

# **INTRODUCCIÓ**

---

# 1 Introducció

## 1.1 Anatomia i fisiologia oculars

L'ull és una estructura altament especialitzada que forma part del sistema visual. Està situat a la cavitat orbitària cranial, estructura que li proporciona protecció, i es considera part del sistema nerviós central per la seva connexió directa a través del nervi òptic. Les dues funcions de l'ull són: 1) enfocar les imatges sobre la retina a través del sistema òptic de l'ull i 2) permetre la transducció dels senyals lluminosos en senyals elèctrics a la retina. Allà les cèl·lules sensorials transmetran els impulsos nerviosos a l'escorça visual on es percebrà la imatge.

### 1.1.1 Parts del globus ocular

El globus ocular està format per tres capes o túniques:

La **túnica fibrosa** que és la capa més externa, formada per l'esclera, la còrnia i el limbe esclerocornial.

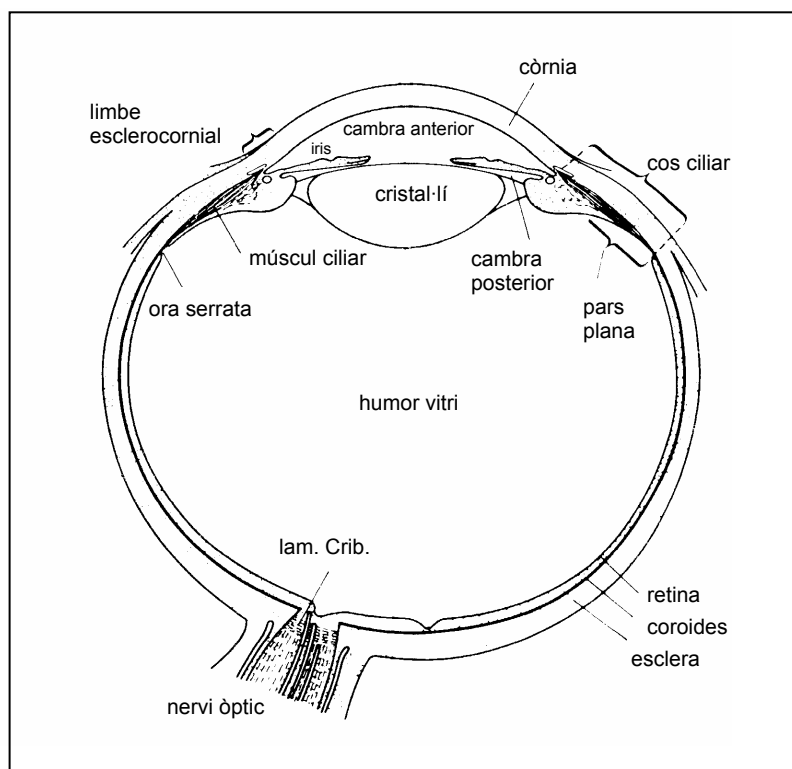
L'*esclera* està formada per teixit connectiu dur, blanc i fibrós. Ocupa 5/6 parts de la superfície total del globus ocular recobrint la part exterior. Té un gruix d'aproximadament 1 mm a la part posterior, fent-se més prima a la part anterior (0.3 mm). Les seves funcions són protegir les estructures oculars i, juntament amb la pressió intraocular, ajudar a mantenir estable l'estructura del globus ocular.

La *còrnia* ocupa el 1/6 restant per la part anterior del globus ocular i és una estructura transparent, de naturalesa avascular, que serveix de barrera entre l'interior de l'ull i l'exterior. La còrnia és l'estructura òptica amb un poder de refracció més gran contribuïnt amb unes 48 dioptries (mesura del poder de refracció) al poder diòptric total de l'ull humà.

La zona d'unió entre l'esclera i la còrnia s'anomena *limbe esclerocornial*. Medeix entre 1 i 2 mm d'ample i proporciona part dels nodrients que rep la còrnia a través dels capil·lars limbals. A la part interna del limbe s'hi troben les estructures d'evacuació de l'humor aquós: la xarxa trabecular i el canal d'Schlemm. Alteracions en la funció d'aquestes estructures poden conduir a l'aparició de glaucoma.

La **túnica vascular** és la capa situada entre l'esclera i la retina per la part posterior del globus ocular i forma l'úvea per la part anterior. La túnica vascular té dues parts: la coroides i l'úvea (iris i cos ciliar).

La *coroides* és rica en vasos sanguinis i s'extèn des de la inserció del nervi òptic fins l'*ora serrata* on es transforma en el cos ciliar. La seva funció és nodrir la part anterior de l'úvea i les capes més externes de la retina.



**Fig. 1.1.** Parts de l'ull. Secció horitzontal. Modificat de Tripathi BJ, 1984.

El *cos ciliar* s'extèn des de l'*ora serrata* fins l'arrel de l'iris, que separa les cambres anterior i posterior de l'ull, tal i com s'observa a la figura 1.1. Està dividit en dues parts: la part posterior (*pars plana*) i la part anterior (*pars plicata*) on es troben els processos ciliaris (on es produeix l'humor aquós) i el múscul ciliar.

L'*iris* fa de separació entre les dues cambres oculars, formant un angle amb la còrnia conegut com a *angle iridocornial*. L'iris actua com un diafragma regulant la llum que arriba a la retina a través de la pupil·la. També l'humor aquós passa de la cambra posterior a l'anterior travessant la pupil·la.

Des de l'epitel·li ciliar surten els *l·ligaments suspensoris* o *zònules* que l'uneixen amb el cristallí. La contracció i relaxació del múscul ciliar permet modificar la corbatura del cristallí mitjançant els l·ligaments suspensoris (acomodació).

La **túnica sensorial** la formen dues estructures: la retina i l'epitel·li pigmentari de la retina.

L'*epitel·li pigmentari de la retina* és la capa més externa de les dues i es troba unida a la coroides. S'extèn des del nervi òptic fins l'ora serrata, on es transforma en l'epitel·li ciliar pigmentat.

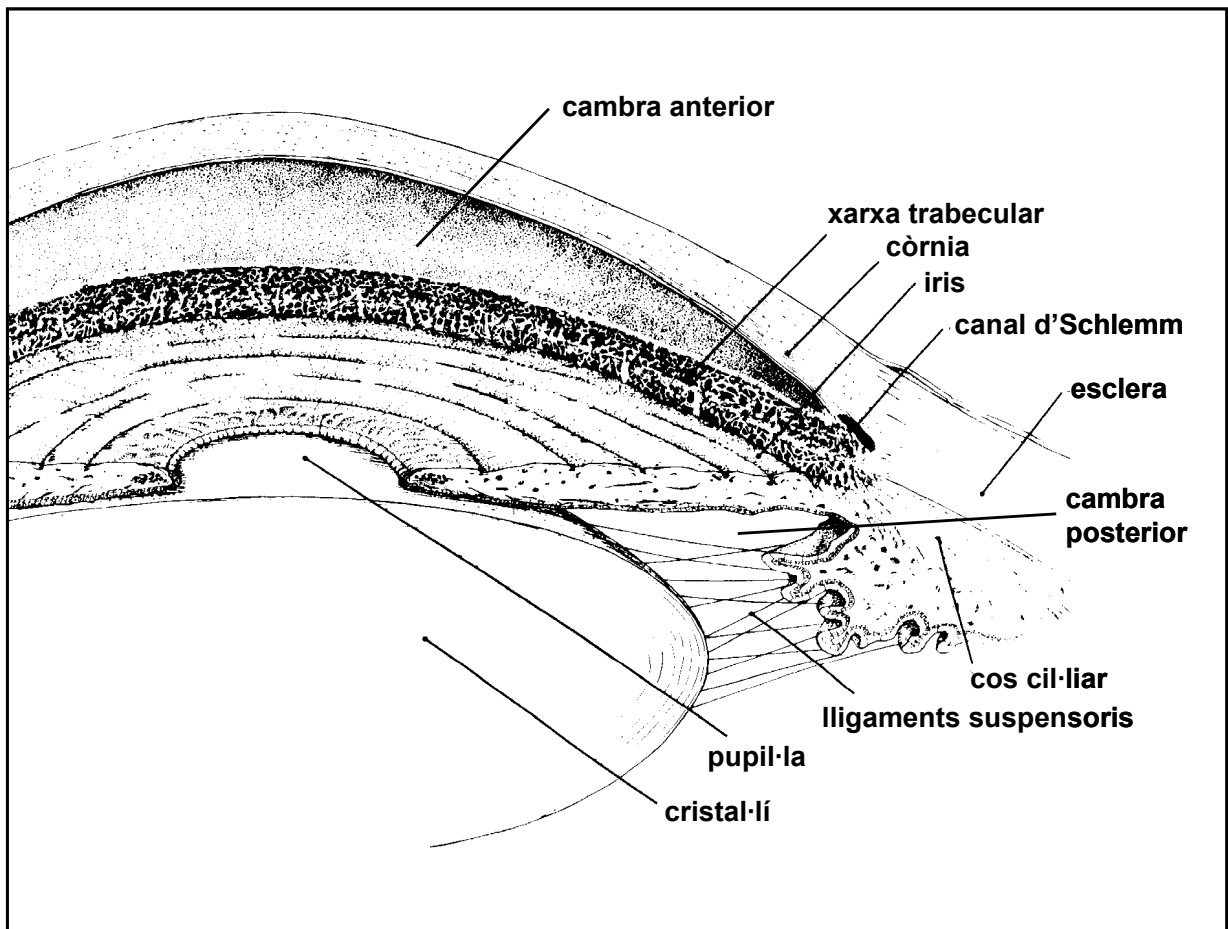
La *retina* ocupa aproximadament uns 2/3 de la part posterior del globus ocular. És una capa transparent que està unida dèbilment a l'epitel·li pigmentari. Aquí es troben els fotoreceptors (cons i bastons), les interneurons i les cèl·lules ganglionars, els axons de les quals formen les fibres del nervi òptic.

### **1.1.2 Anatomia de les cambres oculars**

A l'ull s'observen dues cambres clarament diferenciades: la cambra posterior i la cambra anterior (Figura 1.2).

La *cambra posterior* és un espai triangular delimitat per l'iris, el cos ciliar, el cristal·lí i el vitri anterior (Tripathi BJ, 1984). Aquest espai conté l'humor aquós, igual que la cambra anterior.

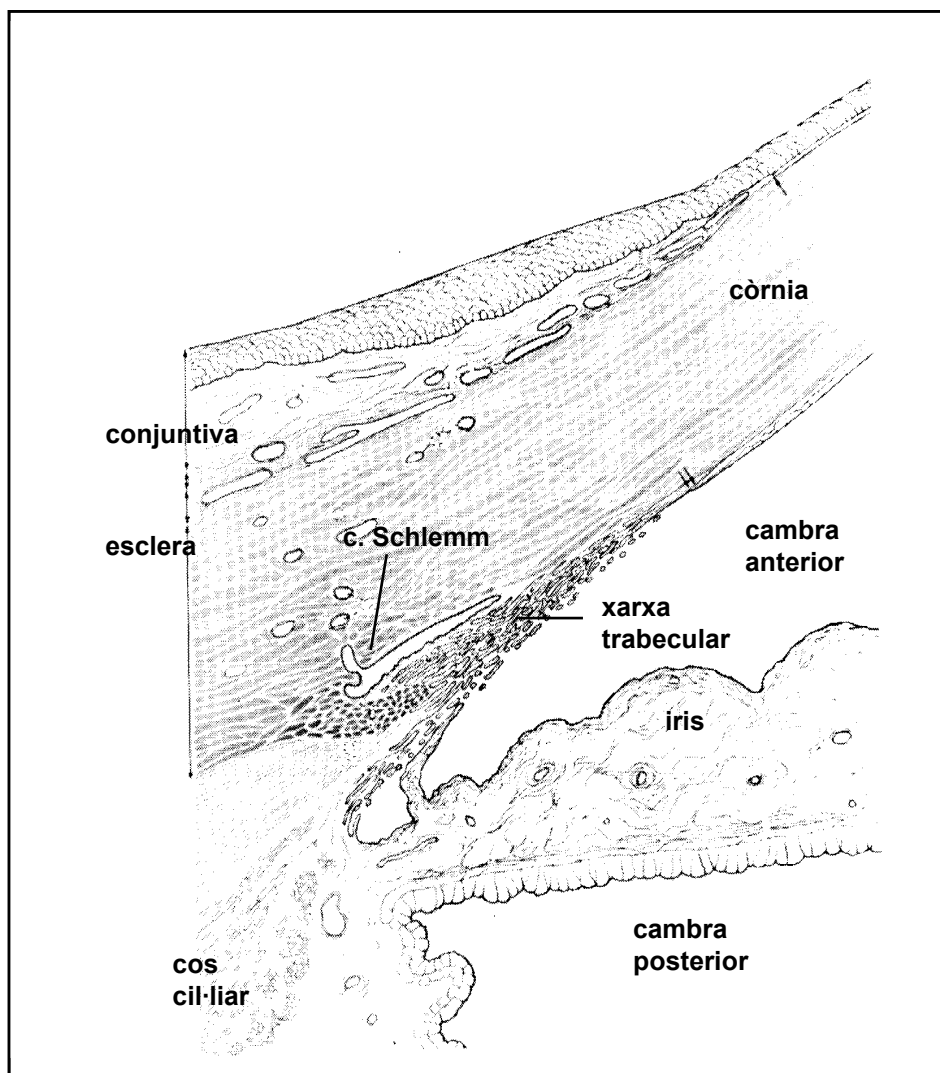
La *cambra anterior* limita amb la còrnia per la part anterior, lateralment amb la part anterior del cos ciliar que forma l'angle iridocornial i per la part posterior amb la cara anterior de l'iris (Tripathi BJ, 1984). La cambra anterior conté l'humor aquós, líquid incolor i transparent, que proporciona nodrients a les estructures avasculares (còrnia i cristal·lí). L'humor aquós contribueix a mantenir la pressió intraocular (IOP) i la morfologia de l'ull per a una correcta funció visual.



**Fig. 1.2.** Esquema de las cambres oculars (anterior i posterior) i les estructures que les delimiten. Modificat de Tripathi BJ, 1984.

