

Universidad Austral
Facultad de Ciencias Biomédicas

Neuromediadores
en la
Proliferación Vitreoretinal

María Valeria Cantó Soler
Tesis Doctoral

Pilar, Argentina 2002

**NEUROMEDIADORES EN LA PROLIFERACIÓN
VITREORETINAL**

María Valeria Cantó Soler

Directora de Tesis: Dra. Ángela María Suburo

Facultad de Ciencias Biomédicas

Universidad Austral

Pilar, Argentina 2002

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial a la Dra. Ángela María Suburo, por su constante apoyo, su estímulo y todo lo que me ha brindado mas allá del terreno científico.

Al Dr. Ricardo Dodds, por sus enseñanzas sobre el diagnóstico y la cirugía de la PVR, por las interesantes conversaciones que mantuvimos y por compartir conmigo su pasión por el estudio de esta enfermedad.

A Silvina Ruffolo, por su amistad y su invaluable asistencia en las técnicas inmunohistoquímicas.

A Germán Ruffolo, por su excelente trabajo fotográfico y su generosa disponibilidad.

A Ana Vanesa Torbidoni por tantas cosas compartidas.

A los demás miembros del laboratorio, Dr. Marcelo Villar, Dr. Juan Gallo, Dra. Cristina Defagot, Dra. Beatriz Settembrini, Florencia Coronel, Pablo Brumovsky, Jorge Aquino y Matías Mousou porque nunca me faltó su apoyo.

A la Lic. Carla Raghianti, por estar cada vez que hizo falta. Además, junto con la Lic. Liliana Diaz de Cots, por el excelente trabajo para conseguir la bibliografía.

A los Dres. Martín O'Flaherty y Gustavo Amestoy por su asesoramiento en los análisis estadísticos.

Al Dr. Ruben Adler, por su importante ayuda y estímulo para completar los trabajos experimentales.

A Rodrigo Bagnatti y Luis Lehmann por su desinteresada colaboración.

A la Lic. Mercedes Rojas, por su especial contribución.

A las Autoridades de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral, por todo el apoyo que me brindaron.

A todos aquellos que, estando cerca o desde la distancia, me acompañaron a lo largo de estos cuatro años.

Finalmente y de manera muy especial, a mi familia, a quien tengo tanto que agradecer que sería imposible de precisar.

Mi agradecimiento también a:

CONICET, por haberme otorgado la Beca de Formación Interna de Postgrado que me permitió realizar esta Tesis.

Al Ministerio de Salud de la Nación, a la Fundación Pérez Comanc, a la Fundación Roemmers y a la Universidad Austral por el apoyo otorgado a este proyecto.

Los resultados presentados en el Capítulo III serán publicados en

"The Y1 receptor of Neuropeptide Y as a glial marker in proliferative vitreoretinopathy and diseased human retina"

Cantó Soler M.V., Gallo J.E., Dodds R.A., Hökfelt T., Villar M.J., Suburo A.M.
GLIA, 2002

Parte de los resultados presentados en el Capítulo IV recibieron el

"Premio Mérito Científico"

otorgado por un jurado internacional durante el transcurso del
XVI Congreso Argentino de Oftalmología

Buenos Aires, Junio de 1999.

Los resultados presentados en el Capítulo V serán publicados en

"A Mouse Model of Proliferative Vitreoretinopathy induced by dispase".

Cantó Soler M.V., Gallo J.E., Dodds R.A., Suburo A.M.
Experimental Eye Research, 2002.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	4
LA PROLIFERACIÓN VITREORETINAL	4
UNA APROXIMACIÓN HISTÓRICA	4
MANIFESTACIONES CLÍNICAS	6
COMPONENTES CELULARES DE LAS MEMBRANAS	9
MODELOS EXPERIMENTALES	11
NEUROMEDIADORES POTENCIALMENTE INVOLUCRADOS	12
IMPORTANCIA DEL TEMA PROPUESTO	13
OBJETIVOS	15
CAPÍTULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	16
MATERIALES	16
PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	17
ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS MUESTRAS	18
APÉNDICE	22
DESCRIPCIÓN DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS.....	22
CAPÍTULO III	
EL RECEPTOR Y1 DEL NEUROPÉPTIDO Y EN LA PROLIFERACIÓN	
VITREORETINAL HUMANA	
INTRODUCCIÓN	26
MATERIALES Y MÉTODOS	28
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	36

CAPÍTULO IV

SINTASAS DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA PROLIFERACIÓN VITREORETINAL HUMANA Y EXPERIMENTAL

.....	39
INTRODUCCIÓN	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41
RESULTADOS	44
DISCUSIÓN	54

CAPÍTULO V

EFFECTOS DE LA DISPASA INTRAVÍTREA EN EL RATÓN:

UN NUEVO MODELO DE PROLIFERACIÓN VITREORETINAL	58
INTRODUCCIÓN	58
MATERIALES Y MÉTODOS	59
RESULTADOS	63
DISCUSIÓN	76

CAPÍTULO VI

ÓXIDO NÍTRICO Y EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA	81
INTRODUCCIÓN	81
MATERIALES Y MÉTODOS	83
RESULTADOS	86
DISCUSIÓN	94

CONCLUSIONES	99
---------------------------	-----------

REFERENCIAS	102
--------------------------	------------

RESUMEN

La proliferación vitreoretinal (PVR) es una patología ocular cuyo escenario más común es un desprendimiento de retina no tratado o una intervención quirúrgica por una causa similar. Esta enfermedad se caracteriza por el desarrollo de membranas celulares en la cavidad vítrea y/o sobre ambas superficies de la retina. Algunos estudios realizados en pacientes con diversas retinopatías, incluida la PVR, han sugerido la participación de diversos neuromedadores en el desarrollo de estas enfermedades.

Inicialmente, se estudió la expresión inmunohistoquímica del receptor Y1 del neuropéptido Y y las enzimas que sintetizan óxido nítrico (NO) en muestras quirúrgicas de pacientes con diagnóstico de PVR. La expresión de las sintasas de NO fue además estudiada en un modelo de PVR inducido en conejo. Estos estudios demostraron que el receptor Y1 y las sintasas de NO se expresan en las células de Müller de la retina lesionada por PVR y en células de las membranas. En estas últimas, la expresión del receptor Y1 estuvo restringida a células derivadas de la glia, mientras que las sintasas de NO fueron detectadas tanto en estas células como en miofibroblastos. Los resultados obtenidos plantearon la necesidad de un modelo experimental que simulara las etapas iniciales de la enfermedad.

Se desarrolló un modelo de PVR con la inyección de dispasa en la cavidad vítrea de ratones pigmentados C57BL/6J. El análisis de este modelo demostró que la dispasa es capaz de inducir de manera reproducible en el ratón, una condición similar a la PVR desde sus primeras fases. Los resultados sugirieron que este efecto podría ser mediado por la ruptura de la barrera hemo-retiniana formada por el epitelio pigmentario de la retina (EPR), y que uno de los eventos más tempranos sería la aparición de microdesprendimientos retinales.

En consecuencia, se desarrolló un modelo *in vitro* para analizar los efectos del NO sobre el EPR en una condición asimilable a un desprendimiento. El modelo consistió en la obtención de explantos de EPR-corooides-esclera de ratones pigmentados C57BL/6J y albinos BALB-c. Durante el desarrollo de este modelo se observó que las fuerzas que mantienen unida a la retina con el EPR dependen de al menos tres factores: tiempo de adaptación a la oscuridad, ritmo circadiano y pigmentación. Para analizar los efectos de NO sobre el EPR, los explantos fueron incubados en medio de cultivo con y sin el agregado de un dador de NO, o en presencia de un inhibidor de su síntesis. Los resultados obtenidos demuestran que el NO podría regular la permeabilidad de la barrera hemato-ocular formada por el EPR y que el modelo de explantos diseñado es una buena herramienta para estudiar las bases celulares de este fenómeno.

