

NUEVOS ASPECTOS EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL GLAUCOMA: MECANISMOS ACTIVOS DE LA RED TRABECULAR Y DEL CANAL DE SCHLEMM EN LA EVACUACIÓN DE HUMOR ACUOSO

Arcadi Gual y Xavier Gasull

Laboratori de Neurofisiologia i Biomembranes. Facultat de Medicina-Fundació CLÍNIC. Universitat de Barcelona. Avda. Diagonal 643. 08028 Barcelona.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido subvencionado en parte por el proyecto 94/1180 del FISs.

RESUMEN

La red trabecular y el Canal de Schlemm son estructuras determinantes de la dinámica de humor acuoso y por lo tanto de la presión intraocular. El tratamiento farmacológico del glaucoma incide tanto en la disminución de la producción de humor acuoso como en el aumento de su evacuación. Profundizar en el estudio de los mecanismos fisiológicos que regulan la evacuación del humor acuoso a través de las vías convencionales permitirá investigar y aplicar nuevos fármacos en el tratamiento del glaucoma. Se ha demostrado que el modelo de perfusión del segmento anterior ocular de ojo bovino in vitro permite estudiar de forma específica la actividad funcional de las estructuras relacionadas con la evacuación del humor acuoso. Diversos estudios han implicado el sistema nervioso simpático en la regulación de la evacuación del humor acuoso. Todavía hoy se desconoce el mecanismo de acción de algunos neurotransmisores y/o fármacos que modifiquen la evacuación del humor acuoso. Un ejemplo característico de éstos es la epinefrina (EPI) que aumenta la evacuación del humor acuoso. Los resultados del presente trabajo muestran como, efectivamente, la EPI incrementa la facilidad de evacuación (C). Para estudiar si el efecto de la epinefrina es mediado a través de receptores α o β se evaluó la acción de un α -agonista, la metoxamina (METX), al añadirlo al medio de perfusión. La METX indujo un aumento de la C mayor del que indujo la propia EPI. Además, como se ha postulado que el efecto de la EPI es mediado a través de prostaglandinas, se estudió la acción de la indometacina (como inhibidor de la ciclooxigenasa) sobre los efectos de la EPI y la METX sobre la C. La indometacina por si sola no modificó la C mientras que los efectos inducidos por EPI y METX se bloquearon en presencia de indometacina.

Asimismo, la fentolamina bloqueó tanto los efectos de EPI como de la METX. Finalmente se estudió la participación del AMPc como segundo mensajero en las estructuras celulares de evacuación del humor acuoso. Con este propósito se incrementó la concentración de AMPc intracelular con forskolina, dibutilil-AMPc o IBMX; todas estas drogas incrementaron la C. Los resultados presentados muestran, en su conjunto, la participación de los receptores α -adrenérgicos en la regulación de la evacuación del humor acuoso en la red trabecular y el Canal de Schlemm bovinos, y muestran que tanto el AMPc como las prostaglandinas participan como segundos o terceros mensajeros en este proceso.

ABSTRACT

The trabecular meshwork and Schlemm's canal are substantial elements in aqueous humor dynamics and therefore in the final intraocular pressure. Pharmacological treatment of glaucoma is focused both to reduce aqueous humor production (inflow) as well as to increase its elimination (outflow). To study in depth the physiological mechanisms that control aqueous humor outflow through conventional pathways will allow to study drugs for glaucoma treatment. The perfusion of bovine eye anterior segment in vitro permits to study specifically the functional activity of outflow structures. Different studies have implicated the sympathetic nervous systems in the aqueous humor outflow regulation. The action mechanism of some neurotransmitters or drugs that modify outflow are still unknown. A characteristic example is epinephrine (EPI) that increases outflow facility (C) To study if EPI's effect is mediated by α or β adrenoceptors, we tested an α -agonist, methoxamine (METX). When METX was added to the perfusion medium, it induced a higher increase on C than the one induced by EPI. Moreover, as EPI's effect could be mediated by prostaglandins, we tested the effect of indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor) on the effect of EPI and METX on C. While indomethacin alone did not modify C, the presence of this drug blocked the effects induced by EPI and METX. Phentolamine, also blocked the effects induced by EPI and METX. Finally, the participation of cAMP as a second messenger on outflow structures was studied. The intracellular concentration of cAMP was increased using forskolin, dibutyl-cAMP or IBMX; all these drugs increased C. The present results show the participation of α -adrenoceptor on aqueous humor outflow regulation in bovine trabecular meshwork and Schlemm's canal. Moreover, it seems that cAMP and prostaglandins have a role as second or third messengers in this process.

