

Detecció de polifosfatos de diadenosina en humor acuoso humano

M. Castany^{1,2}
 J. Pintor³
 I. Jordi⁴
 A. Carceller⁵
 J. Català^{6,7}
 J. Bardavío⁴
 X. Gasull⁸

¹Hospital de l'Esperança

²Teknoftal

³Escuela de Óptica. Universidad Complutense de Madrid

⁴Hospital Sagrat Cor-ICR

⁵Hospital Vall d'Hebron

⁶Hospital de Bellvitge

⁷Hospital Sant Joan de Déu

⁸Laboratorio de Neurofisiología Facultad de Medicina-IDIBAPS. Universidad de Barcelona

Correspondencia:
 Marta Castany Aregall
 Hospital de l'Esperança-IMAS
 Avda. Santuari Sant Josep de la Muntanya, 12
 08024 Barcelona

Resumen

Objetivo: Estudiar la presencia de polifosfatos de diadenosina en el humor acuoso de humanos.

Objetivo secundario: Analizar si existen diferencias entre pacientes con y sin glaucoma.

Método: Recogida de muestras de humor acuoso de 20 ojos de 20 pacientes subsidiarios de cirugía de cataratas. La extracción se realizó en la primera maniobra quirúrgica de la facoemulsificación: a través de córnea clara se realizó una paracentesis y se aspiraron de 0,1 a 0,2 ml de humor acuoso con una cánula de 27 G conectada a una jeringa de insulina. La muestra se congeló inmediatamente a -80°C y se mantuvo protegida de la luz hasta que se analizó la presencia de AP_4A y AP_5A por cromatografía líquida de alta resolución.

Resultados: Diez pacientes presentaban glaucoma (9 glaucoma primario de ángulo abierto y uno glaucoma pseudoexfoliativo). Se detectaron AP_4A y AP_5A en todos los pacientes. No se detectaron diferencias en la concentración de AP_5A entre los pacientes con y sin glaucoma. Las concentraciones de AP_4A fueron más elevadas que las del AP_5A en el grupo con glaucoma y se detectó una diferencia estadísticamente significativa con el grupo control (296,5 nM en el grupo glaucoma frente a 27,5 nM en el grupo control).

Conclusiones: Por primera vez se detecta la presencia de AP_4A y AP_5A en humor acuoso humano. En los pacientes con glaucoma las concentraciones de AP_4A están elevadas en comparación a los controles. Aunque se ha descrito el papel regulador de la presión intraocular del AP_4A en modelos animales la importancia fisiopatológica de estas moléculas en humanos todavía no se conoce.

Resum

Objectiu: Estudiar la presència de polifosfats d'adenosina en humor aquós humà.

Objectiu secundari: Analitzar si hi ha diferències entre els pacients amb glaucoma i sense glaucoma.

Mètode: Recollida de mostra d'humor aquós de 20 ulls de 20 pacients subsidiaris de cirurgia de cataractes. L'extracció es va realitzar en la primera maniobra quirúrgica: a través d'una paracentesi a còrnia clara es van aspirar de 0,1 ml a 0,2 ml d'humor aquós amb una cànula de 27G connectada a una xeringa d'insulina. La mostra es va congelar immediatament a -80°C protegida de la llum, fins que es va analitzar la presència de AP_4A i AP_5A per cromatografia líquida d'alta resolució.

Resultats: Deu pacients presentaven glaucoma (9 glaucoma primari d'angle obert i 1 glaucoma pseudoexfoliatiu). Es va detectar AP_4A i AP_5A en tots els pacients. No es van detectar diferències en la concentració de AP_5A entre els pacients amb i sense glaucoma. Les concentracions de AP_4A van ser més elevades que les de AP_5A en el grup amb glaucoma i es va detectar una diferència estadísticament significativa respecte el grup control (296,5 nM en el grup glaucoma vs 27,5 nM en el grup control).

Conclusions: Per primera vegada es detecta la presència de AP_4A i AP_5A en humor aquós humà. En els pacients amb glaucoma les concentracions de AP_4A estan elevades respecte als controls. Encara que s'ha descrit el paper regulador de la pressió intraocular del AP_4A en models animals la importància fisiopatològica en humans encara no es coneix.