Los resultados presentados en esta Tesis demuestran que el receptor Y1 del neuropéptido Y y el óxido nítrico participarían en procesos celulares inherentes al desarrollo de la PVR, probablemente desde las primeras etapas de esta enfermedad.

ABREVIATURAS

AP	fosfatasa alcalina
DES	desmina
EPR	epitelio pigmentario de la retina
GFAP	proteína glial fibrilar ácida
GS	glutamino sintetasa
Ig-AP	inmunoglobulina unida a un polímero marcado con fosfatasa alcalina
L-NAME	N(omega)-nitro-L-arginina metil éster
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	óxido nítrico
NOS	sintasa de óxido nítrico
NOSe	sintasa de óxido nítrico endotelial
NOSi	sintasa de óxido nítrico inducible
NOSm	sintasa de óxido nítrico mitocondrial
NOSn	sintasa de óxido nítrico neuronal
NPS	nitroprusiato sódico
NPY	neuropéptido Y
PB	buffer fosfato
PBS	solución salina buffereada con fosfato
PDGF	factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PRP	plasma rico en plaquetas
PVR	proliferación vitreoretinal
VIM	vimentina
Y1	receptor Y1 del neuropéptido Y

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

LA PROLIFERACIÓN VITREORETINAL

La proliferación vitreoretinal (PVR) es una patología ocular cuyo escenario más común es un desprendimiento de retina no tratado o una intervención quirúrgica por una causa similar. Ocasionalmente también puede ocurrir como consecuencia de una herida penetrante o un proceso inflamatorio con compromiso de la parte posterior del ojo. Esta enfermedad se caracteriza por el desarrollo de membranas celulares en la cavidad vítrea y/o sobre ambas superficies de la retina, que a su vez pueden contraerse y provocar nuevos desprendimientos, de causa claramente traccional (Campochiaro, 2001; Thompson, 2001).

UNA APROXIMACIÓN HISTÓRICA

Esto explica por qué la historia médica de la PVR está estrechamente relacionada con la del desprendimiento. Charles de Saint-Yves (1667-1733), oftalmólogo francés reconocido por sus aportes a la cirugía de cataratas, el uso de nitrato de plata en la conjuntivitis gonorreica y la descripción clínica de la ceguera producida por la luz solar, fue además el primero en describir un desprendimiento de retina en un ojo humano. Sin embargo, la primera relación clínica de esta enfermedad la debemos a Georg Joseph Beer (1763-1821), quien la observó en 1817 aún sin los beneficios de un oftalmoscopio (Hilton y col., 1995). La invención de este instrumento en 1851 significó un gran avance en el diagnóstico y descripción de los desprendimientos, y también permitió detectar la presencia de agujeros y desgarros en la retina. Pronto se comprendió la importancia de estos agujeros retinales en la patogenia

de los desprendimientos, pero a pesar de los numerosos tratamientos propuestos, todos resultaron infructuosos hasta la segunda década del siglo XX. Hacia 1920, Jules Gonin (1870-1935) retomó la "ignipunctura", originalmente propuesta por Deutschmann en 1889. Este procedimiento, basado en la cauterización de la esclera en las zonas de los desgarros retinales para sellar los bordes de la retina y cerrar los agujeros, permitió la curación de un 15 al 30 % de los pacientes tratados, dependiendo del tiempo transcurrido desde el desprendimiento (Hilton y col., 1995). En las décadas siguientes, el uso de la diatermia, la foto- y la criocoagulación para cerrar los agujeros retinales, muchas veces utilizadas en combinación con nuevas metodologías quirúrgicas como indentación escleral, retinopexia neumática y vitrectomía, permitieron alcanzar mayores proporciones de curación (Hilton y col., 1995; Thompson, 2001).

La principal causa de fracaso de estas intervenciones quirúrgicas era la aparición de crecimientos fibrosos en la cámara posterior, que concluían con un desprendimiento total de la retina, y que fueron conocidos como "retracción masiva del vítreo" o "retracción preretinal masiva" (Tolentino y col., 1967). Estas denominaciones describían la contracción patológica del vítreo y los pliegues fijos de la retina afectada, respectivamente (Machemer, 1988). El auge del tratamiento quirúrgico de los desprendimientos fue seguido por una mayor frecuencia de complicaciones de este tipo, despertándose un notable interés por conocer los mecanismos etiopatogénicos de estas complicaciones. A modo de ejemplo, podemos decir que mientras entre los años 1966 y 1974 apenas se publicaron 6 trabajos sobre este tema, el número de trabajos publicados en 1975 llegó a 13. Fue en ese año cuando Robert Machemer y Horst Laqua comunicaron la aparición de una enfermedad semejante en monos que habían sufrido un desprendimiento de retina experimental (Machemer y Laqua, 1975). Esto originó una serie de trabajos que demostraron la importancia de la proliferación celular y la

formación de membranas sobre todas las superficies accesibles en la cámara posterior del ojo (Machemer y Laqua, 1975; Laqua y Machemer, 1975a; Laqua y Machemer, 1975b). Estos autores propusieron entonces la denominación "proliferación masiva periretinal". A medida que aumentó el caudal de información se hizo necesario unificar criterios tanto en lo referente a la denominación de la patología como a su descripción y clasificación. En 1983, "The Retina Society Terminology Committee" propuso el término "Proliferación vitreoretinal" (PVR) para reemplazar a los previamente utilizados y la caracterizó por el desarrollo de membranas en ambas superficies de la retina desprendida y en la cara posterior del vítreo (The Retina Society, 1983).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las primeras manifestaciones clínicas de una PVR consisten en la presencia de delicados puntos o grumos amarrados en la cavidad vítrea o sobre la superficie interna de la retina, que pueden estar acompañados por aspecto turbio del humor vítreo (The Retina Society, 1983; Machemer y col., 1991). El primer signo mencionado también se describe como "*tobacco dust*" por su semejanza con un espolvoreado de tabaco (Machemer, 1978), y reflejaría la presencia de células con pigmento que, después de migrar hacia la cavidad del vítreo, proliferan y se organizan en acúmulos (Machemer y col., 1991). Esta interpretación se basa en datos experimentales que muestran la migración y proliferación de células con pigmento pocas horas después de aparecido el desprendimiento (Machemer y Laqua, 1975). La turbidez del vítreo podría reflejar la ruptura de la barrera hemato-ocular, que ha sido propuesta como uno de los factores estimulantes de la PVR (Campochiaro y col., 1986; Ando y col., 1994). La rápida detección de estas primeras manifestaciones podría ser de gran importancia para el tratamiento del paciente, pero ésto enfrenta dos serias dificultades. La primera es que, estos signos no suelen ser acompañados por sintomatología importante, y no siempre

generan una consulta oftalmológica. La segunda es que no se cuenta con un tratamiento eficaz, capaz de evitar el progreso de la enfermedad hacia sus etapas más avanzadas.