INTRODUCCIÓN

El humor acuoso baña y ocupa las dos cámaras oculares, la posterior y la anterior; la secreción del humor acuoso tiene lugar fundamentalmente en los procesos ciliares situados en la cámara posterior y es drenado continuamente en el ángulo iridocorneal de la cámara anterior, el denominado ángulo camerular. El equilibrio entre la producción y la evacuación de humor acuoso determina no solo la presión en estas cámaras sino la presión intraocular (IOP). Los valores fisiológicos de la IOP en el hombre oscilan alrededor de los 15 mmHg (Goldmann, 1955, mediante tonometría de aplanación). Cuando se altera el equilibrio de los procesos determinantes de la IOP (la secreción y la evacuación), se produce un aumento de presión en el globo ocular. Este aumento de la IOP compromete el flujo sanguíneo intraocular y en consecuencia altera la fisiología ocular. Los diversos procesos patológicos que cursan con el signo común de una IOP elevada constituyen la entidad nosológica denominada glaucoma.

El abordaje terapéutico del glaucoma comprende la utilización de métodos farmacológicos y/o quirúrgicos, según el tipo de glaucoma (primario o secundario; de ángulo abierto o cerrado, etc...) y según el grado de evolución del mismo. Los métodos farmacológicos actúan básicamente sobre dos puntos clave (Fig. 1): sobre los procesos ciliares, donde se produce el humor acuoso (*inflow*), y sobre la red trabecular-canal de Schlemm, donde se elimina el humor acuoso (*outflow*). Uno de

los mecanismos posibles de disminuir la IOP es actuar sobre el *inflow* disminuyendo la cantidad de humor acuoso que se forma. La otra posibilidad es actuar sobre el *outflow* aumentando su evacuación.

En el año 1941 Friedenwald y Buschke implicaron en la regulación de la dinámica del humor acuoso un componente adrenérgico del sistema nervioso autónomo. Langham (1971) ha sugerido que una de las etiologías del glaucoma podría ser una disfunción vascular que se desarrollaría después de una alteración de los mecanismos adrenérgicos que regulan la dinámica del humor acuoso. La utilización de diferentes fármacos que actúan sobre receptores adrenérgicos en el tratamiento de algunos tipos de glaucoma ha aumentado el interés por conocer mejor su mecanismo de acción y, a su vez, aportan nuevas informaciones sobre la fisiología de los procesos implicados. De hecho, la epinefrina se ha utilizado desde hace muchos años en el tratamiento del glaucoma primario de ángulo abierto, pero todavía hoy desconocemos los mecanismos celulares implicados en la disminución de la IOP que induce este fármaco. Actualmente se acepta que la reducción de la IOP mediada por la epinefrina se debe, al menos en parte, al aumento de la evacuación del humor acuoso a través de la vía convencional, red trabecular y canal de Schlemm (Potter y Rowland, 1981; Tripathi et al., 1992).

La epinefrina puede actuar en los receptores α y β , y los efectos producidos sobre la evacuación del humor acuoso podrían estar mediados por uno de es-