### 1.1.3 L'angle iridocornial

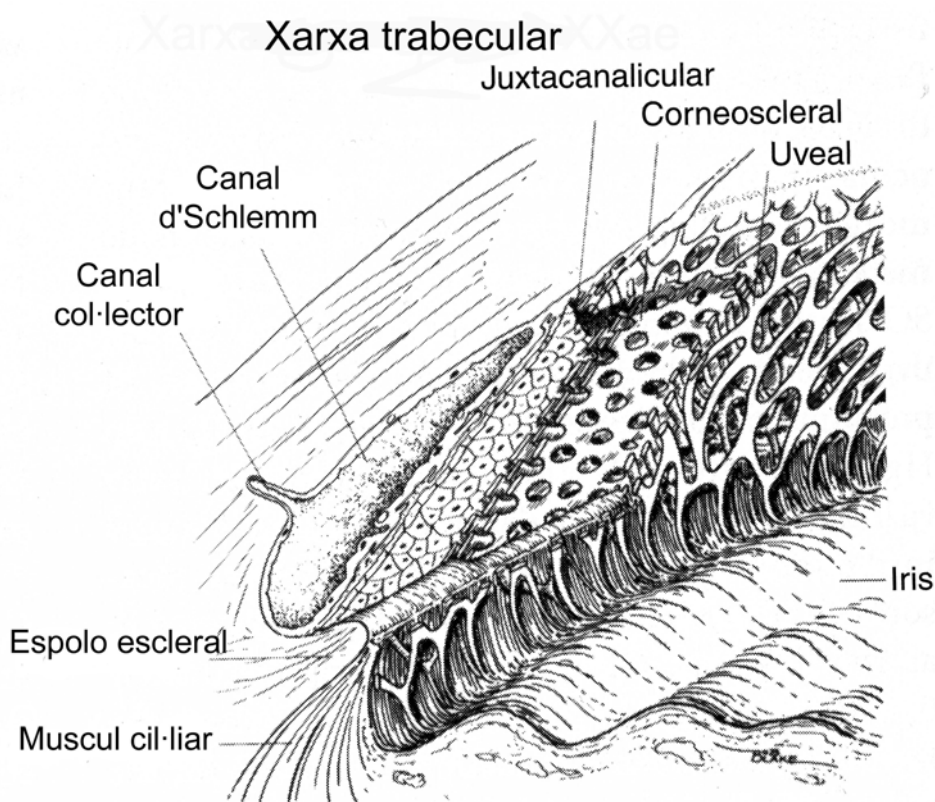
L'angle iridocornial està format per la zona d'unió entre la còrnia, l'esclera i la inserció de l'iris en aquest nivell. En condicions normals l'angle té uns  $30^\circ$  i és en aquesta zona on es troben les estructures d'evacuació de l'humor aquós: la xarxa trabecular i el canal d'Schlemm. L'humor aquós flueix a través de la xarxa trabecular abans d'arribar a la circulació venosa via el canal d'Schlemm i els canals col·lectors (venes aquoses).



**Figura 1.3.** Angle iridocornial i estructures que el formen. Modificat de Cole, 1984.

### 1.1.3.1 La xarxa trabecular

La xarxa trabecular és un teixit d'estructura similar a una esponja que s'extèn entre la còrnia, l'espòl escleral i l'úvea. A nivell anatòmic es poden diferenciar tres parts diferents estructural i funcionalment: 1) el trabècul uveal, que representa la part més interior de la xarxa; 2) el trabècul corneoescleral, localitzat entre l'espòl escleral i la còrnia; i 3) el trabècul cribiforme o juxtacanalicular, adjacent a la cara interna del canal d'Schlemm (Gabelt & Kaufman, 2002).



**Figura 1.4:** Tall longitudinal de les tres capes de la xarxa trabecular: uveal, corneoescleral i juxtacanalicular. Modificat de Gabelt *et al.*, 2003.

El *trabècul uveal* és la part en contacte directe amb a la cambra anterior. Està format per fines làmines de teixit connectiu provinents de l'iris i del cos ciliar. Aquestes làmines, recobertes per cèl·lules endotel·lials, estan orientades principalment en el plà equatorial i formen una malla tridimensional amb espais intercel·lulars de tamany gran que ofereixen baixa resistència al fluxe de l'humor aquós (Lütjen-Drecoll & Rohen, 1994; Llobet *et al.*, 2003).

El *trabècul corneoesclearal* és la capa intermitja i es caracteritza per la presència de làmines recobertes per cèl·lules endotel·lials, igual que el trabècul uveal, que descansen sobre una membrana basal. Aquestes làmines de teixit són riques en glicoproteïnes, col·lagen, àcid hialurònic i fibres elàstiques. És una estructura amb una organització més complexa que la capa anterior i amb uns espais intercel·lulars més petits que augmenten la resistència al pas de fluid.

El *trabècul juxtacanalicular o cribiforme* és la part més externa de la xarxa trabecular en contacte directe amb la cara interior del canal d'Schlemm a través d'un sistema de fibril·les. Està format per cèl·lules contingudes en una matriu extracel·lular més densa formada per una gran varietat de macromolècules, com l'àcid hialurònic, altres glicosaminoglicans, col·lagen, fibronectina i altres glicoproteïnes, produïdes probablement per cèl·lules endotel·lials de la xarxa i que influiran parcialment en la modulació de la resistència al fluxe. És en aquesta capa on el tamany dels espais intercel·lulars és més petit i l'humor aquós troba la màxima resistència (Gabelt & Kaufman, 2002).

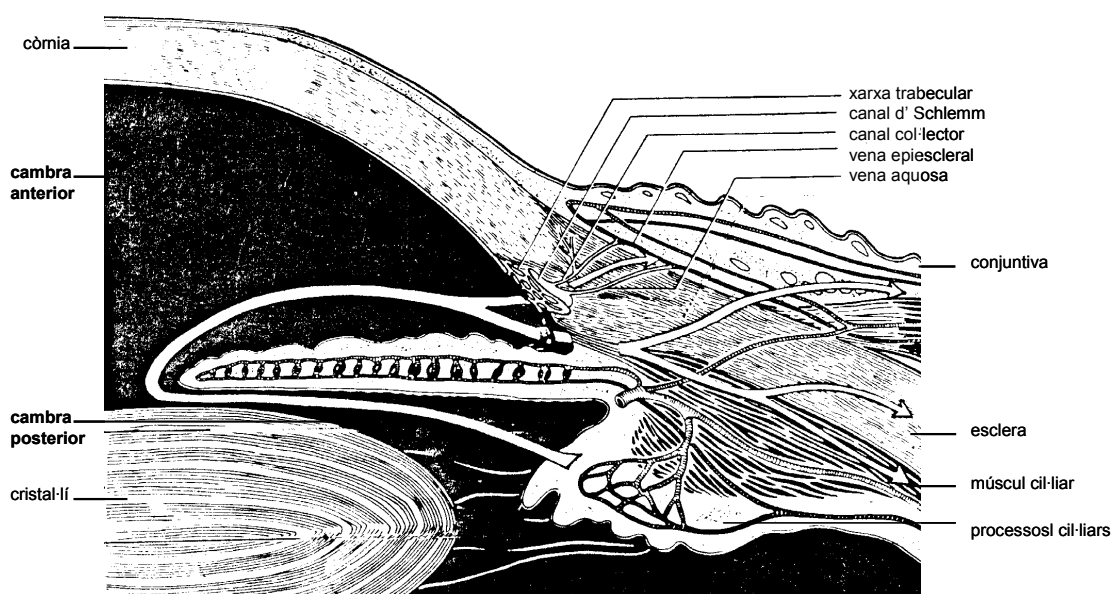
### 1.1.3.2 El canal d'Schlemm

El canal d'Schlemm és l'estructura encarregada de recol·lectar i evacuar l'humor aquós cap a la circulació venosa. L'última barrera que ha de travessar l'humor aquós abans d'abandonar l'ull és l'endotel·li intern del canal, el qual està recobert per cèl·lules endotel·lials disposades equatorialment que no descansen sobre cap membrana basal, però que està en estret contacte amb una capa de cèl·lules subendotel·lials amb disposició radial. Processos cel·lulars mantenen unides les dues capes (Lütjen-Drecoll & Rohen, 1994). Degut a la seva superfície altament porosa, s'estima que l'endotel·li del canal d'Schlemm proporciona d'un 10% a un 25% de la resistència total a l'evacuació de l'humor aquós per la via trabecular (Gabelt & Kaufman, 2002).



## 1.2 Humor aquós

L'humor aquós és el fluid que es troba contingut a les cambres anterior i posterior. Tradicionalment se'l considerava un líquid estanc, però en realitat l'humor aquós està en circulació continua: es forma als processos ciliars del cos ciliar i des d'aquí omple la cambra posterior per fluir a través de la pupil·la cap a la cambra anterior, on serà drenat per les estructures d'evacuació cap a la circulació venosa (Gabelt & Kaufman, 2002). La formació i el fluxe de l'humor aquós són dos processos que compleixen dues funcions importants: 1) proporcionar nodrients al cristal·lí i la còrnia, que són metabòlicament actius però avasculars, i també als teixits de l'angle iridocornial, i 2) mantenir una pressió intraocular relativament alta comparada amb la pressió intersticial d'altres teixits, que evitarà deformacions del globus ocular permetent una correcta funció òptica (Nilsson & Bill, 1994).



**Figura 1.5.** Esquema del segment ocular anterior de primat. Es mostren les cambres oculars i el fluxe de l'humor aquós. L'humor aquós format als processos ciliars, omple la cambra posterior, flueix per la pupil·la cap a la cambra anterior i s'elimina a nivell de l'angle iridocornial per la via trabecular i la via uveoescleral. Modificat de Kaufman *et al.*, 1984.

### 1.2.1 Composició de l'humor aquós

L'humor aquós es forma a través de diferents processos fisiològics, com la difusió i la ultrafiltració del plasma a través dels capil·lars de l'epitel·li ciliar fins l'estroma ciliar, i d'aquí a través dels epitel·lis pigmentat i no pigmentat del cos ciliar cap a la cambra posterior. Malgrat això, la composició de l'humor aquós és diferent a la del plasma degut a dues característiques fisiològiques del segment anterior: l'existència d'una *barrera mecànica hemato-aquosa* de naturalesa epitel·lial i endotel·lial i el *transport actiu* de diferents substàncies a través de l'epitel·li ciliar.

La presència de baixes concentracions de proteïnes i altes concentracions d'ascorbat són les principals diferències en la composició de l'humor aquós respecte el plasma. La concentració de proteïnes en el plasma és d'uns 6-7 g/100 ml, mentre que a l'humor aquós és només de 5-15 mg/100 ml en els humans i d'uns 50 mg/100 ml en conills. S'ha demostrat però, que encara que en concentracions més baixes, totes les proteïnes del plasma estan presents a l'humor aquós (Davson, 1990). L'albumina és més abundant en l'humor aquós que en el plasma i representa la meitat de les proteïnes totals de l'humor aquós, assolint concentracions de 0.05 a 0.07 mg/ml (Berman, 1991).

Els nivells d'ascorbat en l'humor aquós són unes 20 vegades superiors que en el plasma. L'ascorbat és transportat activament a l'epitel·li ciliar pigmentat mitjançant un co-transportador de sodi ( $2 \text{ Na}^+ : 1 \text{ ascorbat}$ ), però es desconeix com difon a la cambra posterior. Una de les funcions que s'ha atribuït a les altes concentracions d'ascorbat, és la protecció del pol anterior enfront els radicals lliures formats per la radiació UV (Nilsson & Bill, 1994).

Les concentracions d'alguns *aminoàcids* són més altes en l'humor aquós que en el plasma, indicant que són transportats activament a través de l'epitel·li ciliar. En efecte, s'han descrit fins a quatre transportadors diferents d'aminoàcids que juguen un paper important en la composició de l'humor aquós com a nodrient per les estructures avasculares. Els aminoàcids, junt amb altres substàncies poden difondre des de la cambra posterior a l'humor vitri, on seran absorbits per la retina (Nilsson & Bill, 1994).

La concentració de *glucosa* a l'humor aquós és inferior a la del plasma i és encara més baixa a l'humor vitri, diferències que s'han atribuït al consum de glucosa

pel cristal·lí, la còrnia i la retina (Davson, 1990). La glucosa se secreta a la cambra posterior a través de l'epitel·li ciliar per difusió facilitada (Nilsson & Bill, 1994).

**Taula 1.1.** Composició de l'humor aquós

<b>Components</b>	<b>Concentració</b>
Electròlits (mM) *	
Na <sup>+</sup>	142
K <sup>+</sup>	4
Cl <sup>-</sup>	131
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	20
Mg <sup>2+</sup>	1
Ca <sup>2+</sup>	1.2
Solut orgànics (mM) *	
Ascorbat	1.13
Glutatió	1-10·(10 <sup>-3</sup> )
Lactat	4.5
Citrat	0.1
Glucosa	2.7-3.9
Urea	4.1
Aminoàcids	
Substàncies biològicament actives (ng/ml) *	
Prostaglandines	2
AMPc	8
Catecolamines	
Norepinefrina	0.8-1.14
Epinefrina	0-0.13
Nucleòtids (µM) †	
Adenosina 5'tetrafosfat (Ap <sub>4</sub> )	0.197
Diadenosina tetrafosfat (Ap <sub>4</sub> A)	0.34
Diadenosina pentafosfat (Ap <sub>5</sub> A)	0.08

\* (Berman, 1991); † (Pintor *et al.*, 2003; Pintor *et al.*, 2004)

### 1.2.2 Formació de l'humor aquós

Com s'ha comentat anteriorment, l'humor aquós es forma com a resultat de tres processos fisiològics: *difusió*, *ultrafiltració* i *transport actiu (secreció activa)*. Els dos primers són processos passius que no necessiten una participació cel·lular activa.

La **difusió** de soluts a través d'una membrana té lloc a favor de gradient de concentració. Degut a la composició de les membranes cel·lulars les substàncies amb una composició lipofílica tendiran a penetrar-hi fàcilment, seguint aquest procés (Gabelt & Kaufman, 2002).