Summary

Purpose: To study the presence of diadenosine polyphosphates in human aqueous humour.

Secondary aim: To evaluate differences between glaucoma and no glaucoma patients.

Method: Aqueous humour sample was taken from 20 eyes of 20 patients who were scheduled for phacoemulsification. The extraction of sample was done as the first surgical step: 0.1 to 0.2 ml of aqueous humour was collected at

the beginning of the cataract surgery through corneal paracentesis using a 27-gauge cannula on a tuberculin syringe. The samples were immediately cooled at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and kept frozen and protected from light. Aqueous humour aliquots were analyzed by High Performance Liquid Chromatography for the presence of AP_4A and AP_5A .

Results: 10 patients had glaucoma (9 primary open angle glaucoma and 1 pseudoexfoliative glaucoma). AP_4A and AP_5A were detected in aqueous humour of all patients. AP_5A concentration had no statistically differences between glaucoma and no glaucoma group. AP_4A had higher concentrations than AP_5A and a statistically difference was detected between the two groups (296.5 nM in the glaucoma group vs 27.5 nM in the control group).

Conclusion: For the first time both, AP_4A and AP_5A have been detected in human aqueous humour. Interestingly, AP_4A concentration in glaucoma patients is higher than in the control group. According to results in animal models, AP_4A may be part of a homeostatic control of intraocular pressure, although the physiopathological role in humans still has to be elucidated.

Introducción

Los polifosfatos de diadenosina (APnA) constituyen una familia de dinucleótidos formados por dos grupos adenosina conectados por las posiciones 5' mediante una cadena polifosfato de n grupos ($n = 2-7$) (Figura 1). Forman parte de una gran familia en la que se encuentran los mononucleótidos de adenosina, más conocidos que los dinucleótidos, que funcionan como componentes estructurales básicos del ADN y el ARN y como coenzimas portadoras de energía (ATP o AMP o ADP). Los polifosfatos de diadenosina son almacenados en vesículas neurosecretoras y liberados por neuronas, células cromafines¹ y plaquetas². Su degradación enzimática da lugar a los mononucleótidos de adenina, con una vida extracelular más corta que los APnA . Funcionan como moléculas señal tanto intracelulares como extracelulares. En el medio extracelular actúan como neurotransmisores/neuromoduladores; intracelularmente están implicados en respuestas al estrés metabólico, procesos de proliferación, diferenciación celular y apoptosis. Interaccionan con receptores purinérgicos (P2X, P2Y) y otros específicos de dinucleótidos. Los receptores P2Y son de tipo metabotrópico, están formados por 7 proteínas transmembrana acopladas a la fosfolipasa C a través de la proteína G y están implicados en la liberación de calcio intracelular. Los P2X son inotrópicos y permiten la entrada de iones, básicamente sodio y calcio, al interior de la célula.

En el ser humano se han identificado en plasma³, tejido cardíaco⁴ y lágrimas⁵. Se ha estudiado su función con la regulación del tono vascular y la arteriosclerosis⁶; en el ojo, participan en la regulación de la producción lagrimal y estimulan la reepitelización corneal⁷. En relación con la presión intraocular se

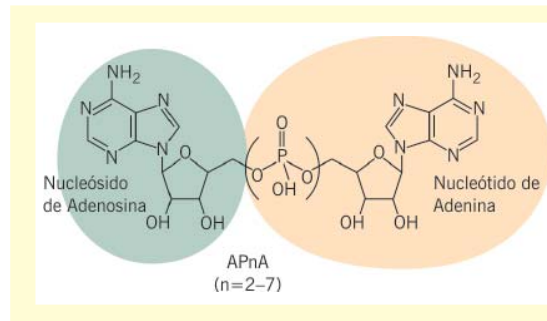


Figura 1.

ha detectado APnA en humor acuoso en animales y se han observado modificaciones de la PIO con su aplicación tópica, siendo especialmente interesante la reducción de la PIO producida por AP_4A ⁸. En células trabeculares humanas se han documentado receptores P2Y⁹.

No existe información sobre la presencia de los polifosfatos de diadenosina en el humor acuoso humano ni de su papel en la regulación de la presión intraocular.