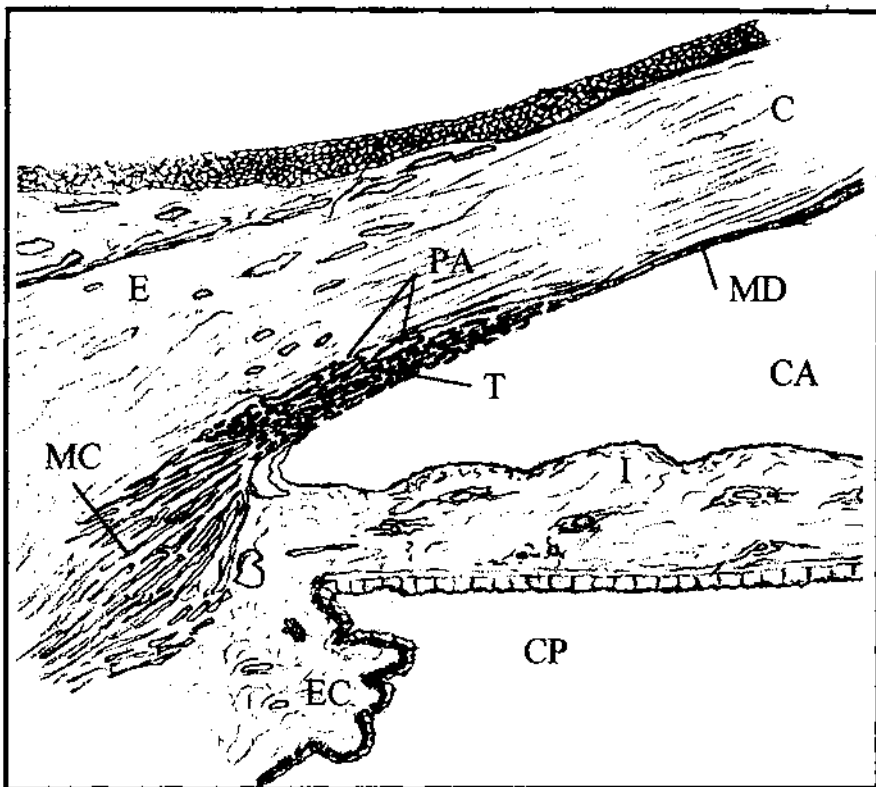


Figura 1

Representación del ángulo iridocorneal formado por la intersección de la córnea y la inserción del iris en la esclerótica. Se pueden distinguir las estructuras: iris (I), cuerpo y epitelio ciliar (EC), músculo ciliar (MC), red trabecular (T), plexos acuosos (PA), esclerótica (E), córnea (C), y membrana de Descemet (MD). Así mismo se muestran los espacios ocupados por la cámara anterior (CA) y la cámara posterior (CP).

tos receptores o por ambos. Algunos autores han implicado los receptores α adrenérgicos en la regulación de la evacuación del humor acuoso (Sears y Bárány, 1960; Eakins y Ryan, 1964) mientras que otros han sugerido la participación de los receptores β adrenérgicos (Bill, 1970; Erickson-Lamy, 1992).

El AMP_C, segundo mensajero intracelular, parece ser una de las moléculas más claramente implicadas en la regulación de la evacuación del humor

acuoso, pudiendo ser uno de los mediadores del efecto inducido por la epinefrina. En la red trabecular humana se han identificado receptores β adrenérgicos acoplados a la adenilato ciclasa (Wax, 1989; Busch, 1993), lo que sugiere claramente la participación de estos receptores en el efecto de la epinefrina. En cambio, en la red trabecular bovina el sistema de la adenilato ciclasa parece no estar acoplado a receptores β adrenérgicos (Busch, 1993), y por

tanto el incremento de facilidad mediado por el AMPc no estaría asociado a la activación de estos receptores.

Nuestros recientes estudios se han centrado especialmente en la participación del AMPc como segundo mensajero en la regulación de la evacuación del humor acuoso, así como en la participación de los receptores implicados en la síntesis intracelular de AMPc.

MÉTODOS PARA EL ESTUDIO DE LA EVACUACIÓN DEL HUMOR ACUOSO

Por la mayor facilidad del abordaje quirúrgico y experimental, se ha investigado mucho sobre la producción de humor acuoso en los procesos ciliares; por ello, hoy se dispone de una información abundante sobre sus mecanismos. Sin embargo, el estudio de la evacuación del humor acuoso es metodológicamente más difícil. En este sentido, han supuesto avances muy importantes la puesta a punto de técnicas que permiten el estudio específico de los mecanismos relacionados con la eliminación del humor acuoso (Erickson-Lamy et al., 1988 y 1991; Johnson y Tschumper, 1987). Estas técnicas han aportado nuevos datos sobre la fisiología del humor acuoso y especialmente sobre el mecanismo de acción de fármacos utilizados en clínica durante muchos años, del que la epinefrina es un ejemplo característico.

Erickson-Lamy (1988; 1991) describió una técnica altamente específica para el estudio del *outflow*. Esta técnica permite estudiar, sin la interferencia del *inflow*, la evacuación de humor acuoso.

Para esta técnica se utiliza el segmento anterior ocular (semi-esfera anterior del globo ocular), en el que se ha eliminado el iris, el cristalino y el cuerpo ciliar, y se perfunde a una presión constante y conocida en condiciones de cultivo de órganos. Nuestro laboratorio ha modificado y validado esta preparación, mostrando la capacidad de la misma para estudios funcionales durante períodos prolongados (Gilabert et al., 1994, 1996; Gasull et al., 1995).

