

Inmunolocalización de la fibronectina, laminina y macrófagos en membranas vitreoretinianas de la retinopatía diabética proliferativa

Fibronectin, laminin and macrophages in proliferative diabetic retinopathy

Ricardo Pedro Casaroli Marano^(1,2,4)
Borja Corcostegui⁽³⁾
Senén Vilaro⁽¹⁾

RESUMEN

La Retinopatía Diabética Proliferativa (RDP) se caracteriza por una proliferación fibrovascular intraocular con la formación de membranas prerretinianas que predisponen a Desprendimientos de Retina (DR) traccionales y hemorragias en el vítreo. Aunque sean considerables los estudios morfológicos acerca de estas membranas, su fisiopatogénesis es apenas conocida. Recientemente se ha descrito la posible participación de factores humorales y de la matriz extracelular en la angiogénesis y en su formación. Con el objetivo de identificar la distribución de algunos de estos posibles factores, hemos realizado un estudio inmunocitoquímico para la detección de la Laminina (LN) y de la Fibronectina (FN), en una serie de 18 membranas fibrovasculares, obtenidas de ojos portadores de RDP y sometidos a vitrectomía. Ambas glucoproteínas presentan una localización vascular; la FN en disposición luminal, y la LN en disposición basal con respecto a las células endoteliales de los capilares. La inmunolocalización también ha confirmado la presencia de macrófagos, sugiriendo que el proceso proliferativo intraocular puede ser considerado como una forma modificada de formación cicatricial.

Palabras clave: Retinopatía Diabética Proliferativa, Desprendimiento de retina, Fibronectina, Laminina, Macrófagos, Inmunocitoquímica.

INTRODUCCIÓN

El edema macular y la formación de Membranas Vitreoretinianas (MVR), son las causas principales de la disminución visual en los pacientes portadores de Retinopatía Diabética Proliferativa (RDP).

Numerosos estudios citomorfológicos⁽¹⁻⁴⁾, han evidenciado que estas membranas fibrovasculares tienen como constituyentes, diversos tipos

celulares⁽⁴⁾ pero característicamente poseen un componente colagénico altamente denso^(2,4). Su mecanismo de patogénesis es distinto del observado al Vitreoretinopatía Proliferativa tras el Desprendimiento de Retina (DR) regmatógeno, pero al igual que este último, apenas conocido. Estudios recientes⁽⁵⁾, evidencian el importante papel de una alteración precoz de la barrera hemato-retinal en el desencadenamiento de la enfermedad prolife-

- (1) Unidad de Biología Celular (DBF) de la Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona (Prof. M. DURFORT).
- (2) Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona (Prof. J. DOMINGO).
- (3) Departamento de Oftalmología del C.S. Valle Hebrón. Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona.
- (4) Instituto Barraquer. Universidad Autónoma de Barcelona.

Endereço para correspondência:

Ricardo Pedro CASAROLI MARANO - Unidad de Biología Celular (DBF) - Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona - Avda. Diagonal 645, Barcelona (08028) - ESPAÑA.

rativa; así mismo un mecanismo inmunopatogénico podría estar involucrado en el desarrollo de la microangiopatía⁽⁶⁾.

La Laminina (LN) y la Fibronectina (FN), son las principales glucoproteínas de la matriz extracelular caracterizadas por su multifuncionalidad, de entre las cuales destacaríamos la adhesión de ciertos tipos celulares con el medio extracelular, la adhesión de las células entre sí, y el promover señales para la proliferación celular^(7,8). Hemos realizado un estudio inmunocitoquímico con el objeto de identificar y establecer el patrón de distribución de ambas glucoproteínas, en MVR obtenidas de pacientes portadores de RDP, sometidos a vitrectomía. Su implicación en la neoformación vascular y su posible relación con la activación macrofágica también han sido consideradas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos obtenido 18 MVR de pacientes portadores de RDP sometidos a vitrectomía por vía pars plana. Los especímenes fueron fijados en una solución de paraformaldehído al 3% y glutaraldehído al 0,06% en tampón fosfato 0,1M. pH 7,4 (PBS 0,1M.), lavados sucesivamente con PBS 0,1M. a 4°C. y crioprotectados con una solución de sacarosa 2,1M. Ocho especímenes fueron incluidos en OCT (Miles Lab. Inc., IL, USA), para ser congelados en nitrógeno líquido y conservados a -35°C. Se obtuvieron secciones de 6µm. -9µm. por microtomía de congelación (Frigocut 2800 E, Reichert-Jung, W. Germany), que se recogieron en portaobjetos gelatinados. Otros diez especímenes fueron preparados para secciones semifinas de 0,25µm. -0,40µm. a -70°C. por ultracriomicrotomía (Ultracut FC4D, Reichert-Jung, W. Germany) que también se recogieron en portaobjetos gelatinados.

