en els minuts 240 ( $p < 0.01$ ) i 270 ( $p < 0.05$ ).

Aquesta concentració de indometacina no mostra diferències estadísticament significatives respecte a la perfusió amb metoxamina sola.

La concentració major de indometacina tampoc produeix variacions en el període de perfusió amb aquesta droga sola (Taula 6, Figura 27). A diferència de l'anterior concentració, el període de perfusió amb les dues drogues mostra

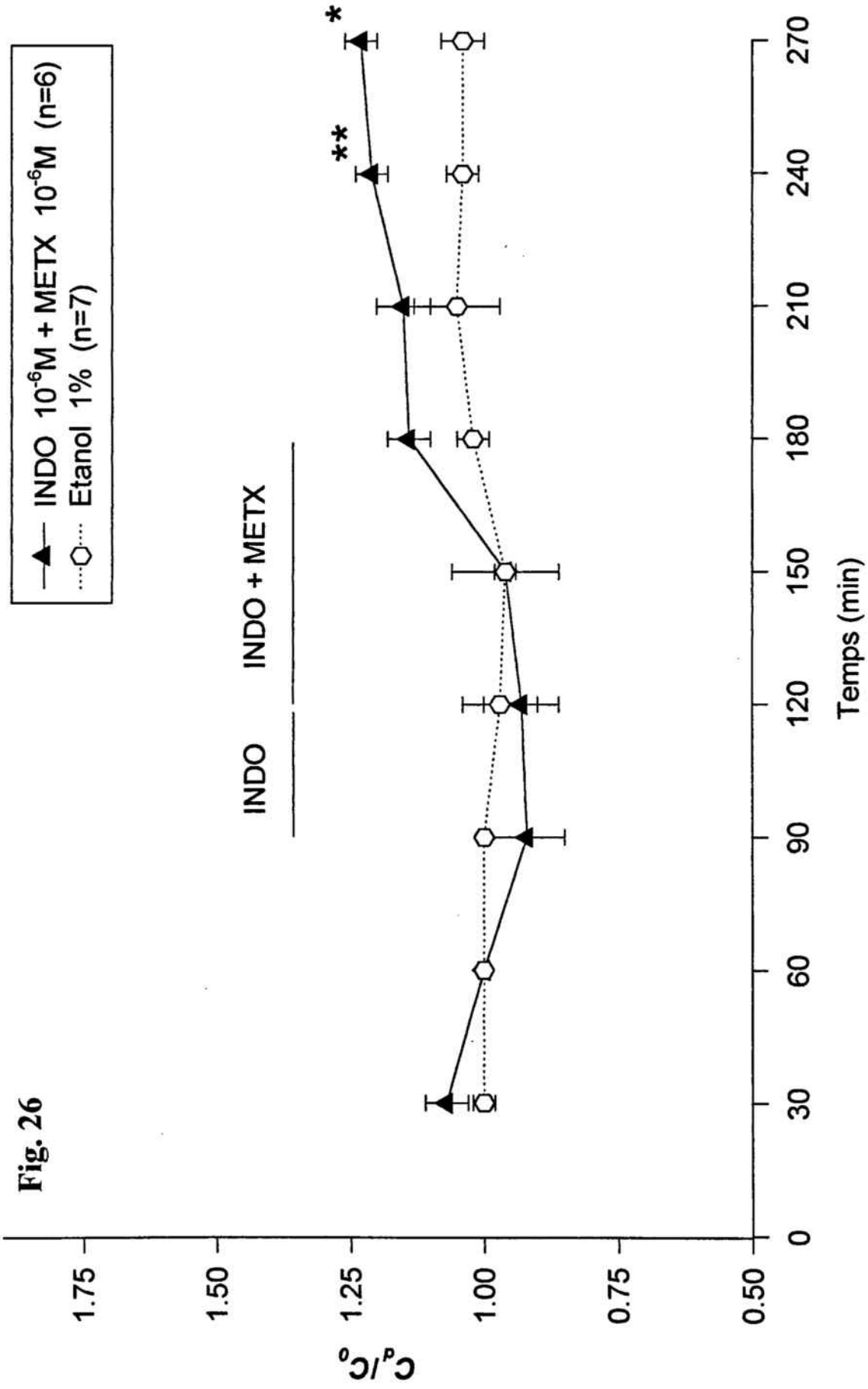


una inhibició de l'efecte que produïa la metoxamina, inhibició que es manté en el posterior període de perfusió en absència de drogues.

En aquest cas, sí existeix una diferència estadísticament significativa respecte a la perfusió amb metoxamina sola, en el minut 150 ( $p < 0.05$ ).

Sembla necessària, en aquest últim cas, una dosi major de indometacina per inhibir l'efecte de la metoxamina, a diferència del que passa amb la epinefrina.