Pacientes y métodos

Estudio piloto diseñado como un estudio prospectivo de casos y controles. Se incluyeron 20 pacientes: 10 pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) y 10 pacientes controles. El estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Sagrat Cor. Todos los pacientes eran subsidiarios de cirugía de cataratas por $\text{AV} < 0,5$ con corrección óptica y con catarata clínicamente significativa.

Criterio de inclusión en el grupo de pacientes

GPAA: PIO basal mayor de 22 mmHg medida con tonómetro de aplanación Goldmann, ángulo abierto (gonioscopia con lente de contacto Goldman 3 espejos), aspecto papilar característico de glaucoma (excavación papilar > 0,7, asimetría de la excavación mayor a 0,2 o incumplimiento de la regla ISNT) con alteraciones en el campo visual (Humphrey field analyzer, estrategia SITA, programa 24-2) compatibles con glaucoma, en los casos en que pudiera realizarse.

Glaucoma pseudoexfoliativo: es un tipo de glaucoma de ángulo abierto que cumple los mismos criterios que el GPAA asociando pseudoexfoliación visible en la cápsula anterior del cristalino, alteraciones en la transluminación del iris y pigmentación irregular del ángulo camerular.

Se excluyeron otros tipos de glaucomas tanto secundarios como primarios de ángulo cerrado, así como pacientes a los que se había realizado láser o cirugía previa.

Los pacientes del grupo control presentaban una catarata clínicamente significativa, PIO < 21 mmHg sin medicación tópica y papila de aspecto no glaucomatoso.

Para comparar la concentración de Ap_4A y Ap_5A en los diferentes grupos se realizó con un test de la t de Student para datos independientes.

Método de extracción de la muestra

La muestra de humor acuoso se extrajo en la primera maniobra quirúrgica. A través de una paracentesis en córnea clara se extrajeron de 0,1 a 0,2 ml de humor acuoso con una cánula de 27G en una jeringa de insulina. La cirugía prosiguió normalmente con la inyección intracamerular de viscoelástico y la realización de la incisión. Se evitó el contacto de la cánula con los vasos límbicos y con el iris para no alterar la muestra. El humor acuoso se depositó inmediatamente dentro de un tubo de Eppendorf y se congeló a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ en un recipiente opaco con nieve carbónica. Se mantuvo a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el análisis con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Figura 2).

Resultados

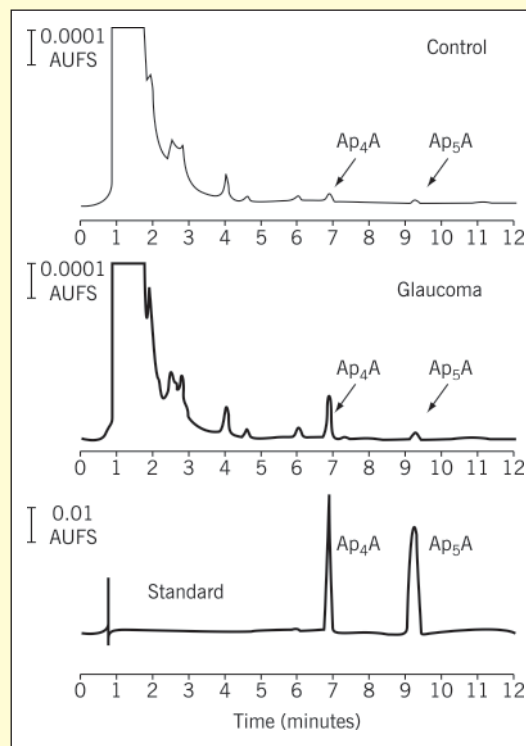
La media de edad de los pacientes controles era de 75,7 años y de 72,9 años en afectados de glaucoma. Eran mujeres un 60% del grupo control y un 70% del grupo con glaucoma. En el grupo control había un paciente con glaucoma pseudoexfoliativo mientras que los nueve restantes presentaban glaucoma primario de ángulo abierto. Cuatro pacientes, dos en el grupo con glaucoma (2/10) y dos en el grupo control presentaban diabetes mellitus (DM) y 14 pacientes, siete en cada grupo, presentaban HTA. Las características clínicas de los pacientes se detallan en la Tabla 1.