Para la inmunolocalización se ha utilizado un suero anti-FN humana (Dakopatts, Denmark) a una dilución de 1:200, un suero anti-LN murina (Dr. C. ENRICH et al., Fac. Medicina, Universidad de Barcelona.) a una dilución de 1:50, ambos producidos en conejos, y un anticuerpo monoclonal anti-macrófago (Boheringer, FRG) a una dilución de 1:50. Como anticuerpos secundarios se han empleado IgG de cabra conjugadas con fluoresceína isotiocianato (FITC) (Boheringer, FRG) contra conejo y contra ratón, ambas a dilución de 1:25; una IgG de cabra anti-conejo (Sternberg-Meyer, MD, USA) a una dilución de 1:50 y un complejo peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) en conejo (Sternberg-Meyer, MD, USA), empleado a 1:150. Las diluciones fueron preparadas en una solución de PBS-glicina 0,1M. - ovoalbumina 1%. Hemos utilizado un suero preinmune de conejo (Sera-Lab, Sussex, England) en las mismas diluciones que los anticuerpos primarios para las muestras controles.

Inmunofluorescencia

Para los cortes obtenidos por congelación, tras hidratación (Triton X100 0,1%-glicina 0,1M. en PBS) y permeabilización (Triton X100 0,5%-glicina 0,1M. en PBS), se procedió al bloqueo (PBS-glicina 0,1%-ovoalbumina 1%) en cámara húmeda a temperatura ambiente. Para los cortes por ultracriomicrotomía, efectuamos lavados repetidos (PBS-Glicina 0,1M.) para iniciar directamente el bloqueo. La incubación con el primer anticuerpo específico fue de 2 horas y con el segundo (IgG-FITC) de 1 hora en oscuridad. Los lavados tanto del primer como del segundo anticuerpo, se realizaron con la solución de hidratación para las muestras por congelación, y con la solución de lavado (PBS-glicina 0,1%) para los cortes por ultracriomicrotomía. Los portaobjetos fueron entonces preparados con un medio de montaje de N-propil galeato

para inmunofluorescencia y la observación de los especímenes ha sido realizada con microscopía de epifluorescencia (Polyvar II, Reichert-Jung, W. Germany).

Peroxidasa Anti-peroxidasa

Esta técnica solamente la hemos utilizado con los especímenes obtenidos por congelación, habiendo efectuado la hidratación, permeabilización y bloqueo, tal como se ha descrito anteriormente. El primer anticuerpo se incubó en cámara húmeda a 4°C. por toda la noche. El segundo anticuerpo (IgG de cabra anti-conejo), se incubó durante 3 horas en cámara húmeda y temperatura ambiente. El complejo PAP (peroxidasa anti-peroxidasa en conejo), se incubó durante 2 horas. Los lavados se realizaron con la solución de hidratación. Para la detección del marcado, hemos empleado una solución de diaminobenzidina (DAB) (DAB 0,03%-H₂O₂ 0,01% en Tris-HCl 0,1M. pH 7,6), controlando el desarrollo de la reacción al microscopio. Tras deshidratación alcohólica progresiva, las muestras se montaron en medio D.P.X. se han obtenido imágenes por microscopía óptica de campo claro, campo oscuro, y contraste interferencial (Polyvar II, Reichert-Jung, W. Germany).