El siguiente paso en el curso de la enfermedad consiste en la aparición de pliegues en la superficie interna de la retina, y tortuosidad de los vasos retinales. Se asume que estas alteraciones son provocadas por membranas epiretinales muy delgadas que traccionan la superficie interna de la retina, aceptándose que estas membranas no son visibles con oftalmoscopia indirecta (The Retina Society, 1983; Machemer y col., 1991). Estas lesiones pueden ser acompañadas por la aparición de bandas de color amarillo blanquecino por debajo del plano retinal que corresponderían a membranas de localización subretinal (Laqua y Machemer, 1975b).

En los estadios más avanzados, se observan zonas de retina engrosada y de color amarillento. Estos signos fundoscópicos han sido atribuidos a la presencia de pliegues retinales fijos que abarcan todo el espesor de la retina y que serían provocados por la contracción de membranas epiretinales o subretinales más extensas (Machemer, 1978). En los casos más graves estos pliegues están presentes en los cuatro cuadrantes y pueden provocar el desprendimiento completo de la retina. En el fondo de ojo, la retina finalmente aparece como un gran pliegue estrellado con el aspecto de un embudo (Laqua y Machemer, 1975b; The Retina Society, 1983; Machemer y col., 1991).

Los signos clínicos descritos constituyen la base de los tres sistemas de clasificación actualmente utilizados para evaluar la severidad de la PVR. La primera clasificación ampliamente aceptada fue la propuesta por "The Retina Society Terminology Committee" en 1983 (Tabla I.1), después de un detenido análisis de las clasificaciones previamente publicadas. En 1989, "The Silicone Study Group", que intentaba estandarizar la descripción de la PVR para un estudio multicéntrico, propuso una ampliación de la clasificación anterior (Lean y col., 1989). Un tercer sistema de

clasificación, basado en los dos anteriores, enfatiza la localización, extensión y tipo de contracción observada (Machemer y col., 1991). Las dos últimas clasificaciones resultan de gran utilidad para evaluar las etapas finales de esta enfermedad, pero no agregan criterios útiles para discriminar entre los posibles factores importantes para su etiopatogenia.

Tabla I.1. Clasificación del Desprendimiento de Retina con Proliferación Vitreoretinal propuesta por "The Retina Society Terminology Committee (1983)

Grado	Denominación	Signos Clínicos
A	Mínimo	turbidez vítrea, acúmulos de pigmento intravítreo
B	Moderado	rugosidad de la superficie interna de la retina, agujero retinal con borde enrollado, rigidez retinal, tortuosidad de los vasos retinales
C	Marcado	pliegues retinales fijos
C-1		en un cuadrante
C-2		en dos cuadrantes
C-3		en tres cuadrantes
D	Masivo	pliegues retinales fijos en los cuatro cuadrantes
D-1		desprendimiento en forma de embudo amplio
D-2		desprendimiento en forma de embudo estrecho
D-3		desprendimiento en forma de embudo cerrado (la papila no es visible)

COMPONENTES CELULARES DE LAS MEMBRANAS

Las membranas de la PVR están constituidas por una población celular heterogénea, inmersa en una matriz extracelular de tipo conectivo, cuyo grado de fibrosis es variable (Vinores y col., 1990). En la matriz extracelular de las membranas se detectan colágenos tipo I y III, aunque en algunos casos también se encuentra colágeno tipo II (Charteris, 1995). La fibronectina y las proteínas de la lámina basal, tales como colágeno tipo IV, heparán sulfato y laminina son otros elementos constitutivos de esta matriz (Charteris, 1995).

Numerosos estudios han intentado caracterizar los componentes celulares de las membranas (Tabla I.2). Estos trabajos indican la existencia de por lo menos cinco fenotipos distintos, que han sido identificados mediante estudios histológicos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales de membranas humanas. Estos cinco fenotipos son: epitelio pigmentario, glia de la retina, células inflamatorias, fibroblastos y miofibroblastos. Su identificación se basa en propiedades morfológicas, como la presencia de gránulos de pigmento semejantes a los del EPR, o la identificación de marcadores ultraestructurales o inmunohistoquímicos característicos de cada fenotipo. La presencia de estas células en las membranas sugiere su participación en la formación de las mismas, y probablemente también en el origen de la enfermedad. Cada uno de estos tipos celulares podría transformarse en células capaces de sintetizar los componentes de la matriz extracelular. Los miofibroblastos podrían ser importantes para la fibrosis de la matriz primaria, y también podrían participar en la contracción de las membranas que origina nuevos desprendimientos traccionales (Walshe y col., 1992).

Tabla I.2. Tipos celulares identificados en membranas provenientes de pacientes afectados por PVR

Tipo Celular	Marcadores	Referencias
Epitelio Pigmentario de la Retina	Ultraestructura Citoqueratinas	Garcia-Arumi y col., 1992; Hiscott y col., 1989; Jerdan y col., 1989; Mietz y col., 1994a; Mietz y col., 1994b; Schwartz y col., 1988; Stodtler y col., 1994; Tabandeh y col., 2000; Toti y col., 1994; Trese y col., 1985
Células Gliales	Ultraestructura Proteína Glial Fibrilar ácida (GFAP) Cellular Retinaldehyde Binding Protein (CRALBP)	Garcia-Arumi y col., 1992; Guerin y col., 1990b; Hiscott y col., 1984; Hiscott y col., 1989; Jerdan y col., 1989; Rodrigues y col., 1981; Schwartz y col., 1988; Stodtler y col., 1994; Trese y col., 1985; Van Horn y col., 1977; Vinores y col., 1992; Weller y col., 1991
Fibroblastos y Miofibroblastos	Ultraestructura Actina de músculo liso (SMA)	Mietz y col., 1994a; Mietz y col., 1994b; Schwartz y col., 1988; Tabandeh y col., 2000; Toti y col., 1994; Trese y col., 1985; Walshe y col., 1992
Macrófagos	Ultraestructura HLA	Baudouin y col., 1990; Charteris y col., 1992; Charteris y col., 1993; Esser y col., 1993; Jerdan y col., 1989; Mietz y col., 1994a; Mietz y col., 1994b; Proenca y col., 1994; Schwartz y col., 1988; Stodtler y col., 1994; Tang y col., 1992; Toti y col., 1994; Trese y col., 1985; Weller y col., 1988a; Weller y col., 1988b
Linfocitos	CD3, CD8	Baudouin y col., 1990; Charteris y col., 1992; Charteris y col., 1993; Limb y col., 1993; Proenca y col., 1994; Stodtler y col., 1994; Tang y col., 1992

MODELOS EXPERIMENTALES

La importancia de los modelos experimentales en el estudio de la PVR queda claramente manifestada por el gran aporte que significó el modelo desarrollado por Machemer y Laqua en 1975. El minucioso estudio de los resultados de dicho modelo permitió entrever la relevancia de los mecanismos de proliferación y migración celular en esta patología, que hasta ese momento eran insospechados. La innumerable variedad de modelos *in vivo* e *in vitro* que se sucedieron posteriormente, más de cien trabajos publicados hasta el momento, abrió las puertas para analizar la patogenia de esta enfermedad y buscar nuevos caminos para su tratamiento.