Brevemente, la preparación consiste en situar el segmento anterior en una cámara de perfusión especialmente diseñada al efecto dentro de un incubador a 36 °C y 5% de CO₂ (Fig. 2). El segmento anterior se perfunde con DMEM desde un reservorio situado a una altura específica. La altura del reservorio determina la presión de perfusión que se registra mediante un transductor de presión a la salida de la cámara de perfusión. Este reservorio es sostenido por un transductor de fuerza que permite medir la cantidad de DMEM que se pierde después de atravesar las estructuras trabeculares. El flujo, en $\mu\text{l}/\text{min}$, se registra con la ayuda de un ordenador y se analiza mediante un *software* diseñado para tal fin. Con los datos de flujo y presión se obtiene la *facilidad de evacuación* (C , $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mmHg}$), parámetro resultante de la relación entre el flujo ($\mu\text{l}/\text{min}$) y la presión de perfusión (mmHg).

PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO EN LA REGULACIÓN DE LA EVACUACIÓN DEL HUMOR ACUOSO

El sistema nervioso simpático se ha

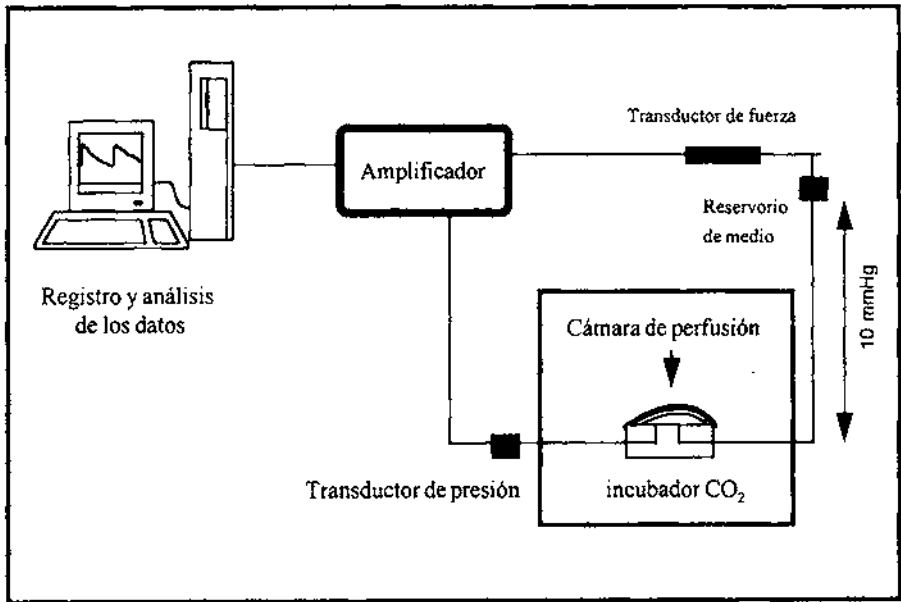


Figura 2

Diagrama del diseño experimental utilizado en este trabajo. Obsérvese como el segmento anterior se encuentra en condiciones de cultivo de órganos (36 °C y 5% CO₂). El sistema informático recibe las dos señales necesarias para el cálculo de la facilidad de evacuación (ml/min/mmHg), presión intracamerular (mmHg) y volumen de medio (μl).

implicado en la regulación de la evacuación del humor acuoso en numerosas ocasiones y en diferentes especies como conejos, gatos, bovinos y humanos. La inervación de las vías de evacuación es variable; abundante en la red trabecular del gato, menor en el conejo y poco constante en los primates. Sin embargo, el canal de Schlemm está profusamente inervado en todas las especies (Laties y Jacobowitz, 1966).

Se ha descrito en conejos que la estimulación simpática *in vivo* aumenta, moderadamente, la evacuación del humor acuoso (Sears y Neufeld, 1975). Por otra parte, la liberación de norepinefrina de las terminaciones nerviosas del iris después de la denervación sim-

pática provoca un aumento del *outflow* y un descenso de la IOP. Tanto los receptores adrenérgicos α como los β podrían mediar este proceso. La información existente al respecto hasta la fecha no clarifica ni qué receptores están implicados ni cuál es su grado de participación.

El efecto de la epinefrina se había estudiado en diversas preparaciones, *in vivo* e *in vitro*, en las que persistía el epitelio ciliar. Por ello, no se podía evaluar si las variaciones de facilidad de evacuación o los cambios de IOP observados correspondían específicamente a efectos sobre la evacuación del humor acuoso. No fue hasta 1992 (Erickson-Lamy, 1992) cuando por pri-

mera vez se sugirió, ya con técnicas específicas para el *outflow*, que la epinefrina era capaz de inducir un aumento en la facilidad de evacuación.