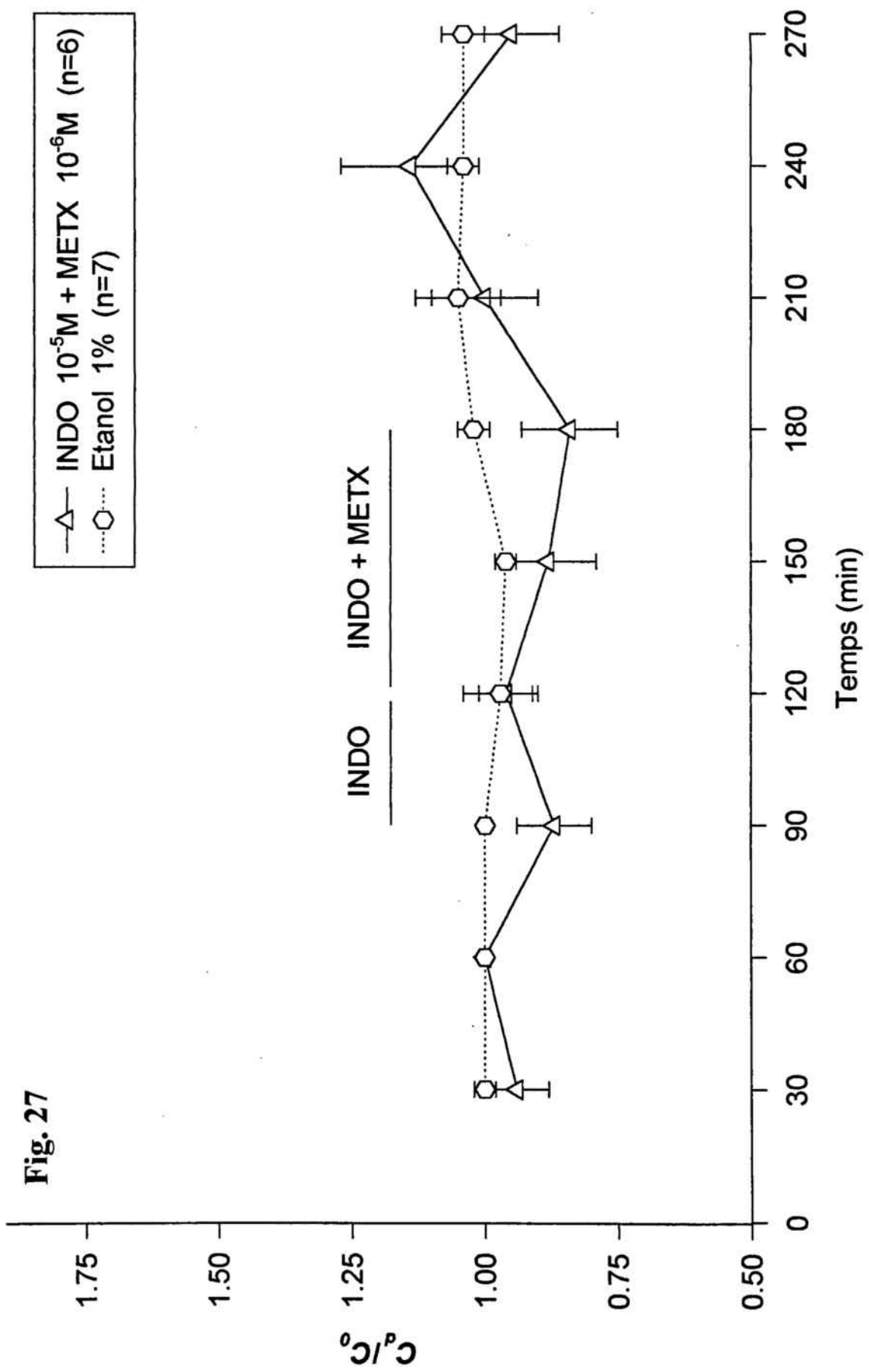
Fig. 26



—▲— INDO 10<sup>-6</sup>M + METX 10<sup>-6</sup>M (n=6)  
.....○..... Etanol 1% (n=7)

INDO      INDO + METX

Fig. 27



## 6. DISCUSSIÓ.

Nombrosos estudis han mostrat l'efecte de reducció de la pressió intraocular (hipotensor) de la epinefrina quan aquest fàrmac és administrat de manera tòpica o intracameral (Sears, 1975; Potter, 1981; Johnson, 1986; Tripathi, 1992). Alhora, les influències adrenèrgiques sobre la IOP també estan ben documentades, i per exemple tant l'estimulació simpàtica (Eakins, 1964; Gual, 1979) com l'administració tòpica d'agonistes adrenèrgics (Langham, 1966; Bill, 1969) redueixen la IOP.

De fet, s'ha vist que tant els agonistes  $\alpha$  adrenèrgics com els  $\beta$  adrenèrgics redueixen la pressió intraocular actuant en diferents teixits relacionats amb la producció (processos ciliars) i l'evacuació de l'humor aquós (via trabecular i via uveoescleral) (Langham, 1974; Zimmerman, 1977; Vareilles, 1977; Öhrström, 1981; Brubaker, 1987; Tripathi, 1992).

L'efecte de la epinefrina s'ha estudiat en diverses ocasions, però, actualment encara no està clar el seu mecanisme d'actuació. Alguns autors han sotgerit que, l'augment de la facilitat d'evacuació de l'humor aquós que produeix la epinefrina, pot ser mitjançat pels receptors  $\alpha$  adrenèrgics (Eakins, 1964; Anderson, 1990, Tripathi, 1992; Ogidigben, 1994; Toris, 1995; Gasull, 1995), mentre que altres han sotgerit que l'efecte és de tipus  $\beta$  adrenèrgic (Erickson-Lamy 1992; 1994; Tripathi, 1992).

D'altra banda, l'AMPc s'ha vist associat amb l'augment de l'*outflow* induït per diferents drogues, principalment la epinefrina (Neufeld, 1973; 1975; Bartels, 1981; 1988; Gregory, 1981; Boas, 1981; Crawford, 1991; Erickson-Lamy, 1992; Mittag, 1993; Gilabert, 1994).