La **ultrafiltració** té lloc quan el plasma sanguini penetra pels capil·lars de l'epitel·li ciliar fins a l'estroma ciliar. Els capil·lars de l'estroma ciliar són fenestrats, el que permet un ràpid intercanvi de soluts entre la sang i l'estroma ciliar. L'epitel·li ciliar té dues capes, una pigmentada que està en contacte amb l'estroma dels processos ciliars i l'altre no pigmentada en contacte amb la cambra posterior. Les cèl·lules no pigmentades estan en estret contacte mitjançant unions hermètiques (*tight junctions*) impedit la difusió lliure de substàncies entre l'estroma i la cambra posterior, de manera que constitueixen part de la barrera hemato-aquosa. Molècules grans com l'albumina poden arribar a través dels capil·lars fins als espais intercel·lulars de la capa pigmentada, però les unions hermètiques impediran que arribin a la cambra posterior. La ultrafiltració no és el mecanisme prioritari de formació de l'humor aquós en condicions fisiològiques, però en situacions com els estats inflamatoris, serà més probable que la barrera hemato-aquosa deixi passar molècules de tamany més gran, com l'albumina (Lütjen-Drecoll & Rohen, 1994).

Aquests dos processos són els responsables de la formació d'un reservori d'humor aquós a l'estroma ciliar i d'aquí serà secretat activament cap a la cambra posterior a través de l'epitel·li ciliar.

La **secreció activa** de l'humor aquós té lloc principalment a les cèl·lules no pigmentades de l'epitel·li ciliar. Dos són els factors que afavoreixen aquest model. Primerament cal tenir en compte que el transport actiu de substàncies contra gradient de concentració consumeix energia, provinent de l'hidròlisi de l'ATP. S'ha observat una major quantitat de mitocondries a les cèl·lules no pigmentades que a les pigmentades, suggerint una major activitat metabòlica a les primeres. L'altre factor determinant és una major activitat a l'epitel·li no pigmentat de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , enzim que s'ha descrit com a responsable de la formació de l'humor aquós. Estudis realitzats en presència d'inhibidors com la ouabaïna mostren una reducció en la formació d'humor aquós (Nilsson *et al.*, 1990). La bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  es localitza a la membrana basolateral de les cèl·lules no pigmentades. Treu 3  $\text{Na}^+$  fora de les cèl·lules no pigmentades al mateix temps que 2  $\text{K}^+$  entren des de l'humor aquós a l'interior de les cèl·lules. Això fa que incrementi la concentració de  $\text{Na}^+$  als espais intercel·lulars i a les invaginacions de

la membrana basal, creant un ambient hiperosmòtic que provocarà la sortida d'aigua. També sortiran anions, principalment clorur i bicarbonat, per mantenir l'electroneutralitat de l'humor aquós.

La taxa de formació de l'humor aquós és normalment constant amb poques fluctuacions, essent lleugerament superior durant el dia (2,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) respecte la nit (1,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ ). Aquesta variació diürna es deu probablement a una major activitat simpàtica durant el dia, però també a d'altres factors hormonals i nerviosos (Nilsson *et al.*, 1990).

L'ull està altament innervat per terminals nerviosos simpàtics, parasimpàtics i sensorials que arriben als processos ciliars, les estructures d'evacuació i els vasos sanguinis uveals (Ten Tusscher *et al.*, 1994; Mintenig *et al.*, 1995; Belmonte *et al.*, 1997).

Les *fibres nervioses simpàtiques* són més abundants al múscul dilatador de l'iris i als vasos uveals, encara que també en trobem als processos ciliars i a l'angle de la cambra anterior, indicant que el sistema nerviós simpàtic pot tenir influència tant en la formació com en l'evacuació de l'humor aquós. Agonistes adrenèrgics no selectius com l'adrenalina (estimula receptors  $\alpha$  i  $\beta$ ) influeixen en ambdós processos, mentre que agonistes adrenèrgics  $\beta$  com l'isoprotenerol i la terbutalina estimulen la formació d'humor aquós i agonistes de receptors  $\alpha_2$  com l'apraclonidina la redueixen (Nilsson & Bill, 1994; Gabelt *et al.*, 2003). Això explicaria l'efecte dual de l'adrenalina. Els antagonistes  $\beta$  adrenèrgics o  $\beta$ -bloquejants (com timolol, carteolol i betaxolol, entre d'altres), actuen disminuint la formació de l'humor aquós i s'utilitzen àmpliament en el tractament del glaucoma degut al seu efecte hipotensor.

L'*estimulació parasimpàtica* prové dels nervis oculomotors i dels nervis facials. Les fibres nervioses facials contenen acetilcolina i pèptid intestinal vasoactiu (VIP), que s'allibera mitjançant estimulació dels nervis facials. L'estimulació dels nervis facials provoca un augment de la IOP, principalment degut a vasodilatació de l'úvea, però també en part a l'alliberació de VIP. S'ha demostrat l'efecte d'aquest neuropèptid sobre la regulació del fluxe d'humor aquós amb experiments en primats, on la injecció intravenosa de VIP n'augmentava la formació, encara que part de l'efecte de VIP es deu a l'activació del sistema nerviós simpàtic (Nilsson *et al.*, 1986).

Finalment el sistema nerviós sensorial es troba present també a l'úvea on trobem dos tipus de fibres sensorials: 1) mecanoreceptors d'alt llindar, que responen només a estímuls mecànics i 2) fibres polimodals nociceptives de baix llindar que

s'activen tant per estímuls mecànics, com per químics i/o tèrmics. Ambdós tipus de nociceptors serien responsables del dolor que acompanya a diferents tipus d'estats inflamatoris oculars, com l'uveïtis o el dolor derivat d'intervencions quirúrgiques (Ten Tusscher *et al.*, 1994; Mintenig *et al.*, 1995; Belmonte *et al.*, 1997).

Un altre mecanisme lligat a la formació de humor aquós és el sistema adenilat ciclasa, complex enzimàtic unit a la membrana que augmenta la formació intracel·lular d'AMPc i que està present als processos ciliars. A l'epitel·li ciliar diferents substàncies que, com neurotransmissors i hormones, influeixen en la secreció de l'humor aquós també afecten la formació d'AMPc. Tot i que inicialment es creia que una disminució en els nivells d'AMPc implicava un augment en la formació d'humor aquós, actualment es creu que la correlació és positiva. Diferents compostos estimulen la formació d'AMPc, com per exemple els agonistes  $\beta$ -adrenèrgics. L'estimulació dels receptors  $\beta_2$  dels processos ciliars augmenta la formació d'AMPc al cos ciliar, probablement via proteïna G estimuladora que activarà l'adenilat ciclasa donant lloc a la formació intracel·lular d'AMPc. Els agonistes  $\alpha_2$ , com la clonidina i l'apraclonidina, no tenen gairebé efecte sobre la formació basal d'AMPc, però inhibeixen la formació induïda per l'estimulació dels receptors  $\beta$ , actuant sobre el complex adenilat-ciclasa via una proteïna G inhibidora (Nilsson & Bill, 1994).

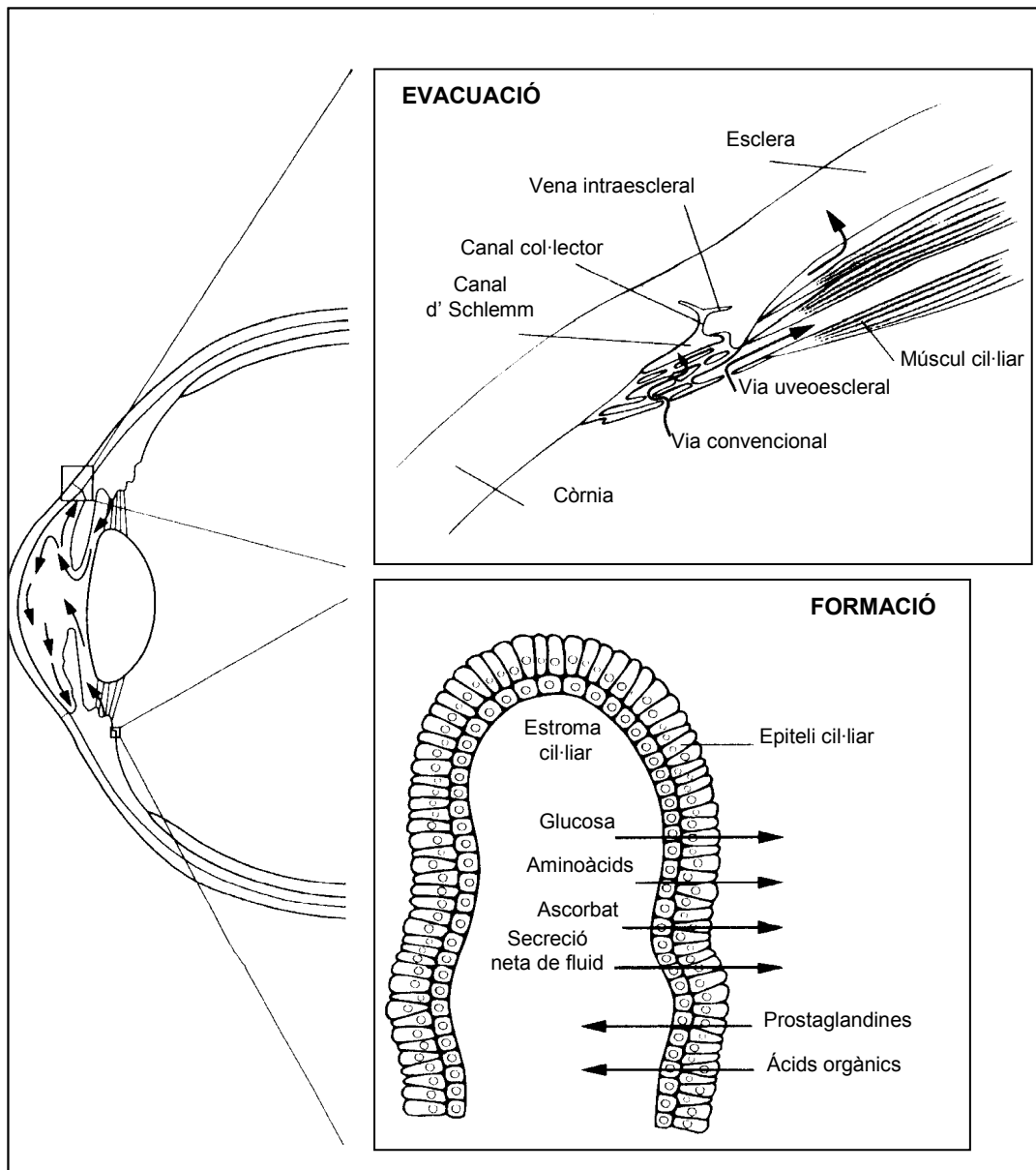


Figura 1.6. Formació i evacuació de l'humor aquós. Modificat de Nilsson & Bill, 1994.

### 1.2.3 Evacuació de l'humor aquós

Com s'ha comentat anteriorment, l'humor aquós secretat a la cambra posterior per l'epitel·li ciliar, flueix a través de la pupil·la cap a la cambra anterior. L'absència d'una barrera entre la cambra posterior i l'humor vitri, no impedeix que l'humor aquós flueixi en aquesta direcció. Malgrat tot la quantitat que flueix cap al vitri és gairebé despreciable comparada amb el fluxe cap a la pupil·la. Una mínima quantitat de fluid també passa cap a la còrnia i cap a l'iris a través dels seus estromes.

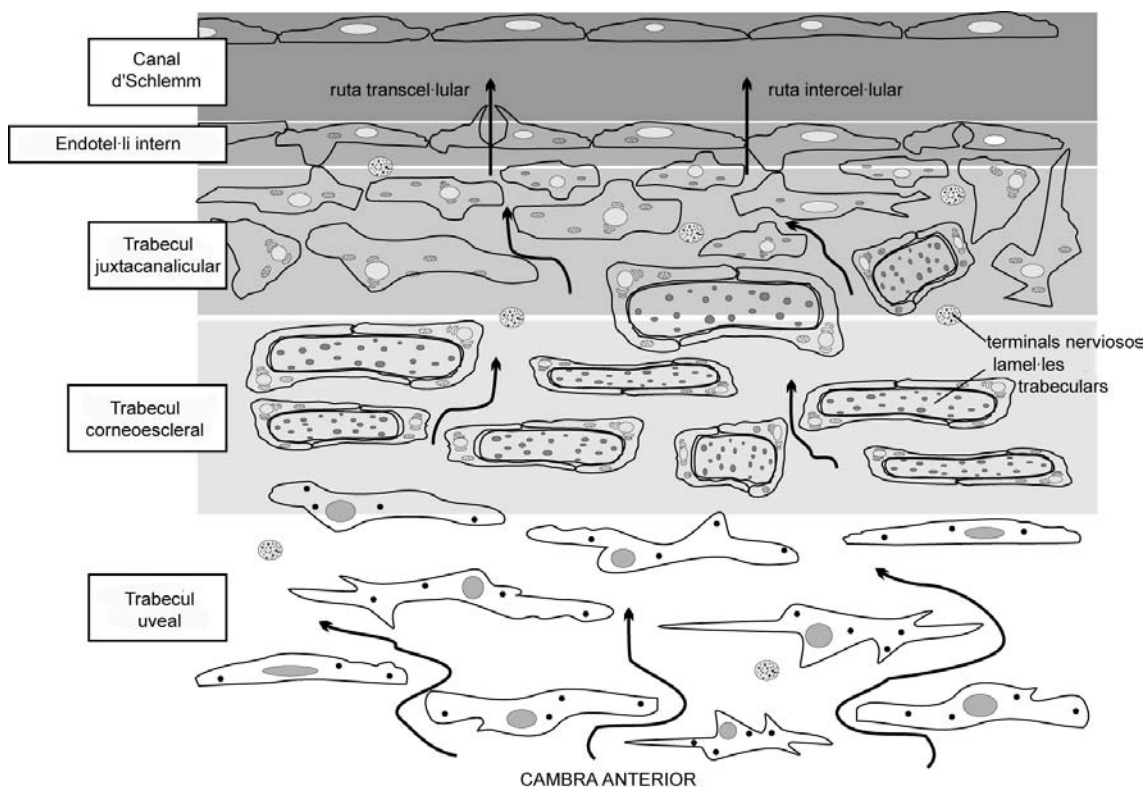
Un cop a l'angle de la cambra, l'humor aquós es pot drenar principalment per dues vies: a través de la xarxa trabecular i el canal d'Schlemm (via trabecular o convencional) o a través del cos ciliar cap a l'esclera (via uveoescleral o no convencional) (Tripathi BJ, 1984; Davson, 1990).