La media de Ap_4A fue de 19,4 nM en el grupo control y de 297 nM en el grupo con glaucoma, siendo la diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0,001$. La concentración de Ap_5A fue menor en los dos grupos, con una media de 20,9 en el grupo control y de 39,1 en el grupo con glaucoma, sin que se pudieran observar diferencias estadísticamente significativas (Figura 3).

No se observó relación entre las concentraciones de Ap_4A y Ap_5A con la edad (Figura 4).

No se pudieron detectar diferencias entre las concentraciones de Ap_4A y Ap_5A en relación con la DM o con la HTA, aunque debe tenerse en cuenta que sólo 4 pacientes presentaban DM (Figura 5).

Figura 2.



Discusión

Los ApnA se han detectado en plasma⁹ y tejido cardíaco¹⁰ humanos. Su participación en la regulación del flujo vascular es compleja: activan las plaquetas y pueden actuar tanto como vasodilatadores como vasoconstrictores según tipo de ApnA, el tono basal previo y tipo de receptor estimulado¹⁰. Si bien se ha documentado el efecto vasodilatador de Ap₂A, Ap₃A, Ap₄A y Ap₅A por estímulo de receptores P₂Y, también se ha observado que durante la isquemia se reduce este efecto. Incluso el estímulo de los receptores P₂X por Ap₄A y Ap₅A desencadena vasoconstricción en situaciones de isquemia en modelos animales¹¹ y en el músculo liso de la arteria radial en los trasplantes coronarios humanos¹². Habitualmente a mayor número de fosfatos mayor capacidad de vasoconstricción. Dentro de los ApnA el Ap₃A y Ap₄A estimulan la proliferación de células del músculo liso de la pared vascular, por lo que están implicados en la fisiopatología de la arteriosclerosis¹³.

En el ojo humano se ha descrito la presencia de Ap₃A, Ap₄A y Ap₅A en las lágrimas. El Ap₄A no sólo presenta una mayor concentración sino que puede incrementar hasta en un 60% la secreción lagrimal seguramente mediante la estimulación del P₂Y₂¹⁸. Se ha observado que la activación del receptor P₂Y por el Ap₄A estimula la migración de las células epiteliales de la córnea y, por lo tanto, estimula el proceso de reepitelización corneal⁷.

La relación con el glaucoma ha sido establecida, de momento, sólo en estudios animales. Se han detectado estos compuestos en humor acuoso de conejos y se ha observado que la aplicación tópica de Ap₂A, Ap₃A y Ap₅A aumenta la presión intraocular mientras que Ap₄A la reduce^{8,14}. El ATP también ha sido estudiado como nucleósido que modula la PIO; pero el resultado, supuestamente debido a la degradación por ectonucleasas hacia ADP¹⁵, es bifásico: produce un descenso inicial de corta duración seguido de un aumento de la PIO¹⁶.

El mecanismo fisiopatológico por el que estos dinucleósidos modulan la PIO es poco conocido y seguramente implica a más de una vía. En estudios con ojos de bovino perfundidos se ha observado que el Ap₄A actúa sobre los receptores purinérgicos P₂Y₁ presentes en la malla trabecular¹⁷, si bien también se ha detectado activación de los receptores P₂X₂ presentes en las terminales colinérgicas del músculo ciliar¹⁸. En células bovinas de la malla trabecular se ha observado que tanto el Ap₄A como el Ap₅A producen un aumento de calcio intracelular y una disminución del volumen celular. En estudios con ojos

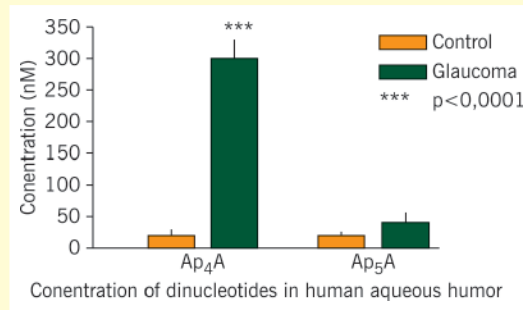


Figura 3.