Els resultats obtinguts en el present estudi, corroboren que efectivament la epinefrina indueix un increment en la facilitat d'evacuació en el model experimental d'ull boví *in vitro*, com han demostrat altres autors en ulls humans en el mateix model experimental (Erickson-Lamy, 1992). El possible efecte de la epinefrina sobre els

receptors  $\beta$  adrenèrgics, seria l'estimulació de la síntesi intracel.lular d'AMPc. D'aquesta manera la forskolina, com a activador de l'enzim que sintetitza AMPc (adenilat ciclase), a les concentracions de  $10^{-5}$  i  $10^{-6}$ M augmenta, com la epinefrina, la facilitat d'evacuació.

El dibutiril-AMPc (db-AMPc), un anàleg de l'AMPc, també indueix un augment en la facilitat d'evacuació, mostrant un efecte similar al induït per la forskolina.

Un tercer mètode assajat en aquest estudi per augmentar la concentració intracel.lular d'AMPc ha estat inhibir la seva degradació. D'aquesta manera, un inhibidor de la fosfodiesterasa (enzim que degrada l'AMPc), la isobutilmetilxantina (IBMX), ha estat provat en aquest model. Altres estudis havien mostrat que l'IBMX sol, per ell mateix, no provoca cap canvi sobre la concentració d'AMPc mesurada en l'humor aquós (Hoyng, 1991), mentre que si s'associa a epinefrina o norepinefrina, l'efecte d'aquestes drogues en resulta significativament augmentat.

Durant la perfusió d'ull boví *in vitro* l'IBMX augmenta significativament la facilitat d'evacuació de l'humor aquós, però a més, l'associació d'aquesta droga amb una altra que produeixi un augment en la síntesi d'aquest segon missatger (EPI o FSK) també augmenta la facilitat d'evacuació de manera additiva. Aquests resultats estan en concordança amb altres dades (Hoyng, 1991; 1992) que han mostrat l'efecte de la EPI i la norepinefrina (norEPI) conjuntament amb l'IBMX en conills.

Analitzant aquests resultats, sembla clar que l'augment de la concentració intracel.lular d'AMPc, per algun dels diferents mecanismes possibles, indueix un augment de la facilitat d'evacuació.

Una d'aquestes possibles vies d'actuació de la EPI és a través de la activació dels receptors  $\alpha$  adrenèrgics. Alguns autors han mostrat que aquesta via podria ser la més important en la regulació de la evacuació de l'humor aquós (Eakins, 1964; Anderson, 1990) i que els receptors  $\beta$  adrenèrgics jugarien un paper marginal en aquest efecte (Potter, 1981).

Els receptors  $\alpha$  adrenèrgics es poden subdividir en dues classes  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ . El primer tipus de receptor, l' $\alpha_1$ , és el que habitualment s'ha associat a increments en la facilitat d'evacuació (Eakins, 1964), mentre que l'activació del segon tipus de receptor, l' $\alpha_2$ , també s'ha associat a descensos en la IOP, però actuant a les vies de producció d'humor aquós (Tripathi, 1992; Ogidigben, 1994).

Els resultats d'aquest estudi mostren com la metoxamina, un agonista  $\alpha_1$  adrenèrgic, incrementa la facilitat d'evacuació de forma significativa respecte a la perfusió en absència d'aquesta droga. Aquest efecte suggereix una possible participació dels receptors adrenèrgics  $\alpha_1$  en el mecanisme activat per la epinefrina. Cal destacar que l'efecte induït per la metoxamina sobre la facilitat d'evacuació es major que l'induit per la epinefrina. Aquest resultat s'hauria d'interpretar, possiblement, com a conseqüència de la major especificitat de la metoxamina sobre aquests receptors.

La metoxamina i la norepinefrina (Eakins, 1964; Neufeld, 1973; Potter, 1981; Tripathi, 1992) afecten la facilitat d'evacuació provablement, perquè ambdós són més selectius que la epinefrina pels receptors  $\alpha$  adrenèrgics.

Eakins i col.laboradors (1964) van mostrar en conills, que la epinefrina i la norepinefrina disminueixen la resistència a la evacuació de l'humor aquós, i que aquest efecte pot ser blocat per l'administració de fentolamina, un antagonista  $\alpha$  adrenèrgic no específic. En el model de perfusió d'ull boví *in vitro* utilitzat, la fentolamina és capaç d'inhibir l'efecte de la metoxamina, com a mínim en part. Igual que en l'estudi d'Eakins (1964), la fentolamina també inhibeix l'efecte induït per la epinefrina, i cal destacar que aquesta inhibició és més efectiva que en el cas de la metoxamina que, per la seva banda, també induïa un efecte sobre la facilitat d'evacuació major que la epinefrina.

La inhibició de l'efecte de la EPI i la METX per part de la fentolamina implica la participació dels receptors  $\alpha$  adrenèrgics en l'efecte d'ambdues drogues anteriorment citades. De fet, ja s'havien implicat aquests receptors en la regulació de l'evacuació de l'humor aquós (Eakins, 1964; Potter, 1981; Anderson, 1990). La presència de receptors

$\alpha$  relacionats amb variacions de la facilitat d'evacuació implica l'existència d'un component simpàtic en el control de la evacuació de l'humor aquós (Gual, 1979).