Para producir membranas semejantes a las observadas en la PVR humana, se recurrió a la inyección intravítrea de células parecidas a las existentes en dichas membranas: fibroblastos (Sugita y col., 1980), células del EPR (Radtke y col., 1981), células de Müller (Peters y col., 1986) y células inflamatorias (Planck y col., 1992). En otros modelos se inyectaron sustancias con una acción potencialmente inductora de PVR: plasma rico en plaquetas (Pisella and Baudouin, 1996) y factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (Garcia-Layana y col., 1997). La inyección intravítrea de dispasa, una proteinasa neutra obtenida a partir del *Bacillus polymyxa*, ha sido probada también en el conejo (Frenzel y col., 1998). En todos los casos el resultado fue la formación de membranas en la cavidad vítrea, que contenían básicamente los mismos elementos celulares que las membranas humanas, y la aparición ulterior de desprendimientos de retina de tipo traccional. Estos modelos han sido utilizados para estudiar los efectos de diversas drogas antiproliferativas, como el 5-fluorouracilo y la daunomicina, solos o combinados con anti-inflamatorios (Kirmani y col., 1983; Hui and Hu, 1999; Berger y col., 1996) y la participación de diversos factores de crecimiento

(Andrews y col., 1999; Ikuno y col., 2000). Aunque algunos de los ensayos terapéuticos disminuyeron la proliferación celular y la frecuencia de desprendimientos traccionales, el tratamiento actual de la PVR sigue siendo fundamentalmente quirúrgico (Campochiaro, 2001).

Los modelos *in vivo* también permitieron demostrar que la PVR inducida es acompañada por alteraciones de la integridad de la barrera hemato-ocular (Campochiaro y col., 1986), y que tanto la magnitud como la duración de dicha alteración se correlacionan con la gravedad de los desprendimientos traccionales (Sen y col., 1988; Ando y col., 1994).

La actividad proliferativa y contráctil de las células involucradas en la PVR también ha sido estudiada en sistemas *in vitro*. Además de analizar los efectos de drogas similares a las utilizadas *in vivo* (van Bockxmeer y col., 1985), se estudiaron aspirados vítreos de pacientes con PVR. Estos experimentos demuestran que el vítreo enfermo contiene factores estimulantes de la migración (Campochiaro y col., 1985), proliferación (Burke y Twining, 1987), desdiferenciación (Casaroli-Marano y col., 1999) y contracción (Hardwick y col., 1997) celular. En parte, estos efectos podrían deberse a las diversas citoquinas y factores de crecimiento detectados en el vítreo de pacientes con PVR (Choudhury y col., 1997; Pena y col., 1994; Hunt y col., 1994).

NEUROMEDIADORES POTENCIALMENTE INVOLUCRADOS

Además del posible papel de los factores de crecimiento, resultados más recientes han llamado la atención sobre la participación de algunos neuropéptidos. La Sustancia P (SP), un neuropéptido inflamatorio y vasoactivo, se encuentra significativamente elevada en el fluido intraocular de pacientes con PVR (Kieselbach y col., 1991). Además, los niveles de SP en el humor acuoso de pacientes con

desprendimiento de retina se correlacionan con la predisposición a desarrollar una PVR (Troger y col., 1998). También se detectan niveles significativamente elevados de otros dos neuropéptidos: el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) (Troger y col., 1994) y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP) (Troger y col., 1994).

Los neuropéptidos son moléculas de naturaleza peptidérgica, que aunque fueron inicialmente descritos como transmisores en el sistema nervioso, cumplen además otras numerosas funciones, incluyendo la actividad como factores tróficos y/o inflamatorios (Villar y Suburo, 1999). Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio demostraron la expresión de ciertos neuropéptidos y algunos de sus receptores en membranas extraídas quirúrgicamente de pacientes con PVR. Las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas permitieron detectar en esas muestras, la expresión de CGRP y SP y los receptores NK1 de SP e Y1 del neuropéptido Y.

Los neuropéptidos no serían los únicos neuromediadores involucrados en la PVR, ya que otros estudios de nuestro laboratorio también demostraron la expresión de diversas sintasas de óxido nítrico en las membranas humanas (Suburo y col., 1998).

IMPORTANCIA DEL TEMA PROPUESTO

La búsqueda de una estrategia terapéutica satisfactoria para evitar la PVR es todavía un gran desafío. Los avances en el tratamiento quirúrgico y postquirúrgico permiten actualmente el tratamiento exitoso del desprendimiento de retina en aproximadamente un 90 % de los pacientes. En el 10 % restante, la causa principal de nuevos desprendimientos es el desarrollo de una PVR (Charteris, 1995). Como se mencionó anteriormente, la PVR también puede producirse espontáneamente después de un desprendimiento de retina no operado, una herida traumática, un proceso inflamatorio o una infección viral (Thompson, 2001). El tratamiento de la PVR continúa

siendo esencialmente quirúrgico y aproximadamente un 30 % de los pacientes operados por PVR necesitan ser reoperados varias veces como consecuencia de una reproliferación. Estos factores ocasionan la fibrosis de la retina y una considerable pérdida de la visión (Thompson, 2001).

Los trabajos experimentales de esta Tesis tienen como finalidad primaria analizar los procesos celulares involucrados en los desprendimientos y en la etapa inicial de la PVR, buscando nuevas estrategias que, en combinación con las quirúrgicas, permitan evitar el desarrollo de la PVR. *"La prevención de la PVR, antes que su curación, es particularmente urgente"* (Leaver, 1995).

Estudios retrospectivos sobre la evolución de la PVR, sugieren la existencia de una cascada de eventos que culmina en el desarrollo de esta enfermedad (Mietz and Heimann, 1995; Charteris, 1995; Geller y col., 2001). Para disponer de estrategias farmacológicas que permitan interrumpir dicha cascada, es necesario comprender más a fondo los mecanismos subyacentes a la PVR (Wiedemann and Weller, 1988). El desarrollo de modelos experimentales que se asemejen lo más posible al curso de la enfermedad en el humano representa una herramienta de gran valor en esta búsqueda.

OBJETIVOS GENERALES

El propósito de esta Tesis es analizar la participación de algunos neuromediadores en la sucesión de fenómenos que, iniciada con un desprendimiento de retina, puede evolucionar hacia una PVR. Esto podrá ayudar a comprender las cascadas de señalización y transducción que inducen la proliferación, migración y transformación fenotípica subyacentes a la formación de membranas intravítreas y subretinales. Para cumplir esta finalidad, elegimos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar muestras quirúrgicas de PVR humanas para determinar la expresión del receptor Y1 del neuropéptido Y y las enzimas que sintetizan óxido nítrico en los distintos tipos celulares que las componen.
2. Desarrollar modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* para simular distintas etapas de la PVR.
3. Verificar experimentalmente en dichos modelos el papel de los neuromediadores estudiados.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Todos los procedimientos realizados con tejidos humanos han sido efectuados de acuerdo a lo dispuesto en la Declaración de Helsinki. Para el desarrollo y estudio de los modelos experimentales, los animales fueron cuidados según las normas ARVO para el Uso de Animales en Investigación Oftalmológica y de la Visión.

MATERIALES

Muestras de origen humano

Las membranas vitreoretinales fueron obtenidas en un centro de microcirugía ocular (Consultores Oftalmológicos, Director, Dr. Ricardo A. Dodds) y correspondieron a 43 pacientes afectados por PVR. El diagnóstico quirúrgico de las membranas incluidas en este estudio fue: membranas epiretinales, 25; membranas subretinales, 10; fibrosis vitreoretinal, 8. Ver Capítulos III y IV.

Las muestras de segmento ocular posterior fueron obtenidas de donantes humanos cadavéricos sin trastornos oculares conocidos (Fundación Oftalmológica Argentina, gentileza del Dr. Oscar Croxatto). Ver Capítulos III y IV.

Modelo de Proliferación Vitreoretinal en conejo

Se utilizaron conejos machos pigmentados, variedad Burgundy, de 1,5-2,0 kg. La inducción de una condición similar a la PVR se provocó con la inyección intravítrea de plasma homólogo rico en plaquetas (PRP) (Pisella y Baudouin, 1996). Ver Capítulo IV.