RESULTADOS

En una primera fase de este estudio y con el objeto de caracterizar histológicamente las 18 MVR examinadas, se realizó un examen histopatológico con tinción convencional de hematoxilina-eosina. Se ha observado la presencia de una cantidad variable de tejido fibroso vascularizado, conteniendo numerosas células aisladas o agrupadas en nidos. Estas membranas ricas en vasos vascularizados, mostraron una matriz extracelular moderada o abundante con variados tipos celulares fusiformes, algunas células de características plasmáticas y otras tan-

*Inmunolocalización de la fibronectina,
laminina y macrófagos en membranas vitreoretinianas
de la retinopatía diabética proliferativa*

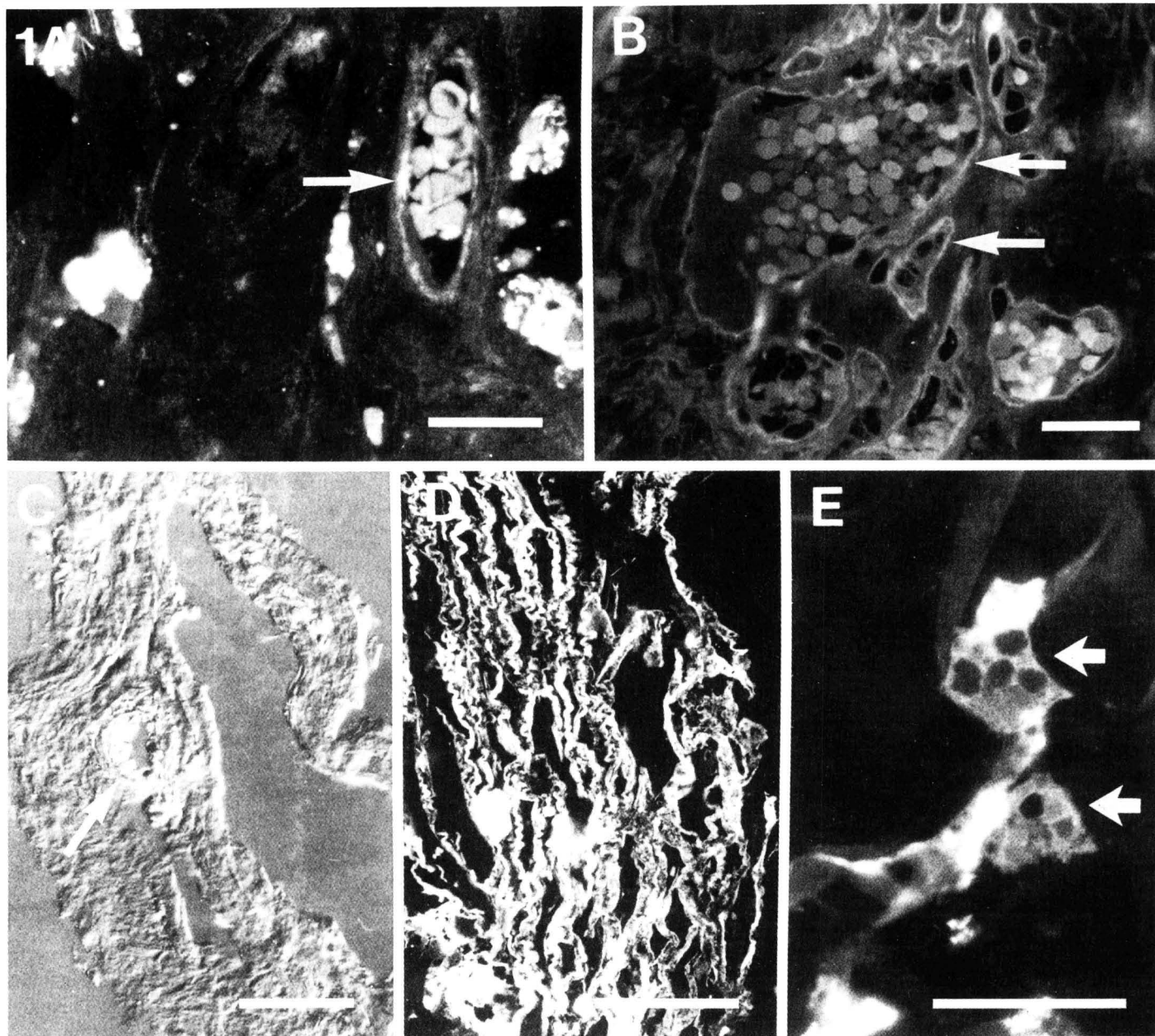


Figura 1: Inmunofluorescencia indirecta con FITC en membranas vitreoretinianas de la retinopatía diabética proliferativa. Figura 1A: Presencia de la Fibronectina en la cara luminal del endotelio capilar (flecha)(X910). Figura 1B: Inmunolocalización de la Laminina en la cara basal del endotelio capilar (flechas)(X730). Figura 1C: Nótese que el capilar (flecha) esta rodeado por denso tejido conjuntivo fibroso (contraste interferencial, X360). Figura 1D: Detección de la Fibronectina bajo forma fibrilar difusamente distribuida en el tejido extracelular (X445). Figura 1E: Obsérvese la presencia de macrófagos dispuestos en nidos (X1480). Figuras 1A, 1B y 1E (bar.=20µm.). Figuras 1C y 1D: (bar.=50µm.).

tas, rodeadas de abundante pigmento. Algunos especímenes presentaron rica matriz extracelular, ausencia de vasos y pobre población celular.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta con FITC ha puesto de mani-

fiesto la presencia de ambas glucoproteínas en la mayoría de los capilares constituyentes de las MVR. La FN, ha resultado marcadamente evidente en las paredes vasculares y sobre todo en su cara luminal (Fig. 1A). Por otro

lado, LN se detecta mayoritariamente en las paredes vasculares externas correspondientes a la cara basal de la células endoteliales (Fig. 1B). El estudio inmunocitoquímico con la tinción de la peroxidasa anti-peroxidasa

(PAP), puso de manifiesto ambas glucoproteínas en relación estrecha con los elementos vasculares, pero no ha sido idúnea para la exacta localización, respectivamente. Se añade el hecho de que en MVR ricamente pigmentadas, los precipitados de color marrón típicos del revelado con la diaminobenzidina empleada en esta técnica, se confunden con el pigmento y dificultan la interpretación de los resultados.