L'evacuació a través de la *via convencional* consisteix en el pas de l'humor aquós a través de la xarxa trabecular. L'amplitud dels espais intercel·lulars a les capes uveal i cornioescleral indica que la resistència al pas de fluid és mínima en aquesta part i màxima al trabècul cribiforme i a l'endotel·li del canal. Estudis amb primats han demostrat que un 90% de la resistència total es localitza en aquest segment (Lütjen-Drecoll & Rohen, 1994). Per tant els espais entre les cèl·lules trabeculars (porositat del teixit) controlen el pas de l'humor aquós cap a l'endotel·li del canal. Si per algun motiu els espais s'obstrueixen, l'evacuació de l'humor aquós es veu dificultada.

L'endotel·li del canal té gran densitat de porus a la seva superfície, estimant-se que aquesta capa proporciona del 10% al 25% de la resistència total d'aquesta via (Gabelt & Kaufman, 2002). Degut a que en condicions fisiològiques aquest endotel·li està sotmès a canvis de pressió i fluxe, les cèl·lules d'aquesta regió han desenvolupat mecanismes capaços de permetre el pas ràpid del fluid. Un d'aquests mecanismes consisteix en la formació de canals transcel·lulars, també anomenats vacuoles gegants, que formaran un porus pel qual l'espai subendotel·lial es posarà en contacte amb el lumen del canal (Davson, 1990; Lütjen-Drecoll & Rohen, 1994). La via convencional depèn de la pressió intraocular (IOP), per tant quan la IOP incrementi, el nombre de vacuoles augmentarà i disminuirà fins desaparèixer completament quan la IOP disminueixi. Per sobre de valors determinats de pressió, el procés de vacuolització se satura i ja no segueix un comportament lineal. Part de l'humor aquós seguirà una via paracel·lular tal i com s'ha demostrat estudiant el pas de partícules de ferritina entre



les cèl·lules endotel·lials del canal. La importància d'aquestes dues rutes està encara per determinar (Gabelt & Kaufman, 2002).



**Figura 1.7.** Esquema de la xarxa trabecular. Les fletxes indiquen la direcció de l'humor aquós des de la cambra anterior fins el canal d'Schlemm. La resistència al fluxe de l'humor aquós incrementa progressivament des de la cambra anterior fins el canal d'Schlemm a mesura que els espais intercel·lulars disminueixen de tamany. L'humor aquós flueix entre els espais intercel·lulars de les cèl·lules trabeculars i travessa la cara interna del canal d'Schlemm per dues rutes: una transcel·lular a través de les vacuoles gegants i una intercel·lular. Modificat de Llobet *et al.*, 2003.

La resistència al pas de fluid en la via convencional es pot modificar per tres mecanismes: canvis en el tò del múscul ciliar, efecte directe sobre la xarxa trabecular i canvis en la composició de la matriu extracel·lular, com s'explica amb més detall posteriorment.

La permeabilitat de la xarxa trabecular és susceptible de ser modulada per diferents factors, tals com canvis en les seves propietats contràctils o canvis en el volum cel·lular. L'acció combinada d'aquests diferents factors modularà finalment l'evacuació de l'humor aquós, com es comenta més endavant (Llobet *et al.*, 2003).

Els tendons del múscul ciliar estan insertats a les làmines del trabècul cribiforme provocant una distensió de la xarxa i un augment dels espais intercel·lulars quan el múscul es contrau. Així un augment del tò ciliar causarà una disminució en la resistència trabecular i en conseqüència s'observarà un augment de l'evacuació de l'humor aquós. El múscul ciliar rep innervació simpàtica que el relaxa i innervació parasimpàtica que el contrau. Per tant l'estimulació parasimpàtica amb agonistes com la pilocarpina augmentarà l'evacuació de l'humor aquós. En canvi s'ha estudiat una disminució de l'evacuació després de l'estimulació simpàtica en primats (Nilsson & Bill, 1994).

Els canvis en la matriu extracel·lular també provoquen alteracions en l'evacuació de l'humor aquós. La xarxa trabecular en condicions fisiològiques té la capacitat de sintetitzar i degradar components de la matriu extracel·lular (Lütjen-Drecoll *et al.*, 2001). Estudis estructurals de la xarxa trabecular revelen la presència de plaques de teixit connectiu amb un nucli de fibres elàstiques i de col·lagen tipus I. Només una petita quantitat d'aquestes fibres elàstiques conté elastina. Una matriu de glicosaminoglicans del tipus condroitin i dermatan sulfat, conté les fibres elàstiques i les fibres de col·lagen. Altres components de la matriu extracel·lular de les cèl·lules trabeculars són el col·lagen tipus IV, laminina, fibronectina i proteoglicans del tipus heparansulfat (Lütjen-Drecoll, 1999). Les alteracions de la composició de la matriu influiran en l'evacuació de l'humor aquós, a l'igual que alteracions en l'equilibri entre la síntesi i la degradació dels seus components (Llobet *et al.*, 2003).

A través de la *via uveoescleral*, l'humor aquós penetra des de l'angle iridocornial al cos ciliar. La manca d'una barrera epitel·lial entre la cambra anterior i el cos ciliar afavoreix aquesta ruta. L'humor aquós penetra entre les fibres del múscul ciliar cap als espais supraciliar i supracoroidal. Des d'aquí fluirà cap a l'esclera o a través de petits canalicles cap a l'exterior del globus ocular on serà absorbit pels vasos

de l'òrbita i de la conjuntiva. L'evacuació de l'humor aquós a través de la via uveoescleral és independent de la pressió intraocular. A més un augment en la IOP produeix una compressió del múscul ciliar i de l'espai supraciliar impedit l'evacuació de l'humor aquós.

### 1.3 La pressió intraocular (IOP)

Com s'ha indicat amb anterioritat, una de les funcions principals de la IOP és mantenir la forma del globus ocular perquè l'ull pugui desenvolupar una correcta funció òptica. La IOP no té el mateix valor a totes les parts del globus ocular. La pressió a la cambra posterior ha de ser superior respecte la cambra anterior per permetre el fluxe de l'humor aquós en aquesta direcció.

En condicions fisiològiques la IOP presenta algunes variacions, mantenint uns valors de 15-16 mm Hg a la cambra anterior en humans, mentre que en altres espècies pot variar (p.e. 18 mm Hg en bovins) (Erickson-Lamy *et al.*, 1988; Berman, 1991). Experimenta petites fluctuacions que són sincròniques amb els canvis de pressió arterial, augmentant durant la sístole i disminuint durant la diàstole. Aquestes variacions són només d'1-2 mm Hg, però poden augmentar quan els valors d'IOP són grans. La IOP és lleugerament més alta durant el dia que durant la nit, responent a una variació diürna en la taxa de formació d'humor aquós (Nilsson & Bill, 1994).

En condicions fisiològiques hi ha un equilibri entre la formació i l'evacuació de l'humor aquós: la IOP incrementa gradualment fins un valor suficient per conduir l'humor aquós a través de les estructures d'evacuació al mateix ritme que és produït pel cos ciliar. Per tant en equilibri:

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

essent  $F_{in}$ : formació de l'humor aquós;  $F_o$ : evacuació;  $F_{trab}$ : evacuació per la via trabecular i  $F_u$ : evacuació per la via uveoescleral.

La força que provoca la sortida de l'humor aquós a través de la xarxa trabecular és la diferència de pressió hidrostàtica entre la cambra anterior i les venes episclerals on drena l'humor aquós. Segons la llei d'Ohm, el fluxe a través d'un sistema (Q) és directament proporcional a la diferència de pressió entre l'entrada i la sortida del sistema ( $\Delta P$ ) i inversament proporcional a la resistència del sistema (R):

$$Q = \Delta P / R$$

Aquesta equació es pot aplicar a la dinàmica de fluids a l'ull, però amb una consideració important: l'evacuació a través de la via trabecular és dependent de pressió i l'evacuació uveoescleral és independent. Per tant:

$$F_{\text{trab}} = (F_{\text{in}} - F_{\text{u}}) = (IOP - P_v) / R$$

sent  $P_v$ : la pressió episcleral i  $R$ : la resistència de les vies d'evacuació. Si aïllem la IOP i expressem la resistència com a facilitat d'evacuació ( $C$ ), que és l'invers de la resistència, obtenim:

$$IOP = P_v + (F_{\text{in}} - F_{\text{u}}) / C$$

La determinació d'aquests paràmetres en ulls humans normals ha proporcionat els següents valors: IOP = 15-16 mm Hg,  $P_v$  = 8-9 mm Hg,  $F_{\text{in}}$  = 2.5 – 2.8  $\mu\text{l}/\text{min}$  i  $C$  o *facilitat d'evacuació* = 0.3 - 0.4  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mm Hg}$ . L'evacuació uveoescleral no s'ha determinat en ulls humans, però els valors teòrics són aproximadament 0.8  $\mu\text{l}/\text{min}$  (Nilsson & Bill, 1994).

En humans la IOP es mesura normalment mitjançant tonometria d'aplanació, que és una mesura indirecta basada en el següent principi: es mesura la força necessària per aplanar una àrea determinada de la còrnia i com que la pressió és igual a força per superfície, es podrà calcular la pressió.

### 1.3.1 Regulació de la IOP

Els valors de la IOP poden veure's modificats per diferents factors, com variacions en la pressió arterial o canvis en l'osmolaritat del plasma, però els factors determinants són els que influeixen en la formació i en l'evacuació de l'humor aquós, donat que els valors de IOP responen a un equilibri entre aquests dos processos (Nilsson & Bill, 1994). Els factors més importants que influeixen en la formació i en l'evacuació de l'humor aquós han estat comentats anteriorment (1.2.2 i 1.2.3) i s'ampliaran en el següent capítol.

### 1.3.2 Alteracions de la IOP: Glaucomes

Tal i com s'ha explicat anteriorment, la IOP està sotmesa a petites variacions durant el dia que es consideren fisiològiques. Però quan la IOP augmenta per sobre d'uns valors determinats pot derivar en un estat patològic: el glaucoma.

Es parla de glaucoma com si fos una única entitat patològica, però en realitat els glaucomes són un conjunt de patologies que tenen en comú una

degeneració progressiva del nervi òptic amb la consegüent pèrdua de visió i en la majoria de casos hipertensió ocular (Weinreb & Khaw, 2004). El glaucoma constitueix encara un important problema de salut pública tant en països industrialitzats com en països en vies de desenvolupament, essent una de les causes principals de ceguesa irreversible, de fet és la primera causa de ceguesa no traumàtica (Grehn, 2001).

En general els glaucomes es caracteritzen per una lesió progressiva del nervi òptic que s'acompanya amb una pèrdua del camp visual. Els axons de les cèl·lules ganglionars configuren la capa més interna de la retina que convergeixen en el disc òptic formant l'inici del nervi òptic. La convergència dels axons forma una depressió central o excavació al disc òptic. En ulls glaucomatosos aquesta excavació és més gran i profunda i la capa nerviosa té un gruix menor que en condicions fisiològiques (Weinreb & Khaw, 2004).

Els glaucomes es poden classificar de diferents maneres, però el més habitual és classificar-los en dos grans grups, glaucoma d'angle obert i glaucoma d'angle tancat. La prevalència del glaucoma d'angle obert està distribuïda uniformement arreu del món, mentre que el nombre de casos de glaucoma d'angle tancat és superior en països asiàtics (Coleman, 1999). En ambdós casos l'evacuació de l'humor aquós està dificultada bé sigui per motius físics o bé per causes associades a la funcionalitat de les estructures d'evacuació.

Existeixen també altres tipus de glaucomes secundaris a altres patologies o a tractaments perllongats amb esteroides (dexametasona). La xarxa trabecular o l'angle iridocornial també pot presentar anomalies de desenvolupament (glaucoma congènit) o haver estat danyada per algun traumatisme (glaucoma traumàtic) (Khaw *et al.*, 2004).

### **1.3.2.1 El glaucoma primari d'angle obert**

El glaucoma primari d'angle obert és una de les formes més comuns de glaucoma. En aquesta patologia la resistència a l'evacuació de l'humor aquós a través de la xarxa trabecular incrementa de manera gradual, per causes encara sense determinar. Aquest increment en la resistència provoca un augment progressiu de la IOP que lesionarà el nervi òptic. El glaucoma d'angle obert debuta a l'edat adulta, és normalment bilateral i no presenta símptomes detectables fins a estats avançats de la malaltia quan la pèrdua de visió es fa palesa, fet que dificulta el seu diagnòstic. Com ja s'ha comentat abans, el glaucoma d'angle obert causa canvis característics a nivell del

disc òptic que es poden acompanyar o no de pèrdues del camp visual. L'etiologia del glaucoma d'angle obert és encara desconeguda, encara que s'han identificat diferents factors que poden contribuir al seu desenvolupament. Un dels factors de risc més estretament lligat a l'aparició de glaucoma és una IOP elevada. Els canvis observats en el nervi òptic o en el camp visual estan associats a valors elevats de IOP (>21 mm Hg) encara que també es poden donar en individus amb pressions normals (15 mm Hg) o inferiors a la normal. Malgrat tot, la reducció de la IOP és la maniobra principal en el tractament del glaucoma, doncs valors elevats d'IOP estan associats a una major lesió del nervi òptic (Coleman, 1999; Khaw *et al.*, 2004).

S'han descrit diferents factors de risc relacionats amb l'aparició de glaucoma. L'edat i els nivells elevats d'IOP són dos dels factors rellevants, junt amb la raça. L'inici de les lesions del nervi òptic té lloc en edats més joves en individus de raça negra que de raça blanca. Degut a que les lesions s'acostumen a detectar en edats avançades, la degeneració del nervi òptic serà més important en aquells individus fent més difícil el seu tractament. Altres factors de risc importants són anomalies del camp visual, nivells alts de miopia i història familiar de glaucoma (Weinreb & Khaw, 2004).

Actualment, el tractament del glaucoma d'angle obert està encaminat a establir un grau de pressió intraocular que previngui el desenvolupament de futures lesions. En general es persegueix aconseguir un valor d'IOP un 20-50% inferior al que va produir la lesió inicial. Com més gran sigui el dany preexistent degut al glaucoma més baix haurà de ser aquest valor. Els nivells de pressió no seran els mateixos per cada pacient i s'hauran d'anar adequant comparant l'estat actual del nervi òptic amb el d'examen previs (Weinreb & Khaw, 2004).