Modelo de Proliferación Vitreoretinal en ratón

No existían modelos de PVR en ratón. Por lo tanto, se adaptó y perfeccionó un modelo descrito en el conejo (Frenzel y col., 1998) basado en la inyección intravítrea de la enzima dispasa, una colagenasa. Se utilizaron ratones machos pigmentados C57BL/6J de 18-22 g. Ver Capítulo V.

Explantos de epitelio pigmentario

Con la finalidad de investigar el efecto del NO sobre el epitelio pigmentario en una situación asimilable a la del desprendimiento de retina, se obtuvieron explantos del casquete EPR-coroides-esclera a partir de ratones machos pigmentados C57BL/6J y albinos BALB-c, de 18-22 g, mantenidos bajo distintas condiciones de iluminación. Estos explantos fueron incubados *in vitro* durante distintos periodos de tiempo para analizar el efecto de dadores de NO e inhibidores de las enzimas que sintetizan dicho neuromediador. Ver Capítulo VI.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Fijación y criopreservación

Se utilizó una mezcla fijadora compuesta por paraformaldehído al 4 % y ácido pícrico en buffer fosfato 0,1 M pH 6,8 (Suburo y col., 1995) (ver Apéndice). Para su criopreservación, las muestras fijadas fueron transferidas a soluciones de sacarosa de concentraciones crecientes (5; 7,5; 10; 15 y 20 %) en solución salina buffereada con fosfato (PBS) con 0,1 % de azida sódica (ver Apéndice). Después de 12 hs en cada solución de sacarosa, las muestras se embebieron en una mezcla 1:1 de sacarosa al 20 % y medio de inclusión para muestras de criostato (Embedding Medium Compound, Bio-Optica, Milano, Italy; Bartel y Raymond, 1990). Las muestras fueron congeladas en

acetona enfriada con N₂ líquido y cortadas en un criostato Microm (Zeiss). Se emplearon cortes de 14 µm para los procedimientos inmunoenzimáticos, y de 14-40 µm para inmunofluorescencia, que fueron adheridos a portaobjetos gelatinizados. Algunas muestras de membranas humanas fueron procesadas in toto.

ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LAS MUESTRAS

Procedimientos inmunoenzimáticos

Para los estudios realizados con microscopía de luz convencional los cortes fueron deslipidizados en soluciones de etanol de concentración creciente (70; 96 y 100 %) y luego en xilol.

Inmunorreacción coloreada con el complejo avidina-biotina-peroxidasa

Los cortes rehidratados fueron sumergidos en una solución de H₂O₂ 0,5 % en etanol 96° durante 20 minutos, a fin de bloquear la actividad enzimática de la peroxidasa endógena.

Los cortes fueron incubados en presencia de suero normal del animal de origen del segundo anticuerpo (1:30 en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente, para bloquear posibles uniones inespecíficas. Posteriormente fueron incubados con el anticuerpo primario apropiado durante toda la noche a 4°C y luego lavados 3 veces durante 5 minutos en solución salina buffereada con fosfato (PBS). Para revelar la unión del anticuerpo a su antígeno “*in situ*” se utilizaron los reactivos “Vectastain Elite ABC KIT” (Vector, Burlingame, CA, EEUU). Los cortes fueron incubados con un anticuerpo secundario biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente, lavados en PBS (3 x 5 minutos) e incubados con el complejo avidina-biotina-peroxidasa, también durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente los cortes fueron lavados en buffer acetato 0,1 M pH 6,0 (3 x 5 minutos) (ver Apéndice) y se detectó la actividad de la peroxidasa

utilizando 0,0025 % H₂O₂ en el buffer acetato mencionado, en presencia de 3-3'-diamino-benzidina y níquel (ver Apéndice) (Suburo y col., 1995). Estos portaobjetos fueron deshidratados y montados con bálsamo sintético (DPX, Fluka BioChemika, Ronkonkoma, NY, USA).

En todos los experimentos se corrieron blancos desprovistos del primer anticuerpo en paralelo con las muestras. También se utilizaron blancos semejantes en todos los procedimientos inmunohistoquímicos descriptos más abajo.

Inmunorreacción coloreada con fosfatasa alcalina

Después de la incubación con el primer anticuerpo los cortes fueron lavados en buffer Tris salino 0,05 M pH 7,4 (3 x 5 minutos) (ver Apéndice). Se utilizaron los reactivos DAKO EnVision AP (DAKO, Carpinteria, CA, EEUU). El anticuerpo primario fue detectado con inmunoglobulinas de cabra anti-ratón unidas a un polímero marcado con fosfatasa alcalina (Ig-AP) durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, lavados en el mismo buffer Tris (3 x 5 minutos) y revelados con naftol (0,4 mg/ml) como sustrato y Fast Red (1mg/ml) como cromógeno en presencia de levamisol (4 %) como inhibidor de las fosfatasas endógenas. Los cortes fueron montados con glicerina.

Para analizar la estructura histológica, se utilizaron secciones adyacentes a las empleadas para el análisis inmunohistoquímico, que fueron coloreadas con hematoxilina-eosina o rojo neutro.

Las preparaciones coloreadas inmunoenzimáticamente fueron observadas y fotografiadas con un microscopio Nikon Eclipse 800. Se empleó película blanco y negro Technical Pan o película color para diapositivos Ektachrome Reversal Film 160.

Inmunofluorescencia

Estos cortes fueron deslipidizados como se describió previamente, pero no se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena.

Inmunofluorescencia indirecta

Se utilizaron dos técnicas de detección con inmunofluorescencia para dobles marcajes. Después del bloqueo con el suero correspondiente (según se describió antes) algunos cortes fueron incubados simultáneamente con dos anticuerpos primarios durante toda la noche a 4° C, lavados en PBS (3 x 5 minutos) e incubados con una mezcla de anticuerpos secundarios marcados con moléculas fluorescentes (Fluorescein isothiocyanate-conjugated goat antirabbit IgG y Lissamine Rhodamine-conjugated goat antimouse IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) durante 30 minutos a 37° C y en oscuridad.

Inmunofluorescencia amplificada por tiramida

El procedimiento de amplificación con tiramida fue utilizado para mejorar la señal fluorescente, o para realizar dobles marcajes con anticuerpos provenientes del mismo tipo de animal dador. Los cortes fueron incubados con un primer anticuerpo durante toda la noche y lavados en PBS (3 x 5 min). Para detectar la unión del anticuerpo primario se utilizó la técnica de amplificación con tiramida (TSA, Life Science Products, Boston, MA), visualizándose el producto final con estreptavidina conjugada a fluoresceína-isotiocianato. Luego fueron incubados durante toda la noche con un segundo anticuerpo primario y éste fue detectado con anticuerpos secundarios unidos a lisamina-rodamina.

Las muestras procesadas con técnicas de inmunofluorescencia fueron montadas en glicerol y observadas en un microscopio Nikon Eclipse 800 equipado con el Láser Scanning System Radiance 2000 (BioRad, Hemel Hempstead, UK). Para la visualización de los fluoróforos se utilizaron secuencialmente la línea 488 del láser de argón con el filtro de emisión HQ515/30 y la línea 543 del láser de helio-neón con el filtro de emisión HQ590/70. Se obtuvieron entre 10 y 40 imágenes a lo largo del eje z separadas entre sí por 0,5 μm . Las proyecciones ópticas y los dobles montajes se realizaron con los programas Confocal Assistant Software o LaserSharp 2000 (BioRad, Hemel Hempstead, UK).

