

Existencia del péptido atrial natriurético en coroides, retina y cuerpo ciliar de conejo

M. García de Lacoba, R. Fernández-Durango*, A. Triviño**, J. M. Ramírez**,
A. I. Ramírez**, J. J. Salazar**, A. Fernández-Cruz y J. Gutkowska***

Centro de Diabetes e Hipertensión
Departamento de Medicina Interna III
Hospital Universitario San Carlos
Madrid (España)

(Recibido el 12 de diciembre de 1990)

M. GARCÍA DE LACOPA, R. FERNÁNDEZ-DURANGO, A. TRIVIÑO, J. M. RAMÍREZ, A. I. RAMÍREZ, J. J. SALAZAR, A. FERNÁNDEZ-CRUZ and J. GUTKOWSKA. *Existence of Atrial Natriuretic Peptide in Choroid, Retina and Ciliary Body of Rabbit*. Rev. esp. Fisiol., 47 (2), 91-96, 1991.

The presence of atrial natriuretic factor (ANF) in choroid, retina and ciliary body of rabbit eyes has been studied. The peptide was extracted by reverse phase chromatography using Sep-Pak C₁₈ cartridges. Immunoreactive ANF (Ir-ANF) was measured by a specific RIA. In the choroid, retina and ciliary body the ir-ANF concentrations were 444 ± 94 , 67 ± 12 and 223 ± 75 pg/g tissue weight (n=16), respectively. The biological activity of the acid extract ANF was evaluated by a ¹²⁵I-ANF binding assay to a retinal particulate preparation. Results demonstrate the existence of biological active ANF in choroid, retina and ciliary body of rabbit eyes. The presence of ANF and its specific receptors in the ocular tissues suggests that this hormone might play a physiological role in the intraocular fluid homeostasis.

Key words: ANF, Choroid, Retina, Ciliary body, Retinal receptors.

Con el término ANF se designa a una familia de péptidos con un precursor común, originalmente aislado de los gránulos de secreción de miocitos auriculares de

mamíferos (4). El ANF produce potentes efectos diuréticos y natriuréticos (5) y muestra propiedades vasodilatadoras (19). Se ha demostrado su participación en la regulación del balance electrolítico, del volumen extracelular y de la presión sanguínea (1, 6).

Las distintas formas moleculares del ANF derivan de un precursor común, el preproANF, que contiene de 149 a 153 aminoácidos, dependiendo de la especie.

* A quien debe dirigirse la correspondencia.

** Laboratorio de Morfología Ocular, Departamento de Oftalmología, Hospital Universitario San Carlos, Madrid, España.

*** Institut de Recherches Cliniques de Montreal, Canadá.

La prohormona, de 126 aminoácidos, se acumula en los gránulos de secreción específicos. Un procesamiento enzimático desdobla este precursor en un fragmento amino-terminal, sin actividad biológica, y un fragmento carboxilo-terminal de 28 aminoácidos (ANF[1-28]), que es la forma circulante activa del ANF.

El ANF no tiene un origen exclusivamente cardíaco. Se ha revelado la presencia de ANF inmunorreactivo (ANF-ir) y de ANFmRNA en diferentes tejidos (13). En el ojo, se ha demostrado la existencia de ANF en la úvea anterior (cuerpo ciliar e iris) y en la retina de rata (18). Métodos inmunohistoquímicos demuestran que este péptido se localiza en las capas plexiformes interna y externa de la retina de rata y conejo (16). En trabajos recientes, nuestro grupo ha demostrado la presencia de ANF-ir en el humor acuoso de ojos de conejo con presión intraocular normal (10) y la existencia de niveles significativamente elevados de ANF-ir en el humor acuoso de ojos de conejo con presión intraocular elevada (glaucoma experimental) (9). Con técnicas de autorradiografía se han identificado receptores de ANF en el epitelio pigmentado de los procesos ciliares de rata (2) y conejo (3), y nuestro grupo de trabajo ha caracterizado receptores de ANF de alta especificidad en membranas de retina de rata (8). Estos datos sugieren la posible participación del ANF en la fisiología del volumen intraocular.