EL AMPc COMO SEGUNDO MENSAJERO IMPLICADO EN LA REGULACIÓN DE LA EVACUACIÓN DEL HUMOR ACUOSO

Diversos estudios mostraron que el AMPc podía estar implicado en diversos

mecanismos que disminuyen la presión intraocular. Algunos autores han sugerido que la epinefrina podría actuar a través de los receptores β adrenérgicos (Erickson-Lamy, 1992) acoplados a la producción de AMPc. Según nuestros datos y en la preparación bovina, la epinefrina ($10^{-6}M$, $n=8$; Fig. 3) produce un aumento de la facilidad de evacuación de un 27% respecto a la facilidad de evacuación basal. La forskolina, un activador del enzima que sintetiza el

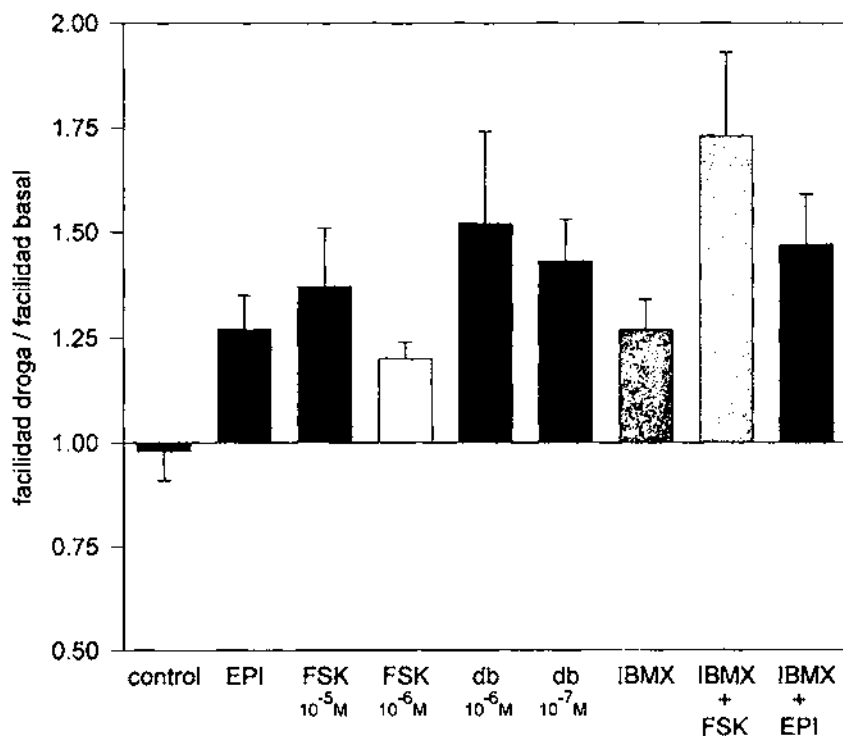


Figura 3

Estudio del AMPc: En ordenadas se muestra la relación entre la facilidad de evacuación durante la perfusión con una droga experimental y la facilidad de evacuación basal (periodo pre-droga). En abscisas se muestran los diferentes grupos experimentales. Control, perfusión con medio DMEM ($n=13$); EPI, epinefrina $10^{-6}M$ ($n=8$); FSK, forskolina 10^{-5} ($n=6$); FSK, forskolina $10^{-6}M$ ($n=6$); db, dibutilil-AMPc 10^{-6} ($n=6$); db, dibutilil-AMPc $10^{-7}M$ ($n=6$); IBMX, isobutilmetilxantina 10^{-6} ($n=6$); IBMX $10^{-6}M$ + FSK $10^{-5}M$ ($n=6$); IBMX $10^{-6}M$ + EPI $10^{-6}M$ ($n=6$). (Todas las barras muestran la media de la relación de facilidades \pm error estándar).

AMPC, la adenilato ciclasa, también incrementa la facilidad de evacuación de manera significativa. Así, la forskolina $10^{-5}M$ ($n=6$) provoca un incremento de la facilidad de evacuación del 37%, mientras que una concentración un orden menor, $10^{-6}M$ ($n=6$), induce un incremento de sólo el 20% (Fig. 3). La presencia en la perfusión de dibutiril-AMPC, un análogo del AMPC muy permeable a la membrana celular, también provoca un aumento significativo de la facilidad de evacuación. Esta acción de dibutiril-AMPC, como la de la forskolina, es dosis dependiente; el dibutiril-AMPC a $10^{-6}M$ ($n=6$) incrementa la facilidad de evacuación en un 52%, mientras que a $10^{-7}M$ ($n=6$), el incremento sólo es del 43% (Fig. 3). Finalmente, se estudió la inhibición de la fosfodiesterasa, el enzima encargado de degradar el AMPC, mediante la isobutilmetilxantina (IBMX, $10^{-6}M$). Este inhibidor, inespecífico pero muy potente de la fosfodiesterasa, incrementó la facilidad de evacuación de la preparación en un 27% ($n=6$; Fig. 3).