En alguns estudis s'ha vist que la indometacina és capaç d'inhibir l'augment en la facilitat d'evacuació que produeix la epinefrina (Bhattacharjee, 1977; Camras, 1985; Anderson, 1990; Tripathi, 1992), i han implicat les prostaglandines en l'efecte de la epinefrina.

Les prostaglandines a dosis altes provoquen el trencament de la barrera sang-aquós, i indueixen un augment en la pressió intraocular (Bito, 1984), mentre que a dosis baixes (nM), tenen un efecte contrari, augmentant la facilitat d'evacuació, reduint la pressió intraocular (Poyer, 1992; Tripathi, 1992; Dijkstra, 1995). Des de fa temps es coneix que les prostaglandines i les catecolamines estan relacionades, i s'ha observat que les catecolamines (norEPI i EPI) poden estimular la síntesi de prostaglandines en l'iris de conills i bovins (Yousufzai, 1983).

En altres teixits com en les cèl·lules de l'epiteli gàstric, s'ha observat que la EPI i la norEPI indueixen la síntesi de  $\text{PGI}_2$  (prostaciclina) i que aquesta síntesi pot ser inhibida per la fentolamina (antagonista  $\alpha$  adrenèrgic no selectiu) i per la prazosina (antagonista  $\alpha_1$  adrenèrgic selectiu) (Ueda, 1994). Aquests resultats suggereixen que la síntesi de  $\text{PGI}_2$  està mitjançada pels receptors  $\alpha_1$  adrenèrgics (Yousufzai, 1983; Ueda, 1994). A més, la síntesi d'una altre prostaglandina ( $\text{PGE}_2$ ), en aquest mateix teixit, és estimulada per la norEPI i no per la EPI que té un efecte menor sobre els receptors  $\alpha$  adrenèrgics. La síntesi de  $\text{PGE}_2$ , igual que la de  $\text{PGI}_2$ , pot ser inhibida per la fentolamina i la prazosina (Ueda, 1994).

La EPI també pot induir la síntesi de  $\text{PGE}_2$  si, alhora, s'utilitza l'agonista  $\beta$  adrenèrgic propranolol o bé l'antagonista  $\alpha_2$  yohimbina, amb la qual cosa s'augmenta l'efecte sobre els receptors  $\alpha_1$  (Ueda, 1994). Aquest fet mostra la participació dels receptors  $\alpha_2$  adrenèrgics com a supresors de la síntesi de prostaglandines induïda per l'activació dels receptors  $\alpha_1$  (Ueda, 1994). En relació amb la síntesi de prostaglandines induïda per les catecolamines, també s'ha vist que els receptors  $\beta$  adrenèrgics no

participen en aquest procés i així, l'isoproterenol (agonista  $\beta$  adrenèrgic) no indueix la síntesi d'aquestes substàncies (Ueda, 1994).

En la perfusió d'ull boví *in vitro*, la indometacina sola no modifica la facilitat d'evacuació. Es pot suggerir doncs que, per si sola, aquesta droga no és capaç de produir cap modificació en la concentració de prostaglandines; aquesta falta d'efecte també l'han descrit altres autors (Camras, 1985; Anderson, 1990) en conills i humans.

La indometacina inhibeix l'augment de la facilitat d'evacuació que produeix la EPI, la qual cosa mostra que en l'efecte induït per la EPI hi ha una participació de les prostaglandines; altres autors també han trobat efectes similars (Bhattacharjee, 1977; Camras, 1985; Anderson, 1990) en conills i humans.

També trobem el mateix resultat si estudiem l'efecte de la indometacina sobre l'increment de la facilitat d'evacuació induït per la metoxamina. La indometacina, en aquest cas, és capaç d'inhibir l'efecte induït per la metoxamina  $10^{-6}$ M. També hi ha una inhibició parcial en l'efecte de la metoxamina  $10^{-5}$ M, probablement degut a la elevada concentració de l'agonista  $\alpha_1$  adrenèrgic.

Tots aquests resultats mostren una participació dels receptors  $\alpha_1$  adrenèrgics en l'augment de la facilitat d'evacuació induït per la EPI i la METX, i alhora, mostren una participació de les prostaglandines en aquest procés.

En nombrosos teixits i més específicament en l'iris i en el cos ciliar de conills, gats i bovins, s'han trobat receptors a prostaglandines acoblats a l'adenilat ciclase, enzim que sintetitza l'AMPc (Bhattacharjee, 1993; Wax, 1993). En la xarxa trabecular no se sap amb seguretat l'existència de receptors a prostaglandines, però hi ha indicis de la possible existència d'aquests receptors (Tripathi, 1992).

Finalment, i a la vista dels resultats obtinguts, sembla possible que la epinefrina, en la via convencional d'evacuació de l'humor aquós (xarxa trabecular i canal d'Schlemm), actui a través de l'activació dels receptors  $\alpha_1$  adrenèrgics, i que aquests, a



través de diversos mecanismes intracel·lulars activin la cascada intracel·lular de l'àcid araquidonic, precursor de les prostaglandines. A través de l'activació dels receptors pròpis, les prostaglandines, són capaces d'activar la síntesi d'AMPc. S'ha descrit que al augmentar la concentració intracel·lular d'aquest segon missatger es produeix un increment en la facilitat d'evacuació de l'humor aquós a través de la xarxa trabecular i el canal d'Schlemm.

D'altra banda, encara falta aprofundir en el coneixement d'aquest possible mecanisme d'actuació de la EPI, i a més, cal conèixer la participació d'altres segons missatgers intracel·lulars com el  $\text{Ca}^{2+}$  i el  $\text{IP}_3$  (Nebigil,1992; Kokubu, 1993; Lepple-Wienhues, 1994; Wiederholt, 1994; Safarazi, 1995) que podrien jugar un paper important en la regulació d'aquests mecanismes.