L'ús de fàrmacs antiglaucomatosos, la teràpia amb làser o la cirurgia són les diferents estratègies utilitzades pel tractament del glaucoma. Els agents farmacològics actuen mitjançant dos mecanismes: augmentar l'evacuació o disminuir la producció de l'humor aquós.

Els fàrmacs bloquejants dels receptors  $\beta$  adrenèrgics o  $\beta$ -bloquejants, com el timolol, carteolol, betaxolol i levobunolol, disminueixen la secreció de l'humor aquós i són dels més freqüentment receptats. Altres fàrmacs que actuen disminuint la producció són els inhibidors de l'anhidrasa carbònica, com la dorzolamida i la brinzolamida. Els parasimpaticomimètics com la pilocarpina provoquen la contracció del múscul ciliar amb la conseqüent distensió de la xarxa trabecular i l'eixamplament

els espais intercel·lulars, augmentant l'evacuació de l'humor aquós per aquesta via. Uns dels fàrmacs més utilitzats darrerament són els anàlegs de prostaglandina (latanoprost, travoprost, bimatoprost) que augmenten l'evacuació de l'humor aquós a través de la via uveoescleral. Altres potencials candidats pel tractament del glaucoma són els fàrmacs neuroprotectors, l'eficàcia clínica dels quals encara no ha estat demostrada (Weinreb & Khaw, 2004; Woodward & Gil, 2004).

El tractament amb làser del glaucoma primari d'angle obert comprèn diferents procediments, essent la trabeculoplastia làser el més utilitzat. Aquesta tècnica consisteix en dirigir el làser a la xarxa trabecular per tal de disminuir la resistència a l'evacuació. Altres procediments inclouen l'ablació del cos ciliar mitjançant làser i la ciclofotocoagulació amb làser diòdic, aplicant-se aquest últim quan el tractament farmacològic i la cirurgia convencional no han donat resultats (Weinreb & Khaw, 2004).

La trabeculectomia és el procediment quirúrgic més utilitzat i consisteix en extreure una petita porció de xarxa trabecular per així augmentar el drenatge de l'humor aquós. Encara que en un principi és considerava a la cirurgia superior a nivell de disminució de la IOP i preservació de la visió respecte el tractament farmacològic, estudis recents no mostren diferències significatives en la progressió del glaucoma entre tractament inicial amb cirurgia o tractament farmacològic en un període de 5 anys (Weinreb & Khaw, 2004).

### **1.3.2.2 El glaucoma primari d'angle tancat**

En el glaucoma d'angle tancat l'accés de l'humor aquós a la xarxa trabecular està bloquejat total o parcialment per l'iris (Fig 1.7). Un dels mecanismes pels quals la xarxa trabecular s'obstrueix és l'anomenat bloqueig pupil·lar, que impedeix que l'humor aquós abandoni la cambra posterior. L'acumulació de fluid en aquesta zona provocarà una diferència de pressió entre la cambra anterior i la posterior. Aquesta diferència de pressió farà que l'iris s'arquegi cap endavant i la part anterior obstruirà l'accés a la xarxa trabecular (Coleman, 1999). Això tendirà a succeir amb més probabilitat quan la pupila estigui semidilatada. La IOP en aquestes condicions augmentarà de manera ràpida i dolorosa, principal diferència amb el glaucoma d'angle obert que és indolor.

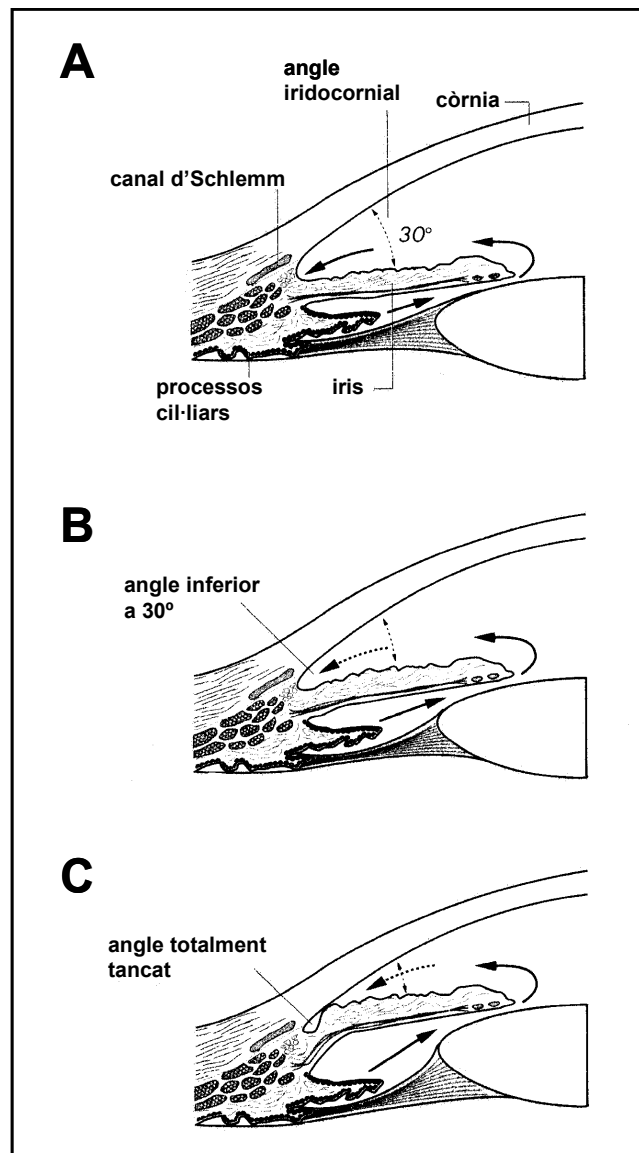
Un dels grups susceptibles de desenvolupar aquest glaucoma és el dels pacients hipermetrops, que tenen cambres anteriors menys profundes i globus oculars



més petits. Amb l'edat, el cristal·lí tendeix a augmentar de tamany essent també un factor de risc pel glaucoma d'angle tancat. Factors de risc addicionals inclouen una història familiar de la malaltia i sexe femení.

Amb l'acumulació anòmala de fluid l'ull esdevé edematós, essent l'edema corneal un signe característic que alterarà l'agudesa visual. El glaucoma d'angle tancat és una condició que requereix tractament d'urgència per tal de no comprometre la visió. Si el tractament s'endarrereix es poden formar adhesions entre l'iris i la còrnia, que danyaran de tal manera la xarxa trabecular, fent necessària la cirurgia per restablir el drenatge.

El tractament farmacològic del glaucoma d'angle tancat és similar al descrit pel d'angle obert, essent útils pel tractament de l'atac agut els agonistes colinèrgics, els agonistes adrenèrgics  $\alpha$ , els  $\beta$ -bloquejants, els inhibidors de l'anhidrasa carbònica i agents hiperosmòtics per via sistèmica. De tota manera, el tractament d'elecció pel glaucoma d'angle tancat és l'iridotomia amb làser, que obrirà una sortida per l'humor aquós, impedit l'abombament de l'iris i el posterior bloqueig de la xarxa trabecular. En moltes ocasions l'iridotomia s'haurà d'acompanyar de tractament farmacològic per disminuir la IOP (Coleman, 1999).



**Figura 1.8.** Estructura de l'angle iridocornial en diferents tipus de glaucoma. **A:** Glaucoma d'angle obert, on la morfologia de l'angle iridocornial és normal. **B:** Glaucoma crònic d'angle tancat: l'angle és més petit que en condicions normals. **C:** Glaucoma agut d'angle tancat: l'angle està bloquejat per l'iris.

### 1.3.2.3 Bases genètiques del glaucoma

Durant anys s'ha intentat establir si l'aparició del glaucoma tenia una base genètica i si existien mutacions associades a la malfunció dels mecanismes que generen un augment de la resistència de la xarxa trabecular al pas de l'humor aquós i que causarien el desenvolupament de glaucoma. Però no va ser fins el 1997, quan es va identificar el primer gen associat a l'aparició de glaucoma (Stone *et al.*, 1997). Aquest gen (MYOC) codifica per la proteïna TIGR (*Trabecular meshwork Inducible Glucocorticoid Response protein*) o miocilina, descoberta estudiant un model cel·lular de glaucoma induït per esteroides. L'expressió de TIGR s'induïa després de tractar les cèl·lules trabeculars humanes amb dexametasona, seguint una seqüència temporal similar a l'aparició dels signes clínics en el glaucoma induït per esteroides (Tamm *et al.*, 1999). Stone i col·laboradors van demostrar que mutacions en el gen que codifica per la miocilina estan correlacionades amb l'aparició de glaucoma juvenil i de glaucoma primari d'angle obert, encara que en aquest cas les mutacions estan presents només en un 4.6% dels pacients amb aquesta patologia (Stone *et al.*, 1997).

Un altre dels gens associats a glaucoma és CYP1B1, que pertany a la família CYP1 del citocrom P450, enzim implicat en el metabolisme de moltes substàncies, incloses la majoria de fàrmacs. CYP1B1 s'expressa també a les cèl·lules de la xarxa trabecular, entre d'altres teixits. Les mutacions d'aquest gen estan lligades a l'aparició de glaucoma congènit primari (Stoilov *et al.*, 1997).

El més recent dels gens identificats és el que codifica per l'optineurina (OPTN) (Rezaie *et al.*, 2002). Es van trobar mutacions en un 16.7% de les famílies estudiades que presentaven un tipus de glaucoma hereditari. La majoria d'aquestes famílies presentaven valors normals de IOP, mentre que la resta presentaven quadres mixtes de pressió normal i lleugerament elevada (23-26 mm Hg). Aquest és el primer gen associat a casos de glaucoma amb pressió normal. L'optineurina s'expressa a les cèl·lules trabeculars, a l'epitel·li ciliar no pigmentat i també s'ha trobat en l'humor aquós de diferents espècies estudiades.

## 1.4 La cèl·lula trabecular

Com s'ha descrit anteriorment, el teixit trabecular està format per cèl·lules contingudes en una matriu extracel·lular que configuren el lloc de major resistència d'evacuació de l'humor aquós. Tradicionalment considerat una estructura passiva, estudis realitzats en els últims anys han demostrat que les cèl·lules trabeculars mostren propietats morfològiques i funcionals diferents implicades en l'evacuació de l'humor aquós i per tant en la regulació de la IOP.

### 1.4.1 Poblacions cel·lulars de la xarxa trabecular

El desenvolupament de cultius cel·lulars primaris ha facilitat enormement l'estudi de la fisiologia de les cèl·lules trabeculars. D'aquesta manera les cèl·lules trabeculars s'han pogut caracteritzar segons les seves característiques electrofisiològiques (Coroneo *et al.*, 1991; Lepple-Wienhues *et al.*, 1994), estructurals (Hernandez *et al.*, 1987; Flügel *et al.*, 1991) o farmacològiques (Shade *et al.*, 1996; Sharif & Xu, 1996).

Mitjançant tècniques d'immunocitoquímica s'han pogut establir una sèrie de marcadors citològics per poder diferenciar les cèl·lules trabeculars de les estructures adjacents. Flügel i col·laboradors van caracteritzar les estructures d'evacuació de les cèl·lules trabeculars bovines en cultiu, mitjançant immunocitoquímiques on es va trobar que la tinció per diferents proteïnes era variable, essent positiva per vimentina i negativa per desmina en totes les regions del trabècul (Flügel *et al.*, 1991). Vimentina i desmina són dues proteïnes de citoesquelet (fil·laments intermitjos) particularment abundants en cèl·lules sotmeses a tensions mecàniques (Alberts *et al.*, 1994). L'actina  $\alpha$  de múscul llis, proteïna present en el múscul llis de diferents òrgans, presentava un marcatge positiu en la regió trabecular més propera al múscul ciliar i al lligament pectinat, però en canvi el marcatge per la desmina era negatiu al trabècul, a diferència del múscul ciliar. Tamm i col·laboradors també van demostrar mitjançant immunocitoquímica que les cèl·lules trabeculars humanes i de primat també presenten un marcatge positiu per l'actina  $\alpha$  de múscul llis en aproximadament un 10% de les cèl·lules en cultius suplementats amb un 10% de sèrum fetal boví (Tamm *et al.*, 1996).

En cultiu es poden diferenciar morfològicament dos tipus cel·lulars: cèl·lules del tipus *epitel·lial* i cèl·lules *fusiformes* (*spindle-like*) (Coroneo *et al.*, 1991). Altres autors

havien mostrat amb anterioritat la presència de les cèl·lules del tipus epitel·lial (Grierson *et al.*, 1985; Crean *et al.*, 1986). Es van estudiar ambdós tipus cel·lulars electrofisiològicament i també mitjançant microscopia electrònica (Coroneo *et al.*, 1991). Les cèl·lules epitel·lials mostraven característiques de cèl·lules amb gran activitat metabòlica, amb abundants cisternes de reticle endoplasmàtic, nombrosos ribosomes i un gran complex de Golgi amb moltes vesícules associades. No presentaven gaires microfil·laments (de 6-7 nm) al citoplasma i pocs fil·laments intermitjos (de 10-12 nm). Pel contrari, les cèl·lules fusiformes presentaven llargs processos citoplasmàtics i feixos de microfil·laments que ocupaven part de l'interior de la cèl·lula i de la perifèria i també fil·laments intermitjos. El complex de Golgi i el reticle endoplasmàtic no eren tan abundants com en les cèl·lules epitel·lials. Pel que fa a les característiques electrofisiològiques, les cèl·lules fusiformes presentaven uns potencials de membrana més hiperpolaritzats (-70.9 mV) que les cèl·lules epitel·lials (-49.7 mV) i responien a l'aplicació extracel·lular de  $Ba^{2+}$  1mM amb una despolarització i una descàrrega de potencials d'acció que desapareixien quan s'eliminava el  $Ca^{2+}$  extracel·lular i que no es bloquejaven amb tetrodotoxina. En cèl·lules trabeculars humanes també s'ha descrit aquest comportament (Lepple-Wienhues *et al.*, 1994). Es van registrar també fluctuacions espontànies del potencial de membrana i també fluctuacions induïdes per  $Ba^{2+}$ , que suggerien "potencials d'acció avortius" descrits anteriorment per cèl·lules de múscul llis vascular (Coroneo *et al.*, 1991).