La metodología específica utilizada en los distintos experimentos se describe en Materiales y Métodos de cada capítulo.

APÉNDICE

DESCRIPCIÓN DE LAS SOLUCIONES UTILIZADAS

BUFFER FOSFATO (SOLUCIONES SORENSEN)

	Moléculas de agua	0,2 M (g/l)	0,4 M (g/l)
	anhidro	28,40 g	56,80 g
Solución A	2	35,60 g	71,23 g
(fosfato de sodio dibásico)	7	53,60 g	107,20 g
	12	71,63 g	142,26 g
Solución B	anhidro	24,00 g	48,00 g
(fosfato de sodio monobásico)	1	27,10 g	55,20 g
	2	31,20 g	62,40 g

Preparar las soluciones por separado y una vez disueltas mezclar.
Ajustar el pH a 7,4.

SOLUCIÓN SALINA BUFFEREADA CON FOSFATO (PBS) pH 7,4 (5x)

buffer fosfato 0,2 M pH 7,4	500 ml
cloruro de sodio	80,00 g
cloruro de potasio	2,00 g
azida sódica	2,00 g
agua bidestilada	csp 2000 ml

Solución de trabajo 1x

PBS 5x	200 ml
agua bidestilada	800 ml

BUFFER FOSFATO (PB) 0,1 M pH 7,4

buffer fosfato 0,2 M pH 7,4	500 ml	
azida sódica		2,00 g
agua bidestilada		csp
1000 ml		

BUFFER ACETATO 1 M pH 6,0

acetato de sodio trihidratado	136,08 g
agua bidestilada	csp 1000 ml
llevar a pH 6,0 con ácido acético glacial.	

BUFFER TRIS 0,1 M pH 7,4 (2x)

trizma básico	24,42 g
cloruro de sodio	35,06 g
Tween 20	4 ml
agua bidestilada	csp 2000 ml
llevar a pH 7,3 - 7,5 con ácido clorhídrico 10 N.	

SOLUCIÓN REVELADORA

(reacción inmunoenzimática para peroxidasa revelada con 3-3'-diamino-benzidina amplificada con sulfato de níquel amonio)

1. Solución A:

buffer acetato de sodio 0,2 M pH 6,0	100 ml
sulfato de níquel amonio	5,00 g
cloruro de amonio	0,08 g

2. Solución B:

3-3'-diamino-benzidina	0,10 g
------------------------	--------

agua bidestilada	100 ml
------------------	--------

3. Solución C:

agua bidestilada	500 μ l
peróxido de hidrógeno	5 μ l

Las soluciones se mezclan siguiendo el orden alfabético.

SOLUCIÓN FIJADORA CON ÁCIDO CÍTRICO

1. Solución de paraformaldehído

paraformaldehído	80,00 g
agua bidestilada	500 ml

Disolver calentando hasta 58-60°C y aclarando con gotas de HONa 1 M.

2. Buffer fosfato (Sorensen) 0,4 M pH 7,4	800 ml
---	--------

3. Ácido pícrico saturado	280 ml
---------------------------	--------

Filtrar antes de agregar a la solución final.

Mezclar las soluciones 1, 2 y 3, llevar a volumen final de 2000 ml con agua bidestilada, ajustar pH a 6,8.

SOLUCIÓN FIJADORA DE PARAFORMALDEHÍDO AL 4 %

1. Solución de paraformaldehído al 8 %

paraformaldehído	40,00 g
agua bidestilada	500 ml

Disolver calentando hasta 58-60°C y aclarando con gotas de HONa 1 M.

2. buffer fosfato 0,2 M pH 7,4	500 ml
--------------------------------	--------

Mezclar las soluciones 1 y 2 y filtrar (volumen final 1000 ml).

SOLUCIÓN FIJADORA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

buffer fosfato 0,1 M pH 7,4	9,2 ml
glutaraldehído 25 %	0,8 ml
	volumen final 10,0 ml

SOLUCIÓN LAVADORA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

buffer fosfato 0,1 M pH 7,4	10 ml
sacarosa 0,12 M	410 mg
	volumen final 10 ml

SOLUCIÓN DE TETRÓXIDO DE OSMIO

buffer fosfato 0,2 M pH 7,4	5 ml
osmio 5 %	2 ml
sacarosa 1,2	1 ml
agua bidestilada	2 ml
	volumen final 10 ml

CAPÍTULO III

EL RECEPTOR Y1 DEL NEUROPEPTIDO Y EN LA PROLIFERACIÓN VITREORETINAL HUMANA

INTRODUCCIÓN

El neuropéptido Y (NPY) es uno de los neuropéptidos más abundantes en el sistema nervioso (Hökfelt y col., 1998). Las respuestas a este mediador dependen de los receptores Y (Y1, Y2, Y4 e Y5), que pertenecen a la gran familia de receptores acoplados a proteínas G (Blomqvist y Herzog, 1997). La presencia de receptores de NPY se ha demostrado en células de linaje astrocítico provenientes de la médula espinal y cerebro de rata (Hosli y col., 1992), cerebro neonatal (Gimpl y col., 1993), y cerebelo (Hosli y Hosli, 1993) cultivadas *in vitro*. Además, se han identificado los productos de RT-PCR para los receptores Y1, Y2 e Y4 en cultivos de astrocitos de cerebro humano (Ammar y col., 1998). Experimentos de inmunohistoquímica con dobles marcajes han demostrado que el anticuerpo contra el receptor Y1 reconoce una subpoblación de astrocitos en cultivo, positivos para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (St-Pierre y col., 2000). Teniendo en cuenta que la presencia de receptores Y en células gliales *in vivo* ha sido descrita sólo en una oportunidad, en procesos gliales asociados con un tipo específico de unión sináptica (Pickel y col., 1998), la abundancia de receptores Y en células gliales en cultivo sugiere que su expresión podría estar relacionada con la proliferación u otros fenómenos de reactividad glial.

En la retina encontramos dos elementos macrogliales principales: las células de Müller, que atraviesan el espesor ápico-basal de la retina e interactúan con todos los tipos neuronales (Newman y Reichenbach, 1996), y los astrocitos, principalmente asociados con los axones que conforman el nervio óptico y con los vasos sanguíneos

retinales (Distler y col., 1993). La participación de las células gliales de la retina en la proliferación vitreoretinal (PVR) ha sido demostrada en numerosas ocasiones (Charteris, 1995). El desprendimiento de retina, una de las causas de PVR, induce la proliferación de las células de Müller y de los astrocitos, además de otros tipos celulares (Fisher y col., 1991). Las membranas desarrolladas durante la PVR expresan marcadores específicos para astrocitos y células de Müller (Guerin y col., 1990b). Las células gliales fenotípicamente modificadas no intervienen solamente en la formación de las membranas, sino que también podrían participar, junto con los miofibroblastos (Walshe y col., 1992), en la actividad traccional de las mismas (Hardwick y col., 1997).

Se ha descrito la presencia de receptores para NPY en células del epitelio pigmentario bovino y humano. En ambos tejidos se encontraron los ARNm para los receptores Y1, Y2 e Y5 (Abounader y col., 1999). Por otra parte, la retina exhibe actividad farmacológica para el receptor Y2 (Bruun y col., 1994). Además, el receptor Y1 es abundantemente expresado por el músculo liso vascular, donde interviene en mecanismos de vasoconstricción (Blomqvist y Herzog, 1997).