## 7. CONCLUSIONS.

1. La modificació efectuada de la tècnica de perfusió de segment anterior ocular boví *in vitro*, descrita per Erickson-Lamy, ha permés millorar la viabilitat de les estructures oculars, la estabilitat de la preparació i l'anàlisi de les dades.
2. La epinefrina incrementa la evacuació de l'humor aquós per la via convencional (xarxa trabecular i canal d'Schlemm) en la perfusió de segment anterior boví *in vitro*.
3. La forskolina, el dibutiril-AMPc i la isobutilmetilxantina, en aquesta preparació experimental, augmenten la facilitat d'evacuació de l'humor aquós.
4. L'augment de la concentració intracel·lular de l'AMPc provoca un increment de la facilitat d'evacuació de l'humor aquós en la preparació de segment anterior ocular boví *in vitro*.
5. La metoxamina produeix un augment en la facilitat d'evacuació de l'humor aquós en aquest model experimental.
6. La fentolamina bloqueja dels efectes de la metoxamina i de la epinefrina sobre la facilitat d'evacuació de l'humor aquós en el model experimental estudiat.
7. Els receptors  $\alpha_1$  adrenèrgics tenen, com a mínim en part, un paper funcional sobre la facilitat d'evacuació de l'humor aquós en la xarxa trabecular bovina.
8. La indometacina, per si mateixa i de manera aguda, no és capaç d'induir cap efecte sobre la facilitat d'evacuació de l'humor aquós en aquest model experimental.

9. En la perfusió de segment anterior ocular boví *in vitro*, l'efecte de la epinefrina sobre la facilitat d'evacuació de l'humor aquós es inhibit tant pel bloqueig dels receptors  $\alpha_1$  adrenèrgics com per la presència de la indometacina.
10. En aquest model experimental, l'efecte de la metoxamina sobre la facilitat d'evacuació pot ser inhibit, com a mínim en part, per la indometacina.
11. Els efectes de les prostaglandines sobre la facilitat d'evacuació de l'humor aquós estan mitjançats, com a mínim en part, pels receptors  $\alpha_1$  adrenèrgics en aquest model experimental.

## 8. BIBLIOGRAFIA.

Alm, A., & Bill, A. (1972). The oxygen supply to the retina II: Effects of high intraocular pressure and increased arterial carbon dioxide tension on uveal and retinal blood flow in cats. *Acta Physiol Scand*, 84, 306-319.

Alm, A., & Bill, A. (1973). Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macac irus*): A study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Experimental Eye Research*, 15, 15-29.

Anderson, L., & Wilson, W.S. (1990). Inhibition by indomethacin of the increased facility of outflow induced by adrenaline. *Exp Eye Res*, 50, 119-126.

Armaly, M.F. (1960). The effect of intraocular pressure on outflow facility. *Arch Ophthalmol*, 64, 125-131.

Armaly, M.F. (1973). Glaucoma. *Arch Ophthalmol*, 90, 485-501.

Bartels, S.P. (1988). Effects of epinephrine and forskolin on cyclic AMP formation in calf trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 29, S88(abstract)

Bartels, S.P., Roth, H.O., & Neufeld, A.H. (1981). Effects of intravitreal cholera toxin on Adenosine 3',5'-Monophosphate, intraocular pressure and outflow facility in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 20, 411-414.

Bartels, S.P. (1984). Animal models useful in drug testing. In S.M. Drance & A.H. Neufeld (Eds.), *Glaucoma: Applied pharmacology in medical treatment*. (pp. 215-232). Orlando, Florida: Grune & Stratton, Inc.

Belmonte, C. (1969). El control nervioso de la presión y la circulación intraoculares. *An. Ins. Farm. Esp.*, 17-18, 77-332.

Berman, E.R. (1991). Aqueous, iris-ciliary body, and trabeculum. In C. Blakemore (Ed.), *Biochemistry of the eye*. (pp. 151-200). New York: Plenum press.

Bhattacharjee, P., & Hammond, B.R. (1977). Effect of indomethacin on the ocular hypotensive action of adrenaline in the rabbit. *Exp Eye Res*, 24, 307-313.

Bhattacharjee, P., Rhodes, L., & Paterson, C.A. (1993). Prostaglandin receptors coupled to adenylyl cyclase in the iris-ciliary body of rabbits, cats and cows. *Exp Eye Res*, 56, 327-333.

Bielski, J., Roberts, B., Hickingbotham, D., Epstein, D.L., & O'Brien, E.T. (1995). Anterior segment perfusion: establishing a divided chamber with independent flows. *Invest Ophthalmol vis sci*, 36, S730(abstract)

Bill, A. (1969). Early effects of epinephrine on aqueous humor dynamics in vervet monkeys. *Experimental Eye Research*, 8, 35-43.

Bill, A. (1971). Effects of longstanding stepwise increments in eye pressure on the rate of aqueous humor formation in a primate (*Cercopithecus ethiops*). *Exp Eye Res*, 12, 184-193.

Bitto, L.Z. (1984). Prostaglandins, other eicosanoids, and their derivatives as potential anti-glaucoma agents. In S.M. Drance & A.H. Neufeld (Eds.), *Glaucoma: Applied pharmacology in medical treatment*. (pp. 477-506). Orlando, Florida: Grune & Stratton, Inc.