El propósito de este trabajo es estudiar la presencia de este péptido en coroides, retina y cuerpo ciliar de conejo mediante un radioinmunoensayo específico y evaluar la posible actividad biológica del ANF de estos tejidos.

Material y Métodos

Procedimiento de extracción. — Se usaron conejos albinos New Zealand hembras (3,0-3,5 kg) mantenidos en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, a temperatura

constante (20-23 °C) y alimentados con comida estandarizada y agua *ad libitum*.

Los animales fueron sacrificados por administración intravenosa de una sobredosis de pentobarbital sódico. Inmediatamente después, se enuclearon los ojos en suero salino isotónico frío, y se aislaron los cuerpos ciliares, las coroides y las retinas usando un microscopio de disección. Los tejidos disecados se homogeneizaron en frío en ácido acético 0,1 M, conteniendo inhibidores de la proteólisis a las concentraciones finales siguientes: EDTA 10^{-5} M, phenylmethyl-sulphonyl-fluoride (PMSF) 10^{-5} M y pepstatinA 5×10^{-6} M. El homogeneizado fue centrifugado a 10.000 xg durante 20 min a 4 °C. Una vez decantado el sobrenadante, se resuspendió el precipitado y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Los sobrenadantes resultantes de ambas centrifugaciones se recogieron juntos y se mantuvieron a -70 °C hasta su purificación cromatográfica. Este método mostró una recuperación del 90-95 %.

El ANF de los extractos tisulares se purificó cromatográficamente según el método usado para el ANF plasmático (11). Resumidamente: 1) activación de la fase sólida de las columnas Sep-Pak C₁₈ (Waters Associates, Millipore, U.S.A.) con 8-10 ml de acetonitrilo; 2) equilibrado con 8-10 ml de acetato amónico 0,2 %, pH = 4,0; 3) aplicación de la muestra; 4) lavado con 5 ml de acetato amónico 0,2 %, pH = 4,0; y 5) elución del ANF adsorbido con 3 ml de acetonitrilo disuelto al 60 % en acetato amónico 0,2 %, pH = 4,0. La evaporación de la fase orgánica en corriente de N₂ seco fue seguida de liofilización. Para la determinación por RIA del contenido en ANF, el residuo liofilizado se mantuvo a -70 °C hasta su disolución en tampón fosfato 0,1 M, pH = 7,4, conteniendo ácido trifluoracético al 0,1 %. Para el estudio de la actividad biológica (ensayo de receptores) el residuo liofilizado se disolvió en tampón Tris-HCl 50 mM, pH = 7,4.

Radioinmunoensayo de ANF. — Los niveles de ANF inmunorreactivo (ANF-ir) se midieron por un RIA específico previamente descrito (12), usando para la preparación de la curva patrón r-ANF[1-28] (Peninsula Laboratories, U.S.A.). El anticuerpo empleado, r-26AA-thyr, tiene una reacción cruzada al 100 % con el ANF[1-28] de rata y conejo, ya que ambos péptidos son molecularmente idénticos. El límite de sensibilidad fue de 1,5 pg/tubo y la reproducción intra e interensayo fue de 10,2 y 18,7 %, respectivamente.

El contenido de ANF de un pool del extracto ácido de cada uno de los tejidos se concentró cromatográficamente a través de las columnas Sep-Pak. El eluido liofilizado se hicieron diferentes diluciones para su determinación en el RIA.

Ensayo de unión a receptores. — Para evaluar la actividad biológica del ANF-ir contenido en los extractos tisulares, se emplearon receptores de membrana de retina de rata preparados según el método descrito por FERNÁNDEZ-DURANGO *et al* (8). La curva de competición del ANF[1-28] se realizó incubando durante 60 min, a 25 °C, la preparación de membranas (25-30 µg/tubo) con 10-20 pM de I¹²⁵-ANF[1-28] y con concentraciones de hormona fría entre 10⁻¹² y 10⁻¹⁰ M. La reacción se terminó diluyendo la mezcla con 1 ml de tampón frío Tris-HCl 50 mM, pH = 7,4, inmediatamente seguido de filtración a través de filtros Whatman GF/C, previamente saturados durante 1 hora en una solución al 0,3 % de polyethylenimine. La unión específica del I¹²⁵-ANF a la fracción de membranas, se calculó restando la obtenida en presencia de 10⁻⁶ M de hormona fría de la unión total.