### 1.4.2 Contractilitat de la cèl·lula trabecular

La presència a la xarxa trabecular de proteïnes contràctils com l'actina  $\alpha$  de múscul llis (Coroneo *et al.*, 1991; Flügel *et al.*, 1991; Tamm *et al.*, 1996) o la miosina de múscul llis (de Kater *et al.*, 1990), junt amb la caracterització electrofisiològica i morfològica dels diferents tipus cel·lulars, ha permès postular que la xarxa trabecular és un teixit amb propietats contràctils que influïrien en l'evacuació de l'humor aquós.

Com s'ha comentat a l'apartat anterior, les cèl·lules fusiformes presenten característiques cel·lulars contràctils, tals com la presència d'actina de múscul llis, un potencial de membrana més negatiu que les cèl·lules epitel·lials i es despolaritzen en resposta a diferents substàncies tals com l'ouabaina (indicatiu de la presència de la bomba electrogènica de  $Na^+/K^+$ ) solucions d'alt  $K^+$  extracel·lular i  $Ba^{2+}$  extracel·lular, (Coroneo *et al.*, 1991; Lepple-Wienhues *et al.*, 1994).

També s'han estudiat els efectes de diferents drogues sobre el potencial de membrana de les cèl·lules trabeculars i s'ha descrit que responen a acetilcolina amb una despolarització sostinguda seguida d'una hiperpolarització transitòria. La despolarització és bloquejada per atropina. Aquesta resposta és característica de receptors muscarínics associats a fosfolipasa-C. L'activació d'aquests receptors provoca una sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  dels dipòsits intracel·lulars, que al mateix temps activa canals de  $\text{K}^+$  dependents de calci, els quals serien responsables de la hiperpolarització (Lepple-Wienhues *et al.*, 1994). En el mateix estudi es va caracteritzar també la resposta a endotel·lina-1 que produïa una despolarització ràpida, indicant la presència de receptors d'endotel·lina-1 a les cèl·lules trabeculars humanes, a l'igual que a les bovines on havien estat descrits prèviament (Lepple-Wienhues *et al.*, 1991b).

Un altre dels mètodes utilitzats per estudiar la contractilitat de les cèl·lules trabeculars és la mesura directa de la seva capacitat contràctil en tires de teixit trabecular (Lepple-Wienhues *et al.*, 1991a; Lepple-Wienhues *et al.*, 1991b). Les tires de teixit trabecular boví s'extreien de la regió del trabècul adjacent al plexe aquós (estructura similar al canal d'Schlemm en bovins), es muntaven en una cambra de perfusió i es connectaven a un transductor de força/longitud que mesurava les contraccions isomètriques del teixit. En aquestes condicions s'han estudiat els efectes de diferents substàncies sobre la contracció del teixit trabecular.

L'elevació de la concentració extracel·lular de  $\text{K}^+$  és un mètode que s'utilitza habitualment per produir una contracció en la musculatura llisa. A les tires de teixit trabecular boví la despolarització causada per l'alt  $\text{K}^+$  extracel·lular condueix a una contracció bifàsica del teixit (Lepple-Wienhues *et al.*, 1991a).

Agonistes muscarínics com acetilcolina, pilocarpina, aceclidina i carbacol induïen contraccions del teixit trabecular dosi-dependents confirmant així la presència de receptors muscarínics al trabècul boví (WoldeMussie *et al.*, 1990; Lepple-Wienhues *et al.*, 1991a; Lepple-Wienhues *et al.*, 1991b).

Una altra de les substàncies que té capacitat de contraure les tires de teixit trabecular és l'endotel·lina-1, on evoca una contracció que és dosi-dependent (Lepple-Wienhues *et al.*, 1991b). L'endotel·lina-1 és una substància que es creu involucrada en l'homeostasi de l'humor aquós i que podria ser un factor contributiu a la patologia del glaucoma (Yorio *et al.*, 2002). Mitjançant tècniques d'immunocitoquímica s'ha demostrat la presència d'endotel·lina en diversos teixits oculars (Yorio *et al.*, 2002). També s'ha detectat immunoreactivitat similar a endotel·lina (endothelin-like) en

humor aquós boví i humà, trobant-se concentracions superiors en l'humor aquós que en el plasma (Lepple-Wienhues *et al.*, 1992). L'efecte de l'endotel·lina-1 sobre la contracció de la xarxa trabecular i sobre la contracció del múscul ciliar (Lepple-Wienhues *et al.*, 1991b) s'han relacionat amb la capacitat de l'endotel·lina-1 de disminuir la facilitat d'evacuació (Erickson-Lamy *et al.*, 1991; Wiederholt *et al.*, 1995).

També s'ha estudiat l'efecte relaxant de l'òxid nítric (NO) sobre tires de teixit trabecular tractades prèviament amb endotel·lina-1 o carbacol, agents que provoquen una contracció del trabècul (Wiederholt *et al.*, 1994). Tant l'anàleg permeable del GMPc, 8-Br-GMPc, com els agents donadors de NO, SNP i SNAP, van relaxar les tires de teixit trabecular pretractades amb endotel·lina-1 o carbacol. També s'ha descrit relaxació del teixit trabecular en resposta a prostaglandines (Krauss *et al.*, 1997).

En cultius cel·lulars primaris de cèl·lules trabeculars bovines també s'han descrit canvis en la morfologia cel·lular en resposta a bradikinina, que podrien estar mitjançats per la contracció d'aquestes mateixes cèl·lules (Llobet *et al.*, 1999).

D'altra banda s'ha estudiat que les substàncies que contrauen les tires de teixit trabecular disminueixen l'evacuació de l'humor aquós (quan es mesura la facilitat d'evacuació mitjançant perfusió de segments anteriors), suposadament incrementant la resistència de la via d'evacuació (Wiederholt *et al.*, 1995). Pel contrari la relaxació del trabècul podria incrementar l'evacuació disminuint la resistència de la via. Malgrat tot s'ha descrit que algunes substàncies, com per exemple la pilocarpina, causen una contracció en el trabècul, però augmenten la facilitat d'evacuació, efecte que seria mediat en part per la contracció del múscul ciliar (Kaufman *et al.*, 1984). Tenint en compte aquestes evidències, s'ha postulat una teoria en la que es parla d'antagonisme funcional entre la xarxa trabecular i el múscul ciliar. La contracció de la xarxa trabecular provocaria una disminució dels espais intercel·lulars augmentant la rigidesa de la via d'evacuació i la contracció del múscul ciliar els podria augmentar degut a la tracció que efectua sobre el trabècul (Wiederholt, 1998b, a).

### 1.4.3 Regulació del volum cel·lular

S'ha proposat que les cèl·lules trabeculars regularien el pas de l'humor aquós a través de la xarxa mitjançant canvis en el volum cel·lular. Estudis previs del nostre grup demostren que quan es perfundeixen els segments anteriors bovins amb solucions hipoosmòtiques disminueix la facilitat d'evacuació i, alternativament, si s'utilitzen solucions hiperosmòtiques la facilitat augmenta (Gual *et al.*, 1997). Aquests resultats indiquen que els canvis de volum de les cèl·lules trabeculars serien responsables de les variacions en la resistència del fluxe d'evacuació. De fet, anteriorment ja s'havia descrit una disminució de volum de les cèl·lules trabeculars humanes en cultiu després del tractament amb una solució hipertònica (O'Donnell *et al.*, 1995). En aquest mateix treball es demostra l'existència d'un cotransportador Na-K-Cl a les cèl·lules trabeculars humanes, sensible a disminucions del volum cel·lular, que causaria una entrada de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> acompanyats d'aigua per restaurar el volum intracel·lular, fenomen conegut en altres tipus cel·lulars (augment regulador del volum o *regulatory volume increase*) (Okada *et al.*, 2001). Aquest augment de volum compensatori és bloquejat pel diurètic bumetanida que actua inhibint el cotransportador. En aquest sentit, Al-Aswad i col·laboradors van descriure que la bumetanida incrementava la facilitat d'evacuació quan es perfundia en segments anteriors bovins i humans (Al-Aswad *et al.*, 1999). Pel contrari, altres autors han descrit una manca d'efecte de la bumetanida sobre la facilitat d'evacuació en primats i sobre la pressió intraocular en ulls humans en perfusió (Gabelt *et al.*, 1997). Un altre estudi mostra que les cèl·lules trabeculars provinents de pacients amb glaucoma d'angle obert tenen un volum intracel·lular més gran que les cèl·lules normals (Putney *et al.*, 1999), fet que explicaria la disminució de la facilitat d'evacuació a través de la xarxa trabecular observada en aquest tipus de glaucoma. En el mateix estudi es va trobar que l'activitat del cotransportador Na-K-Cl estava disminuïda a les cèl·lules glaucomatoses indicant que els mecanismes reguladors del volum cel·lular estarien alterats i podrien contribuir a la fisiopatologia del glaucoma.

El paper dels canals iònics en els processos de regulació del volum de les cèl·lules trabeculars ha estat estudiat recentment (Mitchell *et al.*, 2002). En aquest treball es descriu la presència d'un mecanisme de regulació de volum a les cèl·lules trabeculars humanes, regulat almenys parcialment per canals de Cl<sup>-</sup> i transportadors iònics, com el simport K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> i l'antiport Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Monitoritzant el volum cel·lular amb el colorant fluorescent calceïna, es va observar que els bloquejants de canals de K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> i de transportadors iònics, bloquegen la disminució de volum compensatòria a l'augment



de volum que experimenten les cèl·lules sotmeses a un xoc hipotònic. Els experiments electrofisiològics de *patch-clamp* demostren l'activació de canals de Cl<sup>-</sup> sensibles a augment de volum cel·lular ( $Cl_{swell}$ ).

Altres autors també han descrit que davant d'un xoc hipotònic les cèl·lules trabeculars posen en marxa mecanismes de regulació del volum que consisteixen en activació de canals de Cl<sup>-</sup> activats per un augment de volum cel·lular, mecanisme que estaria limitat per la sortida de K<sup>+</sup> a través de canals selectius (Srinivas *et al.*, 2004). Mitjançant tècniques moleculars, els autors descriuen dos canals de la família de canals de Cl<sup>-</sup> voltatge-dependents CLCN, CIC-5 i CIC-2, havent estat aquest últim implicat en regulació de volum cel·lular en altres tipus cel·lulars (Duan *et al.*, 1997; Jentsch *et al.*, 1999).

L'increment d'AMPc, que s'ha associat amb un augment de la facilitat d'evacuació, produeix una disminució del volum de les cèl·lules trabeculars tant en condicions isotòniques com hipotòniques (Srinivas *et al.*, 2004), fet que es relacionaria amb l'augment de la facilitat d'evacuació descrit en segments anteriors bovins en perfusió (Gilabert *et al.*, 1997).

També s'ha descrit que l'adenosina i els agonistes dels seus receptors produeixen una reducció en el volum de les cèl·lules trabeculars i activen corrents de sortida de K<sup>+</sup> probablement mitjançats per canals de K<sup>+</sup> d'alta conductància dependents de Ca<sup>2+</sup> (BK<sub>Ca</sub>) (Fleischhauer *et al.*, 2003).

Un estudi recent del nostre grup corrobora l'existència de canals de K<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> que s'activen davant d'augment del volum cel·lular i estudia l'influència dels processos de regulació de volum sobre la facilitat d'evacuació: la perfusió de bloquejants d'aquests canals en segments anteriors bovins impedeix la recuperació de la facilitat d'evacuació després d'un xoc hipotònic (Soto *et al.*, 2004), implicant directament la participació d'aquests canals en la regulació de la facilitat d'evacuació.

#### **1.4.4 Canals identificats a les cèl·lules de la xarxa trabecular**

D'acord amb el fins ara presentat, la xarxa trabecular regula el pas de l'humor aquós a través d'ella mitjançant diferents mecanismes, molts dels quals requereixen la participació de canals iònics. La resposta contràctil de la xarxa trabecular està associada a canvis en el potencial de membrana de les cèl·lules, mentre que els canvis de volum cel·lular produeixen l'activació de diferents canals per

restablir el volum inicial. A les cèl·lules trabeculars fonamentalment s'han identificat canals de  $K^+$ ,  $Cl^-$  i canals d'aigua. A més, hi ha evidències indirectes de canals de  $Na^+$  i de  $Ca^{2+}$ , encara que no han estat caracteritzats ni electrofisiològicament ni molecularment.

Els canals de  $K^+$  són els que juguen un paper més important en la regulació del potencial de membrana i es poden classificar de manera molt general com a rectificadors d'entrada i rectificadors de sortida. A les cèl·lules trabeculars s'han identificat canals de  $K^+$  d'aquests dos tipus. Els *rectificadors d'entrada* principalment condueixen  $K^+$  cap a l'interior de la cèl·lula a potencials hiperpolaritzants, més negatius que el potencial d'equilibri del  $K^+$ , i tenen dues funcions principals: 1) restaurar el potencial de membrana en cèl·lules hiperpolaritzades i 2) mitjançar el transport de  $K^+$  a través de membranes (Reimann & Ashcroft, 1999). La família dels canals de potassi amb rectificació d'entrada (Kir) està present a diferents tipus cel·lulars i controla l'excitabilitat en cèl·lules cardíques i neuronals (Reimann & Ashcroft, 1999). El nostre laboratori ha caracteritzat un canal d'aquesta família corresponent al tipus Kir2.1 que s'expressa en un 50% de les cèl·lules trabeculars humanes i bovines en cultiu (Llobet *et al.*, 2001). A les cèl·lules trabeculars, l'aplicació de cations extracel·lulars ( $Ba^{2+}$ ,  $Cs^+$  i  $Ca^{2+}$ ) condueix a un bloqueig de l'activitat del canal, a l'igual que l'aplicació d'un anàleg d'AMPC, suggerint un possible rol del Kir2.1 en la modulació de la facilitat d'evacuació (Llobet *et al.*, 2001).

El canal de  $K^+$  d'alta conductància dependent de calci ( $BK_{Ca}$  o Maxi- $K^+$ ) es troba dins del grup dels *rectificadors de sortida*, conduïnt  $K^+$  cap a l'exterior de la cèl·lula en resposta a una despolarització de la membrana. Stumpff i col·laboradors van demostrar la presència d'aquest canal a les cèl·lules de la xarxa trabecular bovina (Stumpff *et al.*, 1997). Les característiques i els moduladors d'aquest canal es descriuen en profunditat a la secció següent.