Todos estos resultados sugieren la participación del AMPC en la regulación de la facilidad de evacuación del ojo bovino. Así, todos los mecanismos evaluados que incrementan la concentración intracelular de AMPC provocan un aumento en la facilidad de evacuación. Esto es: tanto la forskolina, que aumenta la síntesis de AMPC, el análogo dibutiril-AMPC, y el IBMX, inhibidor de la fosfodiesterasa, provcan el mismo efecto sobre la facilidad de evacuación. Por otra parte, la aplicación simultánea al medio de perfusión de dos fármacos que incrementan el AMPC provocaron un efecto aditivo, aumentando la faci-

dad de evacuación muy significativamente. La perfusión simultánea con IBMX ($10^{-6}M$) y forskolina ($10^{-5}M$) produjo un incremento del 73% ($n=6$; Fig. 3), mientras que la perfusión simultánea con IBMX ($10^{-6}M$) y epinefrina ($10^{-6}M$) incrementó la facilidad de evacuación en un 47% ($n=6$; Fig. 3).

LOS RECEPTORES α -ADRENÉRGICOS

Entre otros posibles receptores, la epinefrina y la norepinefrina podrían mediar en las vías de evacuación del humor acuoso a través de la activación de los receptores α_1 adrenérgicos. Para comprobar esta posibilidad se estudió el efecto sobre la facilidad de evacuación de la metoxamina ($10^{-6}M$, $n=8$), un agonista selectivo α_1 . La presencia de este fármaco en el medio de perfusión incrementó la facilidad de evacuación en un 29% (Fig. 4). Este incremento de la facilidad se pudo bloquear, al menos en parte, mediante la fentolamina, un antagonista amplio e inespecífico α adrenérgico (Fig. 4). Del mismo modo, el efecto de la epinefrina sobre la facilidad de evacuación también pudo ser bloqueado por la fentolamina (Fig. 4). Tomados en su conjunto, estos datos avalan la participación de los receptores α_1 adrenérgicos en la preparación bovina, y refuerzan otros datos en este sentido (Eakins y Ryan, 1964; Potter, 1981).