Boas, R.S., Messenger, M.J., Mittag, T.W., & Podos, S.M. (1981). The effects of topically applied epinephrine and timolol on intraocular pressure and aqueous humor cyclic AMP in the rabbit. *Exp Eye Res*, 32, 681-690.

Bonne, C. (1993). Nouvelles perspectives dans le traitement pharmacologique du glaucome. *Therapie*, 48, 559-565.

Brubaker, R.F., Carlson, K.H., Kullerstrand, L.J., & McLaren, J.W. (1987). Topical forskolin (Colforsin) and aqueous flow in humans. *Arch Ophthalmol*, 105, 637-641.

Busch, M.J.W.M., Kobayashi, K., Hoyng, P.F.J., & Mittag, T.W. (1993). Adenylyl cyclase in human and bovine trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34, 3028-3034.

Camras, C.B., Feldman, S.G., Podos, S.M., Christensen, R.E., Gardner, S.K., & Fazio, D.T. (1985). Inhibition of the epinephrine induced reduction of intraocular pressure by systemic indomethacin in humans. *Am J Ophthalmol*, 100, 169-175.

Cannon, W.B. (1932). The wisdom of the body. *Norton*. New York.

Caprioli, J. (1987). The ciliary epithelia and aqueous humor. In R.A. Moses & W.M. Hart (Eds.), *Adler's Physiology of the eye*. (pp. 204-222). St. Luis, Missouri: Mosby.

Cole, D.F. (1984). Ocular fluids. In H. Davson (Ed.), *The eye*. (pp. 269-390). Orlando, Florida: Academic press, Inc.

Crawford, K.S., Heideman, W., Robinson, J.C., & Kaufman, P.L. (1991). Stimulation of cyclic AMP formation in monkey iris, ciliary processes, ciliary muscle and trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32, S756(abstract)

Davson, H. (1984). The intraocular pressure. In H. Davson (Ed.), *The eye*. (pp. 391-532). Orlando, Florida: Academic press, Inc.

Dijkstra, B.G., Ruijter, J.M., & Hoyng, P.F. (1995). Evaluation of real-time flow measurements of effects of PGE<sub>1</sub> and PGF<sub>2α</sub> in the organ culture anterior segment perfusion model in human eyes. *Invest Ophthalmol vis sci*, 36, S137(abstract)

Eakins, K.E., & Ryan, S.J. (1964). The action of sympathomimetic amines on the outflow of aqueous humor from the eye. *Br J Pharmacol*, 23, 374-382.

Ehinger, B. (1971). A comparative study of the adrenergic nerves to the anterior eye segment of some primates. *Z Zellforsch*, 116, 157-177.

Erickson, K., Liang, L., Shum, P., & Nathanson, J.A. (1994). Adrenergic regulation of aqueous outflow. *J Ocular Pharmacol*, 10, 241-252.

Erickson-Lamy, K., & Nathanson, J.A. (1992). Epinephrine increases facility of outflow and cyclic AMP content in the human eye in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33, 2672-2678.

Erickson-Lamy, K., Rohen, J.W., & Grant, W.M. (1988). Outflow facility studies in the perfused bovine aqueous outflow pathways. *Curr Eye Res*, 7, 799-807.

Erickson-Lamy, K., Rohen, J.W., & Grant, W.M. (1991). Outflow facility in the perfused human ocular anterior segment. *Exp Eye Res*, 52, 723-731.

Friedenwald, J.S., & Buschke, W. (1941). The role of epinephrine in the formation of the intraocular fluid. *Am J Ophthalmol*, 24, 1105-1114.

Gabelt, B.T., Robinson, J.C., Gange, S.J., & Kaufman, P.L. (1995). Superior cervical ganglionectomy in monkeys: aqueous humor dynamics and their responses to drugs. *Exp Eye Res*, 60, 575-584.

Gasull, X., Gilabert, R., Bergamini, M.V.W., & Gual, A. (1995). Participation of  $\alpha_1$ -adrenoreceptors on outflow facility (C) in cow eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36, S194(abstract)

Gazala, J.R., Geeraets, W.J., & Guerin, D. (1965). Angiocaustery of the aqueous outflow channels in the rabbit eye. *Am J Ophthalmol*, 60, 247-256.

Gilabert, R., Gasull, X., Belmonte, C., Bergamini, M.V.W., & Gual, A. (1994). Effect of epinephrine (EPI), forskolin (FOR), 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) and dibutyryl-cyclic adenosine monophosphate (DB-cAMP) on *in vitro* outflow facility in young cow eyes. *Exp Eye Res*, 59, S50(abstract)

Gregory, D., Sears, M., Bausher, L., Mishima, H., & Mead, A. (1981). Intraocular pressure and aqueous flow are decreased by cholera toxin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 20, 371-381.

Gual, A. (1979). La inervación simpática en la regulación de la presión intraocular. Universidad de Valladolid; Tesis doctoral, 64-115.

Gual, A., Blanco, J., Belmonte, C., & Garcia, A.G. (1983). Dopamine b-hydroxylase activity in human aqueous humor. *Exp Eye Res*, 37, 99-102.

Gual, A., & de Castro, F.R. (1985). Effects of ocular blood flow changes on the efferent activity of the cat ciliary nerves. *Ophthalmic Res*, 17, 230-234.