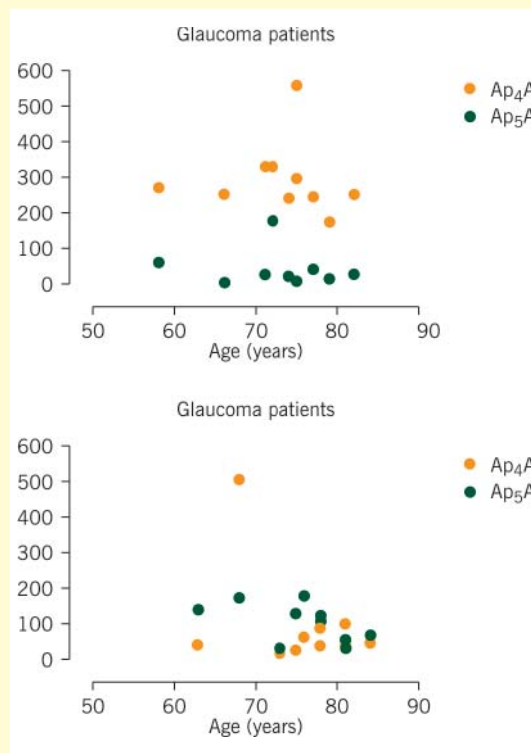
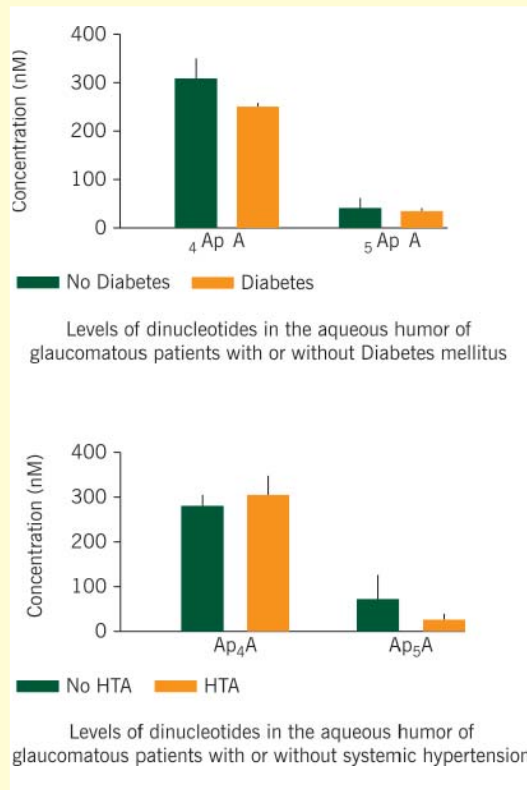


Figura 4.

bovinos en perfusión de flujo *ex vivo* se ha detectado que Ap₃A y Ap₄A aumentan el flujo de humor acuoso, supuestamente por la vía de la activación de los receptores P₂Y₁, mientras que ni el Ap₅A ni el ATP producen cambios. En células de la malla trabecular humana se han detectado receptores P₂Y (P₂Y₁, P₂Y₄, P₂Y₁₁)¹⁹.

En nuestro estudio se ha detectado por primera vez Ap₄A y Ap₅A en humor acuoso humano. Además, se

Figura 5.



ha podido observar que la concentración de Ap₄A en el grupo con glaucoma es mayor que en el grupo control, sin que pudieran observarse diferencias entre la concentración de estos dos dinucleótidos en relación a otras variables como la HTA o la DM.

Los resultados en estudios animales sugieren que el Ap₄A podría estar implicado en el mecanismo homeostático de respuesta a la hipertensión ocular aumentado el flujo de salida del mismo y facilitando, por lo tanto, el descenso de la PIO. El hecho de que existan receptores específicos en la malla trabecular humana y que existan estos compuesto en el humor acuoso abre la puerta a una posible relación con el control de la PIO, si bien todavía desconocemos que papel puede tener el Ap₄A en los humanos, así como si podría servir como biomarcador para el glaucoma.

Bibliografía

1. Pintor J, Rotllan P, Torres M, Miras-Portugal MT. Characterization and quantification of diadenosine

hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal Biochem* 1992;200:296-300.