PARTICIPACIÓN DE LAS PROSTAGLANDINAS

Algunos estudios han propuesto la participación de las prostaglandinas en

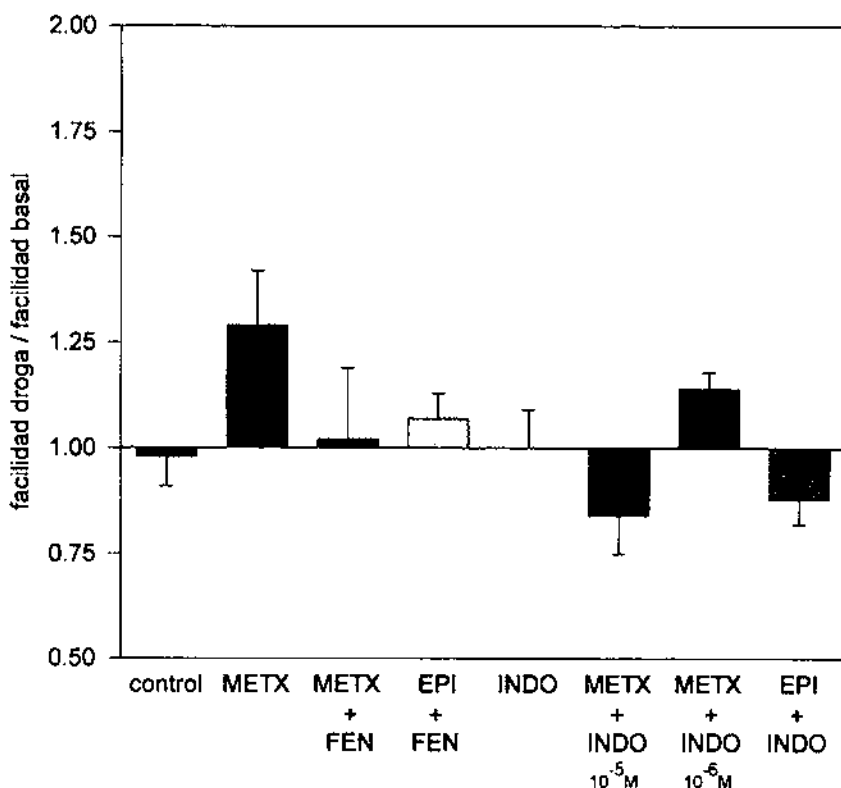


Figura 4
Estudio de los α -adrenoreceptores y participación de las prostaglandinas: En ordenadas se muestra la relación entre la facilidad de evacuación durante la perfusión con una droga experimental y la facilidad de evacuación basal (periodo pre-droga). En abcisas se muestran los diferentes grupos experimentales. Control, perfusión con medio DMEM (n=13); METX, metoxamina 10^{-6} M (n=8); METX + FEN (FEN, fentolamina), 10^{-6} M en ambos casos (n=6); EPI + FEN, 10^{-6} M en ambos casos (n=5); INDO, indometacina 10^{-6} M (n=7); METX + INDO, 10^{-6} y 10^{-5} M respectivamente (n=6); METX + INDO, 10^{-6} y 10^{-6} M respectivamente (n=6); EPI + INDO, 10^{-6} M en ambos casos (n=6). (Todas las barras muestran la media de la relación de facilidades \pm error estándar).

la regulación de la facilidad de evacuación, mostrando en diferentes preparaciones que estos compuestos son capaces de aumentar la evacuación del humor acuoso. Como los receptores α_1 adrenérgicos pueden activar la síntesis de prostaglandinas, se estudió el efecto del bloqueo de su síntesis con indometaci-

na. La indometacina bloqueó totalmente el aumento de la facilidad de evacuación inducido por la epinefrina (Fig. 4). Además, este bloqueo fue igualmente eficaz cuando se utilizó metoxamina en lugar de epinefrina para aumentar la facilidad de evacuación de humor acuoso (Fig. 4). Estos datos coinciden

con los existentes (Bhattacharjee y Hammond, 1977; Camras et al., 1985; Anderson y Wilson, 1990) sobre la posible participación de las prostaglandinas en la regulación de la evacuación del humor acuoso y refuerzan la implicación de las mismas en los mecanismos celulares del *outflow*.

CONCLUSIONES

La información que acabamos de resumir permite afirmar que los receptores adrenérgicos tienen un papel en la regulación de la facilidad de evacuación en el ojo bovino. Concretamente, la epinefrina, fármaco utilizado habitualmente en el tratamiento del glaucoma, parece tener un mecanismo de actuación mediado, al menos en parte, a través de los receptores α_1 adrenérgicos. Dos de los datos experimentales presentados anteriormente confirman este mecanismo; *i*) el incremento de la facilidad de evacuación provocado por la metoxamina, y *ii*) el bloqueo del efecto de la metoxamina en presencia de fentolamina.

La cascada de reacciones intracelulares que se desencadena tras la activación de los receptores α_1 adrenérgicos induce la síntesis de prostaglandinas (Nebigil y Malik, 1993). En nuestra preparación, este hecho parece confirmarse con el efecto de la indometacina. Estos experimentos muestran como la indometacina por sí sola no es capaz de inducir ningún cambio agudo en la facilidad de evacuación, mientras que la indometacina es capaz de bloquear el efecto del aumento de facilidad de evacuación inducido tanto por la meto-

xamina como por la epinefrina. En resumen, un posible mecanismo de acción podría iniciarse a través de la activación de un receptor adrenérgico (posiblemente α_1) por un agonista (la epinefrina) el cual activaría la síntesis endógena de prostaglandinas. Estas, las prostaglandinas, activarían sus propios receptores específicos, provocando el incremento de la facilidad de evacuación observado.

El incremento fisiológico de la concentración intracelular de AMPc se podría producir, fundamentalmente, a través de la activación o bien de los receptores β adrenérgicos o bien de los receptores de prostaglandinas. La activación de los receptores β adrenérgicos parece poco probable en los tejidos de la red trabecular y canal de Schlemm bovinos (Busch et al., 1993). En cambio, los datos experimentales presentados en este estudio sugieren que los receptores de prostaglandinas serían el mecanismo fisiológico a través del cual se induciría un aumento del AMPc intracelular. De este incremento en la concentración intracelular de AMPc resultaría el aumento observado de la facilidad de evacuación del humor acuoso.

Se podría concluir que los datos presentados avalan un mecanismo de acción fisiológico para fármacos agonistas de la epinefrina en el tratamiento farmacológico de la hipertensión ocular. Sin embargo, a pesar de que la preparación de ojo bovino es un buen modelo para el estudio de la fisiopatología del glaucoma, es necesario profundizar en su estudio y confirmar estos resultados en tejido de ojos humanos para su posible uso terapéutico.