El contenido en ANF de un pool del extracto ácido de cada uno de los tejidos se concentró cromatográficamente a través de las columnas Sep-Pak. Del eluido liofilizado se hicieron diferentes diluciones para su determinación en el radioensayo de receptores.

Resultados

Las concentraciones medidas de ANF-ir en coroides, retina y cuerpo ciliar de conejo se muestran en la tabla I. En retina, los valores son significativamente inferiores a los obtenidos en los otros tejidos. La fig. 1 representa, en escala logit-log, el desplazamiento de la unión del I¹²⁵-ANF[1-28] al anticuerpo anti-ANF producido por diferentes diluciones de los extractos ácidos del pool de coroides, retina

Tabla I. Concentración de ANF-ir en tejido ocular de conejo.

Todos los valores se expresan como media ± EEM, n = 16.

Tejido	(pg/órgano)	(pg/g tejido)	(pg/mg proteína)
Cuerpo ciliar	12,2 ± 4,0	223,1 ± 75,0	11,2 ± 4,1
Coroides	19,1 ± 4,1	444,3 ± 94,2	20,4 ± 6,3
Retina	4,0 ± 1,0	67,5 ± 12,3	6,4 ± 1,3

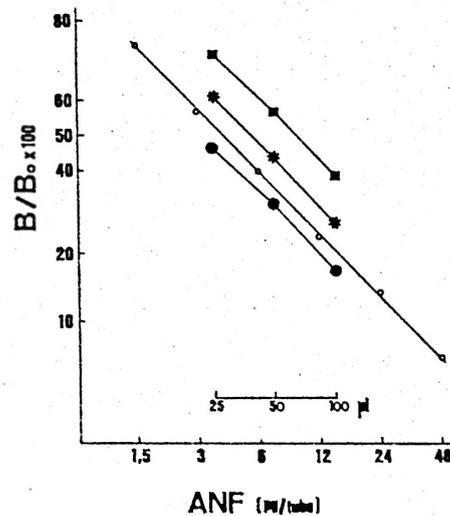


Fig. 1. Representación lineal de la curva de competición del ANF[1-28] por la unión del I¹²⁵-ANF[1-28] al anticuerpo anti-ANF.

Las diluciones de los extractos de coroides (●), retina (■) y cuerpo ciliar (⋄) desplazan la unión de modo paralelo al ANF estándar (○). La escala del interior expresa las diluciones de los extractos.

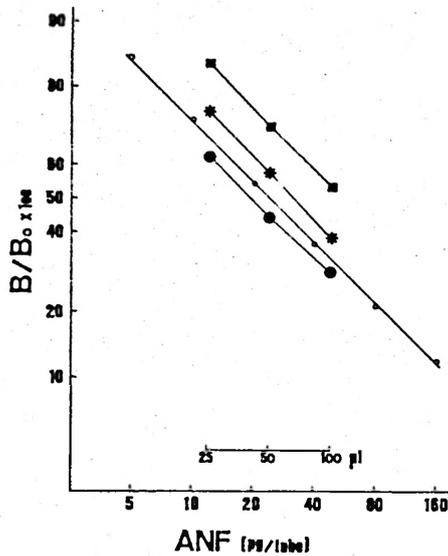


Fig. 2. Representación lineal de la curva de competición del ANF[1-28] por los sitios de unión del I^{125} -ANF[1-28] a la fracción de membranas de retina.