Gual, A., Mintenig, G., & Belmonte, C. (1989). Intraocular pressure effects of water loading and venous compression tests in normal and denervated pigmented rabbits. *Exp. Eye Res*, 48, 365-374.

Hill, H.F., Lopez, E., & Hill, K. (1963). Effect of retrobulbar anesthesia upon intraocular pressure. *Arch Ophthalmol*, 178-180.

Hoyng, P.F., Groenboer, M.C., & Busch, M.J.W.M. (1991). Isobutylmethylxanthine enhances adrenergic-induced ocular hypotension in rabbits and Beagles. *Exp Eye Res*, 52, 511-517.

Hoyng, P.F.J., & Busch, M.J.W.M. (1992). Alfa<sub>1</sub>-adrenoceptor stimulation potentiates IBMX-enhanced beta<sub>2</sub>-adrenoceptor induced ocular hypotensive response. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33, S1179(abstract)

Johnson, D.H., & Brubaker, R.F. (1986). Glaucoma: An overview. *Mayo Clini Proc*, 61, 59-67.

Johnson, D.H., & Tschumper, R.C. (1987). Human trabecular meshwork organ culture. A new method. *Invest Ophthalmol vis sci*, 28, 945-953.

Johnstone, M.A., & Grant, W.M. (1973). Pressure-dependent changes in structure of the aqueous outflow system of human and monkey eyes. *Am J Ophthalmol*, 75, 365-383.

Kanski, J.J. (1992). Glaucoma. In Anonymous, *Oftalmología Clínica*. (pp. 148-185). Doyma.

Kaufman, P.L., & Bárany, E.H. (1981). Adrenergic drug effects on aqueous outflow facility following ciliary muscle retrodisplacement in the cynomolgus monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 20, 6444-6651.

Kaufman, P.L., Wiedman, T., & Robinson, J.R. (1984). Cholinergics. In M.L. Sears (Ed.), *Pharmacology of the eye*. (pp. 149-192). Berlin: Springer-Verlag.

Kokubu, N., Satoh, M., & Takayanagi, I. (1993). Contractile responses and calcium movements induced by  $\alpha_1$ -adrenoceptor stimulant, norepinephrine, in the rabbit iris dilator muscle. *Gen Pharmac*, 24, 1541-1545.

Kurus, E. (1955). Über ein Ganglienzellsystem der menschlichen Aderhaut. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 80, 198-206.

Langham, M.E. (1959). The effect of pressure on the rate of formation of the aqueous humor. *J Physiol (Lond)*, 144, 29-30. (abstract)

Langham, M.E. (1971). Role of adrenergic mechanisms in development and therapy of open angle glaucoma. *Proc Roy Soc Med*, 64, 622-628.

Langham, M.E., & Diggs, E. (1974).  $\beta$  adrenergic responses in the eyes of rabbits, primates and man. *Exp Eye Res*, 19, 281-295.

Langham, M.E., & Rosenthal, A.R. (1966). Role of cervical sympathetic nerve in regulating intraocular pressure and circulation. *American Journal of Physiology*, 210, 786-794.

Laties, A., & Jacobowitz, D. (1966). A comparative study of the autonomic innervation of the eye in monkey, cat, and rabbit. *Anatomical record*, 156, 383-395.

Leopold, I.H. (1984). The use and side effects of cholinergic agents in the management of intraocular pressure. In S.M. Drance & A.H. Neufeld (Eds.), *Glaucoma: Applied*

*pharmacology in medical treatment.* (pp. 357-393). Orlando, Florida: Grune & Stratton, Inc.

Lepple-Wienhues, A., Rauch, R., Clarck, A.F., Gráßmann, A., Berweck, S., & Wiederholt, M. (1994). Electrophysiological properties of cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res*, 59, 305-311.

Macri, F.J. (1967). The pressure dependence of aqueous humor formation. *Arch Ophthalmol*, 78, 629-633.

Marré, E. (1968). Die intraoculare Druckregulation.II. Die Beeinflussung der intraocularen Druckregulation durch Pharmaka unterschiedlicher zentraler Wirksamkeit. *Albrecht v Graefes Arch klin exp Ophthalmol*, 175, 246-258.

Mintzenig, G.M., Sánchez-Vives, M.V., Martin, C., Gual, A., & Belmonte, C. (1995). Sensory receptors in the anterior uvea of the cat's eye. An in vitro study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36, 1615-1624.

Mittag, T.W., Tormay, A., Taniguchi, T., & Ortega, M. (1993). Calmodulin activated adenylyl cyclase in ciliary processes: additivity of calcium and cyclic adenosine monophosphate signals on intraocular pressure response of the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34, 2041-2048.

Nebigil, C., & Malik, K.U. (1993).  $\alpha$  adrenergic receptor subtypes involved in prostaglandin synthesis are coupled to  $Ca^{2+}$  channels through a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein. *J Pharmacol Exp Ther*, 266, 1113-1124.

Neufeld, A.H., Chavis, R.M., & Sears, M.L. (1973). Cyclic-AMP in the aqueous humor: The effects of repeated topical epinephrine administration and sympathetic denervation. *Exp Eye Res*, 16, 265-272.

Neufeld, A.H., & Sears, M.L. (1975). Adenosine 3',5'-monophosphate analogue increases the outflow facility of the primate eye. *Investigative Ophthalmology*, 11, 688-689.

Niemi, M., & Tarkkanen, A. (1964). Cholinesterases, monoamine oxidase and phosphorylase in the iris muscles. *Arch Ophthalmol*, 72, 543-553.