El estudio estructural de las MVR con utilización de microscopía con contraste interferencial, evidencia que los elementos vasculares de estas membranas se hallan asociados por su cara basal, a una matriz extracelular que los adhiere firmemente al tejido conjuntivo, y este a las células adyacentes (Fig. 1C). El patrón fibrilar de distribución de la FN ha sido evidente en la matriz extracelular. Su distribución no ha sido observada difusamente por todo el tejido conjuntivo, sin embargo se ha visto bajo una forma localizada, coincidente con la disposición de las fibras de colágeno (Fig. 1D). La LN, parece constituir un elemento minoritario en el medio extracelular. Su presencia, bajo una forma fibrilar fina y localizada, se ha demostrado en algunas muestras.

En relación a la inmunolocalización de macrófagos en las MVR, esta ha sido positiva en 45% de las membranas examinadas. Su disposición en nidos celulares dispersos en la matriz extracelular y su estrecha relación con el pigmento del tejido conjuntivo, fueron evidentes (Fig. 1E).

DISCUSIÓN

La capacidad de ciertos tipos celulares en adherirse a la matriz extracelular, es fundamental para una serie de fenómenos que incluyen el establecimiento y mantenimiento de la integridad tisular, la reparación cicatrizal, los movimientos morfogénicos, la migración celular, la diferenciación, y

los eventos que caracterizan las metástasis de determinados cánceres⁽⁹⁾. Estudios ultraestructurales^(1,3,4) de MVR de pacientes portadores de RDP, han demostrado una población celular variable exhibiendo una diversidad de apariencia morfológica, distribuidas en una densa red colagénica extracelular. Esta densa red extracelular, elaborada por uno o más tipos de células durante el periodo precoz de membranogénesis, podría ser utilizada para la migración celular en periodos más tardíos de evolución, fenómeno facilitado por la presencia de la FN y de la LN, glucoproteínas que de entre sus múltiples funciones, cabe destacar la migración y la adhesión de las células entre si y de estas con su sustrato^(7,10). La identificación del patrón de distribución de ambas glucoproteínas, que han sido evidenciadas en nuestro estudio, podría corroborar el importante papel, principalmente de la FN, mayoritariamente encontrada en el tejido conjuntivo con relación a la LN, en los fenómenos de migración celular que caracterizan el proceso proliferativo intraocular.