En este trabajo se realizó un estudio inmunohistoquímico en muestras quirúrgicas obtenidas de pacientes humanos con diagnóstico de PVR para investigar la expresión del receptor Y1 en las membranas y en la retina lesionada adyacente. A fin de caracterizar el fenotipo de las células inmunorreactivas para Y1, se comparó la distribución de dicha inmunorreacción con la correspondiente a los marcadores de células de Müller y astrocitos: vimentina (VIM), desmina (DES) y proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (Dahl y Bignami, 1982; Guerin y col., 1990a), y con la correspondiente al marcador de miofibroblastos alfa actina de músculo liso (SMA) (Walshe y col., 1992).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las membranas vitreoretinales correspondieron a 43 pacientes afectados por PVR que debieron ser operados. El diagnóstico quirúrgico de las membranas incluidas en este estudio fue: membranas epiretinales, 25; membranas subretinales, 10; fibrosis vitreoretinal, 8. Las muestras de segmento ocular posterior fueron obtenidas de donantes humanos cadavéricos sin trastornos oculares conocidos.

Inmunohistoquímica

Una vez extraídos, los especímenes quirúrgicos humanos se extendieron sobre un filtro Millipore estéril y fueron inmediatamente fijados por inmersión durante 24 horas. Las muestras fueron procesadas para determinaciones inmunohistoquímicas de tipo inmunoenzimático o inmunofluorescente, tal como se describe en el Capítulo II. Se utilizaron los anticuerpos descritos en la Tabla III.1, tanto en cortes como en preparaciones *in toto*. Los cortes fueron incubados en presencia del anticuerpo primario (Tabla 1) y revelados con los reactivos “Vectastain Elite ABC KIT” (Vector, Burlingame, CA, EEUU). Para microscopía confocal las muestras fueron incubadas con una mezcla de dos anticuerpos primarios y revelados con anticuerpos secundarios marcados con una molécula fluorescente (ver Capítulo II).

La especificidad del suero anti-Y1 fue previamente estudiada en tejidos de rata (Bao y col., 1997). Para confirmar su especificidad en los tejidos humanos, además de los blancos sin el primer anticuerpo, se utilizó una prueba de pre-absorción. Previamente a la incubación de los cortes, el suero anti-Y1 fue incubado en presencia de los fragmentos del péptido utilizados para su producción: el tetrapéptido N-terminal (AFKK), el pentapéptido C-terminal (DNEKI) y el tetrapéptido intermedio (ISMN). La concentración final de cada péptido fue de 10^{-6} ó 10^{-5} M y se los mantuvo con agitación

constante durante una noche. Los cortes fueron incubados con el suero pre-absorbido y revelados con el procedimiento inmunoenzimático, junto con un control positivo. Las mezclas que contenían simultáneamente los oligopéptidos N- y C- terminal bloquearon completamente la inmunorreacción. El bloqueo con el tetrapéptido intermedio no fue eficaz, ya que esta secuencia no se encuentra en el receptor Y1 humano (Herzog y col., 1993).

Tabla III.1: Anticuerpos primarios utilizados para inmunohistoquímica

Anticuerpo contra:	Abreviatura	Origen	Proveedor
Alfa actina de músculo liso	SMA	monoclonal de ratón	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO
Receptor Y1, péptido C-terminal	Y1	policlonal de conejo	Karolinska Institute, Stockholm, Suecia
Desmina	DES	monoclonal de ratón	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO
Proteína glial fibrilar ácida	GFAP	monoclonal de ratón	BioGenex, San Ramon, CA
Neuropéptido Y	NPY	policlonal de conejo	Peninsula Laboratories Inc., San Carlos, CA
Vimentina	VIM	monoclonal de ratón	Sigma Chem. Co., St. Louis, MO

RESULTADOS

Estructura histológica de las muestras de PVR

Las muestras fueron cortadas perpendicularmente a la superficie de la membrana y algunos cortes fueron coloreados con hematoxilina-eosina para analizar el patrón

histológico general. Las membranas estaban formadas por células de forma heterogénea, en su mayor parte de aspecto alargado, inmersas en una matriz extracelular.

En las muestras con diagnóstico quirúrgico de fibrosis vitreoretinal (n: 8) se observaron fragmentos de tejido retinal. Aunque todos ellos presentaban cierto grado de desorganización estructural, pudieron identificarse por la presencia de capas semejantes a las de la retina neural normal.

Inmunohistoquímica

Distribución de marcadores inmunohistoquímicos en las membranas de PVR

En todas las membranas incubadas con el anticuerpo contra el receptor Y1 se observaron células inmunomarcadas (Tabla III.2), de forma alargada y dispuestas en un patrón laminar paralelo a la superficie de la membrana (Fig. III.1). También se detectaron células con inmunorreactividad para GFAP en una alta proporción de membranas (Tabla III.2). Estas células mostraban la misma distribución y morfología que las marcadas con Y1, sugiriendo una co-localización de ambos marcadores. La co-localización pudo ser demostrada en cortes de criostato y membranas *in toto* procesados con doble marcaje inmunofluorescente. En estas preparaciones la mayoría de las células inmunorreactivas para el receptor Y1 también fueron positivas para GFAP (Fig. III.2, A-C), aunque una pequeña proporción de células sólo mostró inmunorreactividad para Y1. Las observaciones realizadas en las membranas *in toto* confirmaron la morfología alargada de las células donde co-localizaban Y1 y GFAP. Algunas de ellas midieron hasta 250 μm de longitud.

En algunas membranas se detectó inmunorreactividad para desmina (Tabla III.2), un filamento intermedio presente en los miofibroblastos y las células de Müller, mientras que el anticuerpo contra vimentina, marcador de fibroblastos y células de

Müller, reaccionó con la mayoría de las células de todas las membranas estudiadas (Tabla III.2).

Las células alargadas inmunomarcadas con SMA, el marcador de miofibroblastos, eran numerosas en una alta proporción de membranas (Tabla III.2). Sin embargo, esta marcación adoptaba un patrón de localización distinto del seguido por la inmunorreactividad para Y1. La expresión de Y1 y SMA en dos poblaciones diferentes fue confirmada por estudios de doble marcaje con microscopía confocal (Fig. III.2, D-F). No se detectó inmunorreactividad para NPY en las membranas (Tabla III.2).

Distribución de marcadores inmunohistoquímicos en la retina

En todos los fragmentos de retina asociados a membranas de PVR (Tabla III.2) se observó una intensa inmunorreactividad para el receptor Y1. Dicha marca apareció en células alargadas dispuestas en el eje ápico-basal de la retina (Fig. III.2, G y III.3, A). Las áreas de retina positivas para Y1 también mostraron una fuerte inmunorreacción para GFAP. Contrariamente, las áreas de retina que no fueron marcadas con GFAP tampoco tuvieron inmunomarcación con Y1. El análisis de cortes gruesos de retina con microscopía confocal demostró que la mayoría de las estructuras marcadas con el anticuerpo contra el receptor Y1 también fueron marcadas por el anticuerpo contra GFAP (Fig. III.2, G-I). Los anticuerpos contra desmina y vimentina marcaron células alargadas similares (Fig. III.3, B y Tabla III.2), mientras que el anticuerpo contra SMA no reaccionó con ningún tipo celular de la retina neural (Tabla III.2). Las retinas afectadas por PVR mostraron inmunorreacción para NPY (Tabla III.2) en la misma localización que la retina normal: células amacrinas y fibras nerviosas de la retina interna. No se detectó inmunorreactividad para Y1 en la retina neural normal (Fig. III.3, C), aunque sí la hubo para desmina y vimentina.