Símbolos como en la figura 1.

y cuerpo ciliar. El acusado paralelismo de las rectas correspondientes a los tejidos, respecto a la recta patrón, expresa que el ANF-ir en estos tejidos es inmunológicamente indistinguible del ANF[1-28] sintético. La fig. 2 representa, en escala log-log, el desplazamiento de la unión del I^{125} -ANF[1-28] a los receptores de membrana de retina producido por diferentes diluciones de los extractos ácidos del pool de coroides, retina y cuerpo ciliar. Se observa para estos tejidos un estrecho paralelismo con la recta de desplazamiento que resulta de la competición del ANF[1-28] sintético por los sitios de unión del I^{125} -ANF[1-28].

Discusión

En este trabajo se demuestra la presencia del ANF-ir en los extractos ácidos de coroides, retina y cuerpo ciliar de conejo.

La existencia de ANF en coroides no se había descrito con anterioridad en ninguna especie animal. Los niveles obtenidos en este tejido son significativamente superiores a los del cuerpo ciliar y la retina. Este dato junto con la existencia de sitios de unión para el ANF en coroides de cerdo (17) evidencian de nuevo tejido diana para este péptido.

STONE y GLEMBOTSKI (18) identificaron la presencia de ANF-ir en la retina de rata (8 ng/g tejido); las concentraciones medidas por nosotros en retina de conejo son de dos órdenes de magnitud inferior, discrepancia que podría explicarse por la diferencia de las especies animales en las que se realizaron ambos estudios. PALM *et al* (16) han revelado, por métodos inmunohistoquímicos, que el ANF se localiza en las capas plexiformes de las retinas de rata y conejo. Por otra parte, se han identificado y caracterizado receptores de ANF de alta afinidad ($K_d = 6 \pm 2$ pM) en retina de rata (8). Todos estos datos sugieren que el ANF podría participar en la fisiología retiniana como neurotransmisor o neuromodulador.

La presencia de ANF-ir en cuerpo ciliar de conejo coincide con la observada en úvea anterior (cuerpo ciliar e iris) de rata (18). En trabajos previos se ha demostrado la existencia de ANF-ir en el humor acuoso de ojos de conejo con presión intraocular normal (10) y su elevación significativa en conejos con glaucoma experimental. Estos resultados y la existencia de receptores específicos de ANF en cuerpo ciliar de cerdo (17) y procesos ciliares (tejido implicado en la regulación de la secreción y drenaje del humor acuoso) de conejo (3), sugieren que el ANF podría jugar un papel fisiológico en la secreción del humor acuoso y, por tanto, en la regulación de la presión intraocular. La demostración del efecto inductor del ANF sobre la acción de la guanilato-ciclasa (transductor de la señal hormonal del ANF al compartimento intracelular) aso-

ciada a membranas de procesos ciliares (14) apoyaría esta hipótesis.

En contraste con el RIA, el radioensayo de receptores es altamente específico para el ANF[1-28], principal forma molecular circulante y biológicamente activa de la hormona, mientras que los fragmentos más cortos e inactivos no reaccionan o apenas lo hacen en un ensayo de receptores (7). Los receptores para ANF de membranas de retina de rata son particularmente útiles, para ensayar la actividad del ANF[1-28] de conejo, ya que este péptido es molecularmente idéntico al de rata (15). Nuestros resultados confirman que el ANF de los tejidos oculares de conejo desplaza al I^{125} -ANF[1-28] de la unión a sus receptores de membrana de retina de rata de forma paralela al ANF[1-28]. También los resultados de STONE y GLEMBOTSKI (18), demuestran por métodos cromatográficos HPSEC y RP-HPLC, que la principal forma molecular del ANF-ir de los tejidos oculares de rata estudiados tenían el mismo peso molecular (3 kDa) que el péptido de 28 aminoácidos.

La demostración de la presencia del ANF-ir en los tejidos oculares por medio del RIA y de métodos inmunohistoquímicos, y de su actividad biológica por medio del radioensayo de receptores, sugieren, pero no afirman, que el ANF se sintetiza en estos tejidos. La aplicación de nuevas técnicas, como la valoración del contenido tisular del ARN-m del ANF y la hibridación *in situ* permitirán confirmar la expresión génica y la síntesis del ANF en estos tejidos.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado en parte con una ayuda financiada por el FISS PM89-0150.