El hecho de que el proceso proliferativo intraocular pueda ser considerado como una forma modificada de formación cicatrizal, no es reciente⁽¹¹⁾. Estudios anteriores⁽¹²⁾ evidenciaron que tras la eliminación experimental de los macrófagos de un tejido en cicatrización, se observan dos consecuencias de importancia en el proceso cicatrizal: la imposibilidad del desbridamiento de la herida con ausencia de formación de tejido de granulación, y la atenuación de la transformación fibrosa tisular con una disminución en su intensidad de respuesta. El examen histológico convencional realizado en este estudio se ha caracterizado por la evidencia de un abundante tejido conjuntivo fibrovascular, como testigo de la traducción anatomopatológica del proceso diabético intraocular. La presencia de macrófagos en las MVR, corrobora sus acciones anteriormente

descritas en este probable microproceso cicatricial vitreoretiniano. Su origen podría ser sanguíneo, a partir de una hemorragia en el vítreo frecuentemente observada en la RDP, o podría tratarse de formas modificadas de células del epitelio pigmentado de la retina que metaplasticamente, puedan adquirir función fagocítica⁽¹³⁾. Esta hipótesis creemos es poco probable en nuestro estudio, ya que hemos utilizado una IgG de alta afinidad anti-macrófagos para su identificación. Con relación a la actividad fagocitaria, es esencial recalcar no obstante, la importancia de la FN en la adhesión y en la migración celular; ella es capaz de catalizar la fagocitosis monocítica dependiente o independientemente del complemento C₃ para su activación⁽⁷⁾. Ambos elementos FN y macrófagos, evidenciados en este estudio, así como conocidos fenómenos fisiopatológicos ya mencionados, se encontrarían implicados en la proliferación fibrovascular de la RDP.

La distribución de la FN y de la LN en los capilares de las MVR, constituye un hallazgo de importancia en este estudio. Marshal et al.⁽¹⁴⁾, utilizando técnicas inmunocitoquímicas para microscopía electrónica, ha demostrado que los capilares retinianos de ojos humanos, poseen identificación positiva para el colágeno de tipo IV, y en menor evidencia para los de tipo I y V. La identificación ha sido evidente en la membrana basal de las células endoteliales y todavía más evidente en la región intramural de los procesos periciticos. La localización vascular de la LN, netamente en su cara basal, corrobora nuestras investigaciones, pues ya es sabido de la estrecha relación de esta glucoproteína en la adhesión de ciertos tipos celulares con fibras colagénicas del tipo IV⁽⁸⁾. Más interesantes todavía son los estudios realizados por Roberts y Forrester⁽¹⁵⁾, enfatizando que cambios en los componentes de la matriz extracelular pueden llevar a profundas modifica-

ciones en el comportamiento de las células endoteliales y en la neoangiogénesis: como por ejemplo, la inhibición de la migración y la proliferación de las células endoteliales de los vasos retinianos "in vitro", por la presencia del colágeno tipo IV. De entre las muchas funciones de la LN, la de estimular la proliferación y la diferenciación celular, también es bastante conocida⁽⁸⁾.

La localización vascular de la FN, se ha demostrado principalmente en la cara luminal del endotelio capilar. Se ha descrito recientemente, que la FN actúa como un potente activador de las células endoteliales en cultivo, aumentando el pH intracelular, potenciando las señales para el crecimiento celular y conllevando a los fenómenos desencadenantes de la angiogénesis⁽¹⁶⁾. En consecuencia la evidencia de la FN y de la LN en los microcapilares y en capilares ya constituidos, podría representar una participación importante en la angiogénesis de la proliferación en la retinopatía diabética.

En conclusión en el presente estudio, por medio de técnicas de inmunocitoquímica hemos determinado el patrón de distribución de la LN, y de la FN, así como la presencia de macrófagos en las MVR de pacientes portadores de una RDP. La estrecha relación de ambas glucoproteínas con los elementos vasculares y su localización en el tejido conjuntivo, nos sugiere un posible papel predominante en la migración celular y en la estabilización del proceso proliferativo por medio de la activación macrofágica. La disposición de la FN en la cara luminal de las células endoteliales, nos llevaría a considerar una posible captación de la FN a partir del plasma, funcionando como estimuladora de la proliferación de las células endoteliales. Serán necesarios estudios pos-

teriores para determinar los mecanismos de adhesión de ambas glucoproteínas en las paredes capilares.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Srta. Ana RIVERA (Universidad de Barcelona) y al Dr. Carlos Javier NEBREDÁ (Instituto Barraquer, Barcelona), por su valiosa colaboración. Al " Servei Científico-Tècnic de la Universidad de Barcelona" sin el cual este estudio no sería posible.