Nomura, T., & Smelser, G.K. (1974). the identification of adrenergic and cholinergic nerve endings in the trabecular meshwork. *Investigative Ophthalmology*, 13, 525-532.

Norton, A.L., & Viernstein, L.J. (1972). The effect of adrenergic agents on ocular dynamics as a function of administration site. *Exp Eye Res*, 14, 154-163.

O'Donnell, M.E., Brandt, J.D., & Curry, F.E. (1995). Na-K-Cl cotransport regulates intracellular volume and monolayer permeability of trabecular meshwork cells. *American Journal of Physiology*, 268, C1067-C1074.

Ogidigben, M., Chu, T.C., & Potter, D.E. (1994). Alpha-2 adrenoceptor mediated changes in aqueous dynamics: effect of pertussis toxin. *Exp Eye Res*, 58, 729-736.

Öhrström, A. (1981). Dose related interaction between timolol and adrenaline. *Albrecht v Graefes Arch klin exp Ophthal*, 216, 55-59.

Potter, D.E. (1981a). Adrnergic pharmacology of aqueous humor dynamics. *Pharmacological reviews*, 33, 133-153.

Potter, D.E., & Rowland, J.M. (1981b). Adrenergic drugs and intraocular pressure. *Gen Pharmac*, 12, 1-13.

Poyer, J.F., Gabelt, B., & Kaufman, P.L. (1992). The effect of topical PGF-2alfa on uveoscleral outflow and outflow facility in the rabbit eye. *Exp Eye Res*, 54, 277-283.

Safarazi, F.M., Schroeder, A., & Erickson, K. (1995). Effect of calcium channel blockers on outflow facility in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36, S194(abstract)

Schroeder, A., & Erickson, K. (1994). Cholinergic agonists do not increase trabecular outflow facility in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35, S2054(abstract)

Sears, M.L. (1960). Outflow resistance of the rabbit eye: Technique and effects of acetazolamide. *Arch Ophthalmol*, 64, 823-838.

Sears, M.L., & Neufeld, A.H. (1975). Adrenergic modulation of the outflow of aqueous humor. *Investigative Ophthalmology*, 14, 83-86.

Staflova, J. (1969). A comparative study of the adrenergic innervation of the iris and ciliary structures in 18 species in phylogenesis. *Journal of Morphology*, 128, 387-402.

Stjernschantz, J. (1984). Autacoids and neuropeptides. In M.L. Sears (Ed.), *Pharmacology of the eye*. (pp. 311-366). Berlin: Springer-Verlag.

Ten Tusscher, M.P.M., Beckers, H.J.M., Vrensen, G.F.J.M., & Klooster, J. (1994). Peripheral neural circuits regulating IOP? A review of its anatomical backbone. *Doc Ophthalmol*, 87, 291-313.

Toris, C.B., Tafoya, M.E., Camras, C.B., & Yablonski, M.E. (1995). Effects of apraclonidine on aqueous humor dynamics in human eyes. *Ophthalmology*, 102, 456-461.

Tripathi, R.C., & Tripathi, B.J. (1984). Anatomy, orbit and adnexa of the human eye. In H. Davson (Ed.), *The eye*. (pp. 1-268). Orlando, Florida: Academic press.

Tripathi, R.C., Yang, C., Tripathi, B.J., & Borisuth, N.S.C. (1992). Role of receptors in the trabecular meshwork of the eye as targeted to the development of antiglaucoma therapy. *Drug Dev Res*, 27, 191-228.

Trope, G.E., & Rumley, A.G. (1985). Catecholamines in human aqueous humor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26, 399-401.

Ueda, F., Ideguchi, K., Taniguchi, N., & Kimura, K. (1994). Adrenergic regulation of prostaglandin biosynthesis in cultured rabbit gastric epithelial cells. *Jpn J Pharmacol*, 65, 113-120.

Vareilles, P., Silverstone, D., Plazonnet, B., Le Douarech, J.C., Sears, M.L., & Stone, C.A. (1977). Comparison of the effect of timolol and other adrenergic agents on intraocular pressure in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 16, 987-996.

Waltman, S.R., & Hart, W.M. (1987). The cornea. In R.A. Moses & W.M. Hart (Eds.), *Adler's Physiology of the eye*. (pp. 36-59). St. Luis. Missouri: Mosby.

Wax, M.B., & Barrett, D.A. (1993). Regulation of adenylyl cyclase in rabbit iris ciliary body. *Curr Eye Res*, 12, 507-520.

Wiederholt, M., Bielka, S., Schweig, F., Lütjen-Drecoll, E., & Lepple-Wienhues, A. (1995). Regulation of outflow rate and resistance in the perfused anterior segment of the bovine eye. *Exp Eye Res*, 61, 223-234.

Wiederholt, M., Sturm, A., & Lepple-Wienhues, A. (1994). Relaxation of trabecular meshwork and ciliary muscle by release of nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35, 2515-2520.

Yousufzai, S.Y.K., & Abdel-Latif, A.A. (1983). Effects of norepinephrine and other pharmacological agents on prostaglandin E<sub>2</sub> release by rabbit and bovine irides. *Exp Eye Res*, 37, 279-292.

Zadunaisky, J.A., & Spring, K.R. (1995). TBM cells area changes induced by drugs. is it contraction or cell volume regulation? *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36, S194(abstract)

Zimmerman, T.J., Harbin, R., Pett, M., & Kaufman, H.E. (1977). Timolol and facility of outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 16, 623-624.