Com s'ha comentat anteriorment, les cèl·lules trabeculars presenten canals de  $Cl^-$  voltatge-dependents sensibles als canvis de volum cel·lular ( $Cl_{swell}$ ) que han estat caracteritzats mitjançant electrofisiologia (Mitchell *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2004; Srinivas *et al.*, 2004). D'altra banda, s'ha caracteritzat a nivell molecular l'expressió dels canals de  $Cl^-$  voltatge-dependents corresponents a la família CLCN en teixit trabecular humà (Comes *et al.*, 2004). L'expressió dels diferents canals es veia modificada per factors com un xoc hipotònic, elevada pressió i dexametasona.

També s'han descrit la presència de corrents d'entrada selectius pel  $Na^+$  (Rich *et al.*, 1999) i corrents de  $Ca^{2+}$  sensibles a dihidropiridines (Steinhausen *et al.*,

2000) a les cèl·lules trabeculars, encara que no s'ha caracteritzat cap dels dos tipus de corrents a nivell de canal únic.

Un altre tipus de canal que s'ha identificat a les cèl·lules trabeculars és l'aquaporina-1 que pertany a la família dels canals d'aigua aquaporina. Es tracta de proteïnes transmembrana que formen un porus a través del qual l'aigua flueix passivament a favor de gradient osmòtic o hidrostàtic. Donat que la seva presència s'ha posat de manifest en teixits secretors de fluids (secreció/absorció), s'ha postulat que aquest canal participaria en fenòmens de regulació de volum cel·lular, secreció de diferents substàncies, així com en la formació d'humor aquós (Stamer *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002). La del·lecció dels gens de l'aquaporina-1 i -4 (ratolí *knock-out*), produeix una reducció de la producció d'humor aquós i una disminució de la IOP, malgrat que no es modifica l'evacuació (Zhang *et al.*, 2002).

### 1.5 Canal de $K^+$ d'alta conductància dependent de $Ca^{2+}$ ( $BK_{Ca}$ )

Els canals de  $K^+$  activats per calci ( $K_{Ca}$ ) conformen una família de canals de  $K^+$  voltatge-dependents, en els quals la seva probabilitat d'obertura ( $P_o$ ) es veu incrementada per l'augment del calci intracel·lular. Es poden dividir en tres subfamílies: els canals de  $K^+$  de baixa conductància (SK), conductància intermitja (IK) i alta conductància (BK) (Vergara *et al.*, 1998).

D'entre ells, els canals  $BK_{Ca}$  són els que estan presents en un major nombre de teixits en mamífers, essent molt abundants a neurones i a múscul llis (Kaczarowski *et al.*, 1996; Beech, 1997; Vergara *et al.*, 1998; Gribkoff *et al.*, 2001). Depenent del tipus cel·lular aquests canals desenvolupen diferents funcions: control de l'excitabilitat neuronal repolaritzant la membrana i limitant l'entrada de calci; alliberament de neurotransmissors o control del tò contràctil en múscul llis (McManus, 1991; Gribkoff *et al.*, 2001; Orio *et al.*, 2002).

Els canals  $BK_{Ca}$  funcionals formen un complex de dues subunitats: una subunitat  $\alpha$  amb set dominis transmembrana codificada per un sol gen (*KCNMA1* o *Slo1*) que forma tetràmers, a la qual es poden unir una o més subunitats  $\beta_1$  que consten de dos segments transmembrana. La subunitat  $\beta_1$  és la responsable d'augmentar la sensibilitat de la subunitat  $\alpha$  al voltatge i al  $Ca^{2+}$ , i també és necessària per l'activació del canal davant agonistes com el  $\beta$ -estradiol (Vergara *et al.*, 1998; Valverde *et al.*, 1999; Miller, 2000; Gribkoff *et al.*, 2001; Orio *et al.*, 2002).

El canal  $BK_{Ca}$  és un canal de  $K^+$  voltatge-dependent que s'activa en resposta a una despolarització de la membrana. La seva probabilitat d'obertura es veu modulada per l'augment en la concentració de calci intracel·lular ( $[Ca^{2+}]_i$ ). L'activació del  $BK_{Ca}$  promou la sortida de  $K^+$  cap a l'exterior de la cèl·lula hiperpolaritzant així la membrana. L'augment de  $[Ca^{2+}]_i$  pot tenir diferents orígens. En el múscul llis, l'entrada de  $Ca^{2+}$  per canals de calci voltatge-dependents (VDCC) és la que provoca la despolarització de la membrana i l'activació del  $BK_{Ca}$ . En molts teixits, els canals VDCC i  $BK_{Ca}$  es troben colocalitzats (Orio *et al.*, 2002). En el múscul llis vascular, en canvi, l'augment de  $[Ca^{2+}]_i$  es produeix per l'alliberament de  $Ca^{2+}$  des del reticle sarcoplasmàtic a través dels receptors de rianodina. Aquests receptors i els canals  $BK_{Ca}$  també es troben molt propers entre ells a la membrana plasmàtica. Aquesta associació és la base del paper atribuït al  $BK_{Ca}$  en el control de la contracció del múscul llis

vascular (Orio *et al.*, 2002). Segons aquestes observacions, el BK<sub>Ca</sub> estaria modulats per diferents senyals de calci dependent del tipus cel·lular.

El canal BK<sub>Ca</sub> ha estat identificat a les cèl·lules de la xarxa trabecular on s'ha postulat que regularia la relaxació d'aquest teixit (Stumpff *et al.*, 1997).

### 1.5.1 Característiques electrofisiològiques del BK<sub>Ca</sub>

Mitjançant la tècnica del *patch-clamp* ha estat possible caracteritzar a nivell de canal únic els corrents de K<sup>+</sup> i caracteritzar així electrofisiològicament el BK<sub>Ca</sub> (Singer & Walsh, 1987). En aquest treball es va identificar un canal altament selectiu pel K<sup>+</sup>, la cinètica del qual es veia modificada pel voltatge i per la concentració de calci intracel·lular.

L'alta selectivitat pel K<sup>+</sup> s'ha demostrat amb experiments a nivell de canal únic en la configuració *inside-out*. Modificant la concentració de K<sup>+</sup> a la cara citoplasmàtica del canal mitjançant solucions amb diferents concentracions de KCl, es pot calcular el potencial de reversió o potencial d'equilibri del K<sup>+</sup> (on el fluxe net d'aquest ió és zero). Quan les concentracions de K<sup>+</sup> són iguals a ambdós costats de la membrana (K<sup>+</sup> simètric), el potencial de reversió és pròxim a zero, exclouent la participació d'altres ions com el Na<sup>+</sup> o el Cl<sup>-</sup>. La conductància unitària en aquestes condicions és lineal i correspon a un canal d'alta conductància (>150 pS) (McManus, 1991). Quan les concentracions són superiors a la cara citoplasmàtica del *patch*, condicions que simulen les fisiològiques, el canal presenta una rectificació de sortida que segueix l'equació de Goldman-Hodging-Katz.

La probabilitat d'obertura del canal augmenta en resposta a potencials despolaritzants quan es manté la concentració de calci constant a la cara intracel·lular del *patch*. La sensibilitat del canal al calci es demostra també amb experiments *inside-out*, on la cara citoplasmàtica del canal està en contacte amb la solució del bany. Mantenint constant el potencial de membrana i la concentració de calci del bany, s'observa l'activació del BK<sub>Ca</sub>, activitat que desapareix quan s'elimina el calci de la solució del bany.

L'activació d'aquests canals produeix corrents de sortida de K<sup>+</sup> al despolaritzar la membrana cel·lular, que s'activen de forma exponencial fins a assolir un *plateau*. A més, els corrents mediats pel BK<sub>Ca</sub> no s'inactiven mentre es manté el potencial despolaritzant (Stumpff *et al.*, 1997; Gasull *et al.*, 2001).

## 1.5.2 Moduladors del BK<sub>Ca</sub>

A part del voltatge de la membrana i la concentració intracel·lular de calci, el BK<sub>Ca</sub> està modulats per molècules de naturalesa diferent com segons missatgers o toxines, i també per gran varietat de mecanismes moleculars, tals com augment de tensió de la membrana o hipòxia. En aquesta secció es desenvoluparan les característiques d'aquests moduladors.

### 1.5.2.1 Activadors i bloquejants del BK<sub>Ca</sub>

Un dels activadors estudiats ha estat l'òxid nítric (NO) (Beech, 1997; Gasull *et al.*, 2001; Weiger *et al.*, 2002). L'òxid nítric és un gas sintetitzat mitjançant l'enzim òxid nítric sintasa (NOS) a partir de l'aminoàcid L-arginina + O<sub>2</sub>, i que actua com a segon missatger en una àmplia varietat de processos fisiològics i patològics (Hanafy *et al.*, 2001). L'NO pot activar el canal BK<sub>Ca</sub> de manera directa mitjançant S-nitrosilació de la proteïna del canal o indirectament promovent la formació de GMPc, el qual activa una proteinquinasa dependent de GMPc (PKG) que fosforila el canal, augmentant així la seva probabilitat d'obertura (Nelson & Quayle, 1995). En el cas de les cèl·lules trabeculars, també s'ha descrit l'activació del BK<sub>Ca</sub> pel GMPc (Stumpff *et al.*, 1997).

Un altre dels segons missatgers implicats en la modulació del BK<sub>Ca</sub> és l'AMPc, que actua activant una proteinquinasa dependent d'AMPc (PKA) que fosforilarà el canal i augmentarà la seva activitat (Beech, 1997). Tant la PKA com la PKG afecten la cinètica del canal, però no la seva conductància, desplaçant la corba d'activació cap a voltatges més negatius. Ambdós quinases disminueixen la constant d'obertura i augmenten la constant de tancament del BK<sub>Ca</sub> (Schubert & Nelson, 2001).

Inicialment dissenyades com a agents farmacològics, algunes substàncies de síntesi com l'NS-1619 obren el canal, havent-se demostrat la seva activitat en diferents tipus cel·lulars i també en canals BK<sub>Ca</sub> clonats. Un altre compost, l'NS-004, relacionat estructuralment amb l'anterior, també ha demostrat obrir canals BK<sub>Ca</sub> i bloquejar canals de calci. Malgrat haver demostrat eficàcia preclínica en alguns casos, la majoria d'ells s'utilitzen com a eines d'experimentació en l'estudi de la fisiologia dels canals BK<sub>Ca</sub> (Gribkoff *et al.*, 2001).

L'activitat del BK<sub>Ca</sub> es pot bloquejar mitjançant diferents compostos com el tetraetilamoni (TEA) que és un bloquejant inespecífic i també per charibdotoxina i iberiotoxina, bloquejants específics obtinguts de toxines d'escorpí (Gribkoff *et al.*, 2001).

### 1.5.2.2 Augment de tensió de la membrana (*stretch*)

S'ha demostrat l'existència de canals iònics, entre ells canals de  $K^+$ , sensibles a canvis de tensió de la membrana o canals mecanosensibles. Aquests tipus de canals responen a la tensió de la membrana mitjançant canvis en la seva probabilitat d'obertura. Existeixen dos tipus de canals mecanosensibles depenent de si s'activen o s'inactiven per *stretch*, encara que aquests últims són poc freqüents. En els canals activats per *stretch*, els estímuls mecànics incrementen la probabilitat d'obertura, sense produir canvis significatius en la conducència unitària o en la selectivitat iònica (Sackin, 1995).

L'activació dels canals iònics per l'*stretch* mecànic és un fenomen lligat a la membrana, tal i com s'ha demostrat activant canals mecanosensibles en *patches* de membrana escindits on queda descartada la participació de missatgers citosòlics o l'alliberament de calci des dels dipòsits intracel·lulars (Sackin, 1995). En general es podrien considerar dos mecanismes per l'activació dels canals mecanosensibles: 1) la deformació física de la membrana és responsable de l'obertura del canal i 2) la deformació mecànica produeix l'alliberament de mediadors que activaran el canal. En aquest sentit, s'ha descrit l'activació de canals mecanosensibles per àcids grassos (Kirber *et al.*, 1992) i s'ha hipotetitzat que la deformació de la membrana activaria fosfolipases associades a ella, produint l'alliberament d'àcids grassos que activarien directament el canal (Sackin, 1995). D'altra banda i d'acord amb el primer dels mecanismes esmentats, s'ha descrit la participació del citoesquelet cel·lular en l'activació de canals mecanosensibles, tal i com s'ha demostrat en experiments on la citocalasina, que provoca una disrupció dels fil·laments d'actina, activa canals mecanosensibles (Sackin, 1995; Mienville *et al.*, 1996; Hamill & Martinac, 2001). A part, el citoesquelet d'actina està lligat a la matriu extracel·lular mitjançant proteïnes transmembrana (integrines) que transmeten les forces mecàniques a través de la membrana. La matriu extracel·lular filtra les forces que arriben a la cèl·lula i mitjançant les integrines les transmet al citoesquelet el qual interaccionaria directa o indirectament amb proteïnes de membrana com els canals iònics (Hamill & Martinac, 2001; Katsumi *et al.*, 2004).

En concret, les cèl·lules de la xarxa trabecular sotmeses fisiològicament a canvis en la IOP, responen a l'*stretch* de la membrana mitjançant canvis morfològics en el citoesquelet d'actina (Tumminia *et al.*, 1998) i també s'ha demostrat que la deformació mecànica d'aquestes cèl·lules indueix un augment en l'activitat de certes metaloproteinases, enzims que degraden la matriu extracel·lular (Bradley *et al.*, 2001).

Com s'ha comentat anteriorment, la sensibilitat a l'*stretch* mecànic s'ha demostrat mitjançant la tècnica del *patch-clamp* en *patches* de membrana aïllats, generalment aplicant-hi una pressió negativa (succió). Per descartar que l'activació dels canals mecanosensibles sigui un artefacte produït per la tècnica com ha descrit algun autor (Morris & Horn, 1991), altres estudis han descrit l'activació d'aquests canals mitjançant diferents manipulacions demostrant que els canals mecanosensibles medien els corrents totals de la cèl·lula. Les solucions hipotòniques, que produeixen un inflament de la cèl·lula amb el corresponent canvi de tensió en la membrana, activen canals mecanosensibles en diferents tipus cel·lulars (Christensen & Hoffmann, 1992; Sackin, 1995; Vanoye & Reuss, 1999).