Resumen

Se estudia la presencia del péptido atrial natriurético (ANF) y su posible actividad biológica

en coroides (CR), retina (R) y cuerpo ciliar (CC) de conejo. Los tejidos se homogeneizan en un extracto ácido, purificado y concentrado por cromatografía en fase inversa, usando columnas Sep-Pak C₁₈. El contenido en ANF inmunorreactivo (ANF-ir) del eluido se valora usando un RIA específico. Las concentraciones de ANF-ir medidas en coroides, retina y cuerpo ciliar fueron de 444 ± 94 , 67 ± 12 y 223 ± 75 pg/g tejido (n = 16), respectivamente. La actividad biológica del ANF extraído se evalúa empleando un radioensayo de unión de receptores de membrana de retina. Los resultados demuestran la existencia de ANF biológicamente activo en coroides, retina y cuerpo ciliar de conejo. La presencia del ANF y de sus receptores específicos en los tejidos oculares sugiere que este péptido puede tener un papel fisiológico en la homeostasis hidro-salina ocular.

Palabras clave: ANF, Coroides, Retina, Cuerpo ciliar, Receptores retina.

Bibliografía

1. Ballermann, B. J. y Brenner, B. M.: *J. Clin. Invest.*, 76, 2041-2048, 1985.
2. Bianchi, C., Gutkowska, J., García, R., Thibault, G., Genest, J. y Cantin, M.: *Histochemistry*, 82, 441-452, 1985.
3. Bianchi, C., Anand-Srivastava, M. B., De Lean, A., Gutkowska, J., Furthomme, D., Genest, J. y Cantin, M.: *Curr. Eye Res.*, 5, 283-293, 1986.
4. De Bold, A. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 179, 133-138, 1982.
5. De Bold, A. J. y Flynn, T.: *Life Sci.*, 33, 297-303, 1983.
6. De Bold, A. J.: *Science*, 230, 767-770, 1985.
7. De Léan, A. y Ong, H.: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 110, 23-25, 1988.
8. Fernández-Durango, R., Sánchez, D., Gutkowska, J., Carrier y F. y Fernández-Cruz, A.: *Life Sci.*, 44, 1837-1846, 1989.
9. Fernández-Durango, R., Triviño, A., Ramírez, J. M., García de Lacoba, M., Ramírez, A. I., Salazar, J. J., Fernández-Cruz, A. y Gutkowska, J.: *Vision Res.*, 30, 1305-1310, 1990.
10. García de Lacoba, M., Fernández-Durango, R., Triviño, A., Ramírez, J. M., Salazar, J. J.,

- Ramírez, A. I., Fernández-Cruz, A. y Gutkowska, J.: *Endocrinología*, 37, 127-129, 1990.
11. Gutkowska, J., Bonan, R., Roy, D., Bourassa, M., García, R., Thibault, G., Genest, J. y Cantin, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139, 287-295, 1986.
 12. Gutkowska, J.: *Nucl. Med. Biol.*, 14, 323-331, 1987.
 13. Gutkowska, J. y Nemer, M.: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 110, 25-30, 1988.
 14. Mittag, T. W., Tormay, A., Ortega, M. y Severin, C.: *Curr. Eye Res.*, 6, 1189-1196, 1987.
 15. Oikawa, S., Imai, M., Inuzuka, C., Tawaragi, Y., Nakazato, H. y Matsuo, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 132, 892-899, 1985.
 16. Palm, D. E., Keil, L. C., Sassani, J. W. y Severs, W. B.: *Brain Res.*, 504, 142-144, 1989.
 17. Shinjo, M., Kim, S.-J., Miyazaki, H., Usuki, Y. y Murakami, K.: *Biomedical Res.*, 9, 21-26, 1988.
 18. Stone, R. A. y Glembofski, C. C.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 134, 1022-1028, 1986.
 19. Winquist, R. J., Faison, E. P., Waldman, S. A., Schwartz, K., Murad, F. y Rapaport, R. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7661-7664, 1984.