2. Jankowski J, Hagemann J, Tepel M, Van der Giet M, Stephan N, Henning L, Gouni-Berthold I, et al. Dinucleotides as growth promoting extracellularly mediators: Presence of dinucleotide diphosphates Ap₂A, Ap₂G and Gp₂G in releasable granules of platelets. *J Biol Chem* 2001;276:8904-9.
3. Jankowski J, Jankowski V, Laufer U, Van der Giet M, Henning L, Tepel M, et al. Identification and quantification of diadenosine polyphosphate concentrations in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1231-8.
4. Luo J. Endogenous Diadenosine Tetrphosphate, Diadenosine Pentaphosphate, and Diadenosine Hexaphosphate in Human Myocardial Tissue. *Hypertension* 2004;43:1055-9.
5. Pintor J, Carracedo G, Alonso MC, Bautista A, Peral A. Presence of diadenosine polyphosphates in human tears. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 2002;443:432-6.
6. Vahlensieck U, Boknik P, Knapp J, Linck B, Muller FU, Neumann J, et al. Negative chronotropic and inotropic effects exerted by diadenosine hexaphosphate (Ap₆A) via A₁-adenosine receptors. *Br J Pharmacol* 1996;119:835-44.
7. Medeiro A, Guzamán-Aranquez A, Croke A, Peral A, Pintor A. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4982-92.
8. Pintor J, Peláez T, Peral A. Adenosine tetrphosphate, Ap₄, a physiological regulator of intraocular pressure in normotensive rabbit eyes. *J Pharmacol Exp Ther* 308:468-473.
9. Jankowski J, Jankowski V, Laufer U, Van der Giet M, Henning L, Tepel M, et al. Identification and quantification of diadenosine polyphosphate concentrations in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1231-8.
10. Luo J, Jankowski V, Güngör N, Neumann J, Schmitz W, Zidek W, et al. Endogenous Diadenosine Tetrphosphate, Diadenosine Pentaphosphate, and Diadenosine Hexaphosphate in Human Myocardial Tissue. *Hypertension* 2004;43:1055-9.
11. García-Villalón AL, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Narváez-Sánchez R, Diéguez G. Coronary response to diadenosine pentaphosphate after ischaemia-reperfusion in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 2009;81:336-43.
12. Conant AR, Theologou T, Dihmis WC, Simpson AWC. Diadenosine polyphosphates are selective vasoconstrictors in human coronary artery bypass grafts. *Vascul Pharmacol* 2008;48:157-64.
13. Bobbert P, Schluter H, Schultheiss HP, Reusch HP. Diadenosine polyphosphates Ap₃A and Ap₄A, but not Ap₅A or Ap₆A, induce proliferation of vascular smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 2008;75:1966-73.

14. Pintor J, Peral A, Peléez T, Martín S, Hoyle CHV. Presence of diadenosine polyphosphates in the aqueous humor: their effect on intraocular pressure. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:342-8.
15. Crosson CE, Gray T. Characterization of ocular hypertension induced by adenosine agonists. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1833-9.
16. Pintor J, Peral A, Navas B, Peléez T, Gallar J. Effects of ATP and adenine nucleotides on intraocular pressure in New Zealand rabbits. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2000;S255.
17. Soto D, Pintor J, Peral A, Gual A, Gasull X. Effects of dinucleoside polyphosphates on trabecular meshwork cells and aqueous humor outflow facility. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:1042-51.
18. Guzmán-Aranguenza A, Crooke, Peralba A, Hoylec HVC, Pintor J. Dinucleoside polyphosphates in the eye: from physiology to therapeutics. *Progress in Retinal and Eye Research* 2007;26:674
19. Crosson CE, Yates PW, Bhat AN, Mukhin YV, Husain S. Evidence for multiple P2Y receptors in trabecular meshwork cells. *J Pharmacol Exp Ther* 309:484-9.

FE DE ERRATAS:

En la sección "Cuestión de imagen" publicada en la Revista *Annals d'oftalmologia* 2009;17(3):178-179, el nombre del autor no era correcto. El correcto es el siguiente: Rafel Alcubierre Bailac.