El canal BK<sub>Ca</sub> ha mostrat propietats mecanosensibles en diferents teixits com múscul esquelètic (Mallouk & Allard, 2000), osteoblasts (Davidson, 1993; Allard *et al.*, 2000), múscul llis (Kirber *et al.*, 1992; Dopico *et al.*, 1994) i cèl·lules neuroepitel·lials (Mienville *et al.*, 1996). L'activació del BK<sub>Ca</sub> per l'*stretch* mecànic no afecta a la conductància unitària (Macdonald, 1997), ni a la sensibilitat del canal pel voltatge i el calci intracel·lular (Mallouk & Allard, 2000).

### 1.5.2.3 Hipòxia

Les respostes agudes a la hipòxia són mediades per canals iònics sensibles als canvis en la pressió parcial d'oxigen (PO<sub>2</sub>) (Lopez-Barneo *et al.*, 2001). Aquestes respostes poden consistir en una activació o una disminució de les conductàncies sensibles a la hipòxia, fenomen que s'observa en el mateix canal expressat en diferents teixits. El canal BK<sub>Ca</sub> ha demostrat ser sensible a la hipòxia disminuint la seva activitat en cèl·lules tipus I del cos carotidi de rata (Peers, 1990; Gelband & Hume, 1995; Wyatt & Peers, 1995; Riesco-Fagundo *et al.*, 2001), en neurones neocorticals de ratolí (Liu *et al.*, 1999), en cèl·lules pulmonars ovines i de rata (Olschewski *et al.*, 2002a; Olschewski *et al.*, 2002b) i també en sistemes heteròlegs (Lewis *et al.*, 2002). Pel contrari, l'activitat del BK<sub>Ca</sub> es va veure augmentada en miòcits arterials de cervell de gat (Gebremedhin *et al.*, 1994).

En els estudis on la hipòxia inhibia l'activitat del canal, la conductància unitària no variava (Wyatt & Peers, 1995; Liu *et al.*, 1999) o experimentava una lleugera reducció (Lewis *et al.*, 2002). Pel que fa a la sensibilitat al voltatge, la inhibició del canal BK<sub>Ca</sub> és voltatge dependent: la hipòxia disminueix la probabilitat d'obertura del canal desplaçant la corba d'activació pel voltatge cap a potencials més despolaritzants, fent que la inhibició per la hipòxia sigui més important a voltatges



negatius o poc despolaritzants (més propers al potencial de membrana) (Liu *et al.*, 1999; Riesco-Fagundo *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2002).

La dependència del calci, característica del BK<sub>Ca</sub>, també es veu afectada per la hipòxia. L'efecte inhibitori de la hipòxia té lloc a través d'una disminució en la sensibilitat al calci, és a dir per una mateixa concentració de calci intracel·lular la probabilitat d'obertura és menor. Això és vàlid quan les concentracions de calci són properes a les fisiològiques (300 nM - 1 µM). Si les concentracions són elevades (100 µM), l'efecte activador del calci predomina sobre la inhibició per la hipòxia i no s'observa inhibició de l'activitat del canal (Riesco-Fagundo *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2002).

El mecanisme mitjançant el qual la hipòxia modula el canal BK<sub>Ca</sub> és encara desconegut. Una de les característiques observades en la modulació del BK<sub>Ca</sub> per la hipòxia és que sembla independent de factors citosòlics, doncs s'ha observat la inhibició del canal per la hipòxia a nivell de canal únic (registres *inside-out* on la maquinària intracel·lular no està present) (Ganfornina & López-Barneo, 1991; Jiang & Haddad, 1994; Wyatt & Peers, 1995; Riesco-Fagundo *et al.*, 2001). Pel contrari, altres autors han observat la inhibició del BK<sub>Ca</sub> en *cell-attached patches* però no en la configuració *inside-out*, atribuïnt-ho a la necessitat de factors citosòlics en la mediació d'aquest efecte (Liu *et al.*, 1999). Per explorar aquesta possibilitat, en aquest darrer treball s'estudia l'efecte de la disminució de pH intracel·lular i de diferents proteïncinases (o activadors d'elles) sobre el BK<sub>Ca</sub>, donat que la hipòxia pot produir una acidificació intracel·lular i activar proteïncinases. Tant l'acidificació intracel·lular com la PKA i l'anàleg d'AMPc, db-AMPc, inhibien l'activitat del BK<sub>Ca</sub> a les cèl·lules neocorticals de ratolí. L'activador de la PKC, PMA, no va demostrar cap efecte sobre el BK<sub>Ca</sub>.

Un dels mecanismes proposats per la regulació dels canals de K<sup>+</sup> sensibles a canvis en la PO<sub>2</sub> és la modulació redox, degut a que aquests canals tenen residus de cisteïna i metionina susceptibles de ser oxidats o reduïts (Lee *et al.*, 1994; Weir & Archer, 1995; Peers, 1997). Pel que fa al BK<sub>Ca</sub>, els estudis de Riesco-Fagundo i col·laboradors, mostren que els agents reductors, que haurien de mimetitzar l'efecte de la hipòxia, pel contrari incrementen l'activitat d'aquest canal (Riesco-Fagundo *et al.*, 2001), tal i com s'havia descrit amb anterioritat en sistemes heteròlegs (DiChiara & Reinhart, 1997).

Una hipòtesi alternativa seria la modulació del canal per un sensor hemoproteic associat a la membrana, capaç d'unir O<sub>2</sub> i CO (Riesco-Fagundo *et al.*, 2001). S'ha demostrat que la inhibició dels corrents mediats pel BK<sub>Ca</sub> mitjançant l'addició d'una solució hipòxica, es pot revertir afegint CO a la solució hipòxica. Aquest efecte també es va demostrar a nivell de canal únic (Riesco-Fagundo *et al.*, 2001). Aquest mecanisme ha estat descrit també en canals voltatge-dependents (Kv) (Perez-Garcia *et al.*, 1999).

Finalment, Liu i col·laboradors van observar la inhibició del BK<sub>Ca</sub> en *cell-attached patches* però no en la configuració *inside-out*, atribuïnt-ho a la necessitat de factors citosòlics en la mediació d'aquest efecte (Liu *et al.*, 1999).

### 1.6 Hipòxia

L'oxigen ( $O_2$ ) és un element fonamental per la supervivència de la gran majoria dels organismes vius. La capacitat de detectar els canvis en la  $PO_2$  és de gran importància per assegurar el correcte subministrament d' $O_2$  als teixits i evitar el dany cel·lular derivat de la manca d' $O_2$ . Tradicionalment es considerava que els únics detectors d' $O_2$  en el cos humà eren els quimiorceptors del cos carotídi, però en realitat tots els teixits de l'organisme són capaços de detectar i respondre a disminucions en la  $PO_2$ . Existeixen una sèrie de mecanismes cel·lulars d'adaptació a la hipòxia mitjançant els quals les cèl·lules contraresten els efectes deleteris de la manca d' $O_2$ .

Les respostes a la hipòxia poden ser agudes (de segons a minuts), generalment mitjançades per canals iònics sensibles a l' $O_2$ , tal i com ja s'ha comentat en la secció anterior. Entre les respostes agudes cal destacar la sensibilitat a l' $O_2$  pels quimiorceptors del cos carotídi. Aquestes cèl·lules són excitables i tenen a la seva membrana canals de  $K^+$  sensibles a l' $O_2$  que seran inhibits per la hipòxia. Aquesta disminució en la conductància pel  $K^+$  produirà una despolarització amb la corresponent entrada de  $Ca^{2+}$  i secreció de neurotransmissors cap a les vies sensorials aferents que estimularan el centre respiratori a nivell central (Lopez-Barneo *et al.*, 2001).

La hipòxia també indueix respostes agudes en el tò arterial, com vasoconstricció pulmonar i vasodilatació sistèmica entre les més habituals (Lopez-Barneo *et al.*, 2001; Michiels, 2004) i també modula la excitabilitat neuronal induïnt una hiperpolarització immediata mitjançant l'activació de canals  $K_{Ca}$  en resposta a l'alliberament de neurotransmissors excitatoris provocat per la isquèmia cerebral (Lopez-Barneo *et al.*, 2001).

La hipòxia crònica indueix canvis en els teixits que impliquen la transcripció de determinats gens. Aquesta resposta sobre la transcripció està mediada per HIF-1, factor de transcripció induït per hipòxia (Lopez-Barneo *et al.*, 2001; Michiels, 2004). Algunes de les adaptacions a la hipòxia a llarg termini impliquen canvis en el metabolisme de la glucosa, eritropoesi, angiogènesi, hipertròfia cardíaca o canvis funcionals en el cos carotídi. L'expressió de canals iònics també pot veure's modificada en condicions d'hipòxia crònica (Hartness *et al.*, 2003; Peers & Kemp, 2004).

En el globus ocular els efectes de la hipòxia que s'han estudiat amb més profunditat són els derivats de la hipòxia/isquèmia de la retina com a conseqüència de l'excés de pressió intraocular en el glaucoma. La hipòxia s'associa amb degeneració de les cèl·lules ganglionars de la retina i pèrdues del camp visual (Weinreb & Khaw, 2004).

D'altra banda a nivell de la cambra anterior, els valors de  $PO_2$  a l'humor aquós són més baixos ( $\approx 55$  mmHg) que a la sang o altres teixits amb major oxigenació ( $\approx 95$  mmHg) (Berman, 1991; Helbig *et al.*, 1993). En aquest darrer treball, es mesuren els valors de  $PO_2$  al segment anterior d'ulls humans i es conclou que l'oxigen arriba a l'humor aquós principalment a través dels capil·lars de l'iris, doncs en aquesta zona la  $PO_2$  és superior a la registrada davant del cristal·lí. L'aplicació tòpica de fàrmacs vasoconstrictors com la fenilefrina causa hipòxia a la cambra anterior, majoritàriament deguda a la reducció en el fluxe sanguini iridial (Helbig *et al.*, 1993). La utilització de fàrmacs vasoconstrictors constitueix una de les causes d'hipòxia a la cambra anterior, junt amb la utilització de lents de contacte (Stefansson *et al.*, 1983; McLaren *et al.*, 1998) i diferents patologies com el síndrome isquèmic ocular (Malhotra & Gregory-Evans, 2000) i el síndrome pseudoexfoliatiu (Conway *et al.*, 2004). En el síndrome pseudoexfoliatiu hi ha un defecte en el metabolisme de la matriu extracel·lular, que resulta amb una acumulació anòmala de substàncies fibroses de la matriu en tots els teixits del segment anterior ocular. Entre d'altres efectes, provoca canvis en la vasculatura de l'iris que fan que l'aport d' $O_2$  a la cambra anterior sigui insuficient (Helbig *et al.*, 1994; Conway *et al.*, 2004). Aquest acúmulo de material extracel·lular pot bloquejar l'evacuació de l'humor aquós a través de la xarxa trabecular, produint un augment en la IOP i per tant un glaucoma secundari al síndrome pseudoexfoliatiu.

### 1.6.1 Efectes sobre el calci intracel·lular

Entre les diverses accions cel·lulars de la hipòxia, s'han descrit efectes sobre la concentració de calci intracel·lular ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Aquest fenomen s'ha observat en cèl·lules endotel·lials de diferent origen (Arnould *et al.*, 1992; Hu & Ziegelstein, 2000; Brown *et al.*, 2004) i també cèl·lules tipus I de cos carotidi (Jiang & Eyzaguirre, 2004). En les cèl·lules excitable (neurones, quimiorceptors del cos carotidi, miocardiòcits) la resposta a la hipòxia es caracteritza per una despolarització cel·lular que provoca l'entrada de  $Ca^{2+}$  a través de canals selectius per aquest ió (Jiang & Eyzaguirre, 2004). En les cèl·lules no excitable (p.e. cèl·lules endotel·lials) s'han descrit els efectes de la hipòxia sobre els nivells de calci basal i sobre la resposta a diferents agonistes que

incrementen la  $[Ca^{2+}]_i$ . L'aplicació d'hipòxia aguda (0-6h) produeix un augment de la  $[Ca^{2+}]_i$  en cèl·lules endotel·lials del cordó umbilical humà (Arnould *et al.*, 1992) i en cèl·lules endotel·lials de la barrera hematoencefàlica de bovins (Kimura *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2004). També s'ha observat que la hipòxia modifica la resposta de diferents agonistes sobre la  $[Ca^{2+}]_i$ . Per exemple, la taspigargina, que depleciona els dipòsits intracel·lulars de calci, provoca un increment de calci menor en condicions hipòxiques. L'entrada capacitativa de calci (per reomplir els dipòsits intracel·lulars) també es veu afectada en les cèl·lules tractades amb hipòxia essent més petita que en les condicions control (Kimura *et al.*, 2000). D'altra banda la resposta a l'ATP, que en condicions normòxiques provoca oscil·lacions del calci intracel·lular, es va veure modificada per la hipòxia disminuint la freqüència de les mateixes (Kimura *et al.*, 2000).

L'exposició prolongada a la hipòxia pot induir uns efectes diferents als comentats. L'aplicació de muscarina en cèl·lules de neuroblastoma crescudes en condicions hipòxiques provoca un increment de la  $[Ca^{2+}]_i$  superior a les cèl·lules control. Així mateix l'entrada capacitativa de calci està inhibida per la hipòxia (Smith *et al.*, 2001).

### **1.6.2 Efectes sobre el citoesquelet d'actina**

L'exposició a la hipòxia pot causar canvis en l'estructura de les cèl·lules endotel·lials que implica una reorganització en el citoesquelet d'actina. Kayyali i col·laboradors van determinar la distribució d'actina en cèl·lules d'endotel·li pulmonar normòxiques i hipòxiques. Mitjançant l'ús de tècniques immunocitoquímiques amb faloidina-rodamina, que s'uneix a l'actina filamentosa, van observar que aquesta passava de formar una estructura de teranyina en condicions normòxiques a formar fibres d'estrés després de l'exposició a la hipòxia. Les fibres d'estrés es feien més gruixudes i incrementaven en nombre amb el temps. A part de la reorganització del citoesquelet d'actina, també es va observar un augment general de l'actina filamentosa (Kayyali *et al.*, 2002). Altres autors han descrits canvis similars en el citoesquelet induïts per la hipòxia (Partridge, 1995). La reoxigenació cel·lular després d'un període hipòxia també provoca canvis en el citoesquelet, desapareixent les fibres d'estrés i observant-se un augment de l'actina filamentosa (polimerització dels monòmers d'actina) (Crawford *et al.*, 1996). Tot i amb aixó existeixen poques dades a la literatura dels efectes de la hipòxia sobre el citoesquelet d'actina.