ABSTRACT

Proliferative diabetic retinopathy (PDR) is characterized by intraocular fibrovascular proliferation with preretinal membranes formation and subsequent tractional retinal detachment (RD) and vitreous bleeding. Although a considerable number of morphological studies have been carried out, its pathogenesis is poorly understood. Recently, humoral factors and extracellular matrix have been found implicated in angiogenesis and its formation. We performed a immunocytochemical study on 18 fibrovascular membranes obtained by vitrectomy in diabetics eyes to identify Laminin (LN) and Fibronectin (FN). Both glycoproteins present a vascular localization; FN in a luminal disposition, and LN in a basal distribution pattern respect to the capillar endothelial cells. Macrophages have also been detected, suggesting that intraocular proliferative process may be considered a modified kind of wound repair.

Key words: Proliferative diabetic retinopathy, Retinal detachment, Fibronectin, Laminin, Macrophages, immunocytochemistry.

BIBLIOGRAFIA

1. WALLOW I.H.L. and GELDNER P.S. (1980): Endothelial fenestrae in proliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 19: 1176.
2. WALLOW I.H.L., GREASER M.L., STEVENS T.S. (1981): Actin filaments in diabetic fibrovascular preretinal membranes. *Arch. Ophthalmol.* 99: 2175.
3. MILLER H., MILLER B., ZONIS S., et als. (1984): Diabetic neovascularization: Permeability and ultrastructure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25: 1338.
4. HAMILTON C.W., CHANDLER D., KLINTWORTH G.K., et als. (1982): A transmission and scanning electron microscopic study of surgically excised preretinal membrane proliferations in diabetes mellitus. *Am.J.Ophthalmol.* 94: 473.
5. CUNHA-VAZ J., FARIA de ABREU J.R., CAMPOS A.J. (1979): Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br.J. Ophthalmol.* 59: 649.
6. RAHI A.H.S. and ADDISON D.J. (1983): Autoimmunity and the outer retina. *Trans. Ophthalmol.Soc.U.K.* 103: 428.
7. AKIYAMA S.K. and YAMADA K.M. (1987): Fibronectin. *Adv.Enzymol.* 59: 1.
8. TERRANOVA V.P., ROHRBACH D.H., MARTIN G.R. (1980): Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell* 22: 719.
9. BUCK C.A. and HORWITZ A.F. (1987): Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Ann.Rev.Cell Biol.* 3: 179.
10. KLEINMAN H.K., ROHRBACH D.H., TERRANOVA V.P. et al. (1982): Collagenous matrices as determinants of cell function. In: Furthmayr H. Edtr., *Immunocytochemistry of the Extracellular Matrix*, 2nd. Edt., Boca Raton, Fla, CRC press, 1982, Chap.6.
11. GLOOR B.P. and DAICKER B.C. (1975): Pathology of the vitreoretinal border structure. *Trans. Ophthalmol.Soc.U.K.* 95: 387.
12. LEIBOVICH S.J. and ROSS R. (1975): The role of the macrophage in wound repair. *Am.J. Pathol.* 78: 71.
13. MACHEMER R. and LAQUA H. (1975): Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (massive preretinal proliferation). *Am.J. Ophthalmol.* 80: 1.
14. MARSHAL G.E., KONSTAS A.G., LEE W.R. (1990): Ultrastructural distribution of collagen types I-IV in aging human retinal vessels. *Br.J.Ophthalmol.* 74: 228.
15. ROBERTS J.M. and FORRESTER J.V. (1990): Factors affecting migration and growth of endothelial cells from microvessels in the bovine retina. *Exp.Eye Res.* 50: 165.
16. INGBER D.E., PRUSTY D., FRANGIONE J.V. et al. (1990): Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. *J.Cell Biol.* 110: 1803.