REFERENCIAS

1. Anderson L, Wilson WS. Inhibition by indomethacin of the increased facility of outflow induced by adrenaline. *Exp Eye Res*, 50, 119-126 (1990).
2. Bill A. Effects of Norepinephrine, Isoproterenol and sympathetic stimulation on aqueous humor dynamics in vervet monkeys. *Exp. Eye Res.*, 10, 31-46 (1970).
3. Bhattacharjee P, Hammond BR. Effect of indomethacin on the ocular hypotensive action of adrenaline in the rabbit. *Exp. Eye Res.*, 24, 307-313 (1977)
4. Busch MJ, WM, Kobayashi K, Hoyng PFJ, Mittag TW. Adenylyl cyclase in human and bovine trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34, 3028-3034 (1993).
5. Camras CB, Feldman SG, Podos SM, Christensen RE, Gardner SK, Fazio DT. Inhibition of the epinephrine-induced reduction of intraocular pressure by systemic indomethacin in humans. *Am J Ophthalmol*, 100, 169-175 (1985).
6. Eakins KE, Ryan SJ. The action of sympathomimetic amines on the outflow of aqueous humor from the eye. *Br J Pharmacol*, 23, 374-382 (1964).
7. Erickson-Lamy K, Rohen JW, Grant WM. Outflow facility studies in the perfused bovine aqueous outflow pathways. *Curr Eye Res*, 7, 799-807 (1988).
8. Erickson-Lamy K, Rohen JW, Grant WM. Outflow facility in the perfused human ocular anterior segment. *Exp Eye Res*, 52, 723-731 (1991).
9. Erickson-Lamy K, Nathanson JA. Epinephrine increases facility of outflow and cyclic AMP content in the human eye in vitro. *Invest Ophtalmol Vis Sci*, 33, 2672-2678 (1992).
10. Friedenwald JS, Buschke,W. The role of epinephrine in the formation of the intraocular fluid. *Am J Ophthalmol*, 24, 1105-1114 (1941).
11. Gasull X, Gilabert R, Bergamini MVW, Gual A. Participation of α_1 -adrenoreceptors on outflow facility (C) in cow eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36, S194 (1995).
12. Gilabert R, Gasull X, Belmonte C, Borrás T, Bergamini MVW, Gual A. Effects of time of storage post mortem and of osmolarity changes on the outflow facility of excised young cow eyes. *Invest Ophtalmol Vis Sci*, 34, S2054 (1994).
13. Gilabert R, Gasull X, Palés J, Belmonte C, Bergamini MVW, Gual A. Facility changes mediated by cAMP in the bovine anterior segments *in vitro*. *Vision Research*, (1996) *in press*.
14. Goldmann H. Un nouveau tonomètre à aplation. *Bull Soc fr Ophtal*, 67, 474 (1955).
15. Johnson DH, Tschumper RC. Human trabecular meshwork organ culture. A new method. *Invest Ophtalmol vis sci*, 28, 945-953 (1987).
16. Langham ME. Role of adrenergic mechanisms in development and therapy of open angle glaucoma. *Proc Roy Soc Med*, 64, 622-628 (1971).
17. Laties A, Jacobowitz D. A comparative study of the autonomic innervation of the eye in monkey, cat, and rabbit. *Anatomical record*, 156, 383-395 (1966).

18. Nebigil C, Malik KU. Alpha adrenergic receptor subtypes involved in prostaglandin synthesis are coupled to Ca⁺⁺ channels through a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein. *J Pharmacol Exp Ther* 266, 1113-1124 (1993).
19. Potter DE, Rowland JM. Adrenergic drugs and intraocular pressure. *Gen Pharmac*, 12, 1-13 (1981).
20. Sears ML, Bárány EH. Outflow resistance and adrenergic mechanisms. *Arch Ophthalmol.*, 64, 839-848 (1960).
21. Sears ML, Neufeld AH. Adrenergic modulation of the outflow of aqueous humor. *Investigative Ophthalmology*, 14, 83-86 (1975).
22. Tripathi RC, Yang C, Tripathi BJ, Borisuth NSC. Role of receptors in the trabecular meshwork of the eye as targeted to the development of antiglaucoma therapy. *Drug Dev Res*, 27, 191-228 (1992).
23. Wax MB, Molinoff PB, Alvarado J, Polansky J. Characterization of β -adrenergic receptors in cultured human trabecular cells and in human trabecular meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 30(1), 51-57 (1989).