Tabla III.2: Inmunorreactividad para los diferentes marcadores en las muestras de PVR

Marcador	Membranas	Retinas con PVR
Y1	43/43	8/8
GFAP	17/21	8/8
VIM	7/7	3/3
DES	3/5	3/3
SMA	26/28	0/8
NPY	0/15	5/5

En la tabla se describe la proporción de muestras con inmunorreactividad para cada marcador, es decir, el número de muestras positivas sobre el número de muestras totales estudiadas.

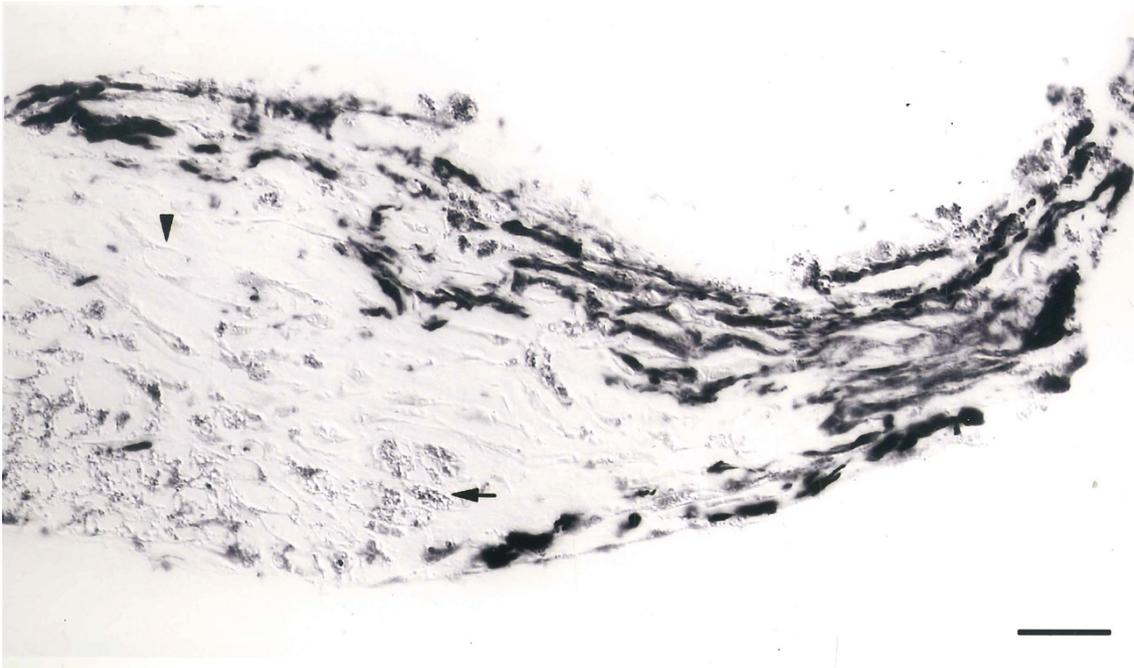


Figura III.1. Esta microfotografía muestra un corte perpendicular a la superficie de una membrana de PVT humana observada con óptica de Nomarski, incubada con un anticuerpo contra el receptor Y1 y revelada con el procedimiento inmunoenzimático avidina-biotina-peroxidasa. La inmunoreacción aparece como un depósito negro que tiñe numerosas células de forma alargada, dispuestas paralelamente a la superficie de la membrana. Se observan además numerosas células no inmunorreactivas, con (flecha) o sin pigmento citoplasmático (punta de flecha). Barra de calibración: 50 μ m.

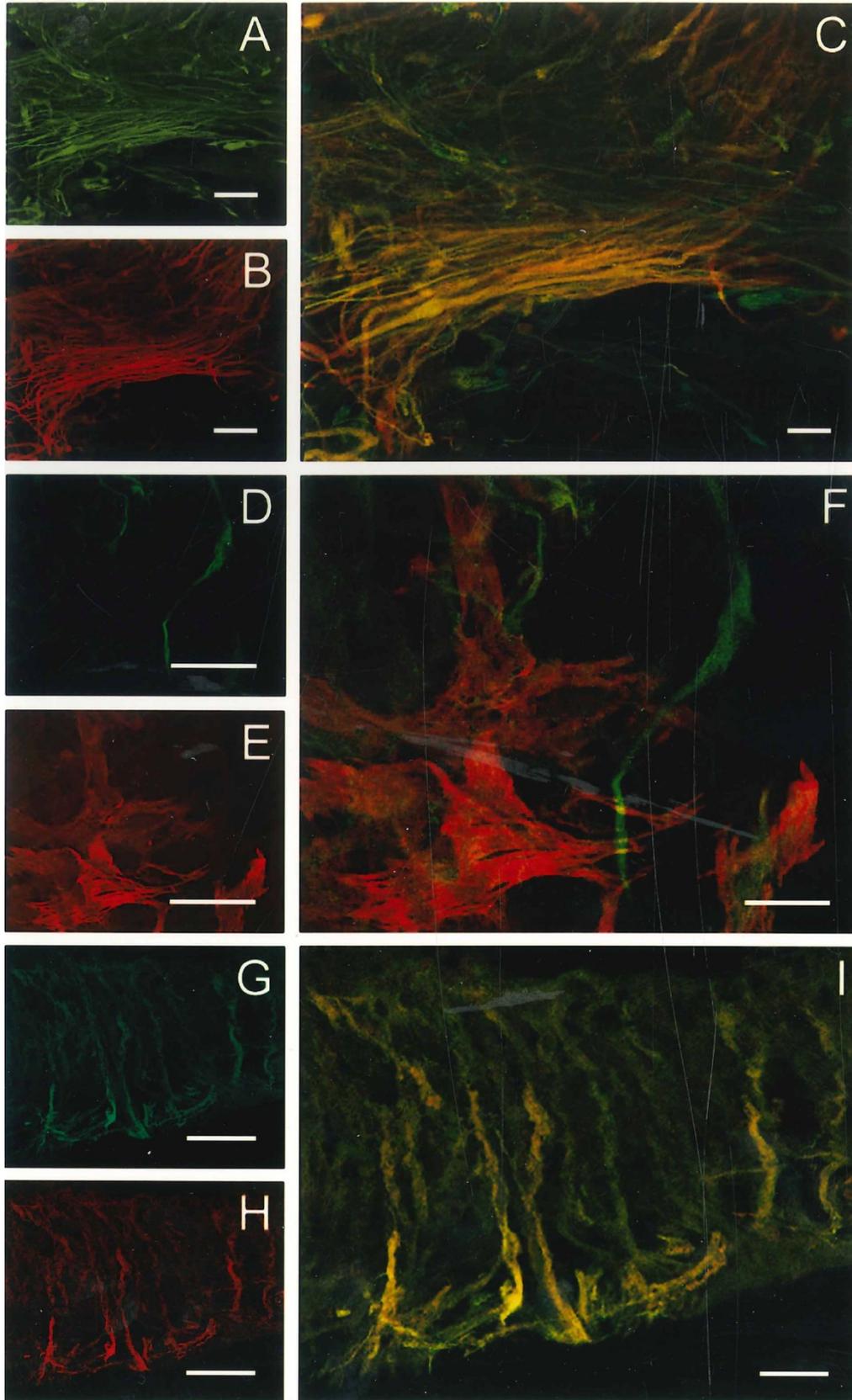


Figura III.2. Estas microfotografías corresponden a muestras quirúrgicas de PVR humana y fueron obtenidas con un microscopio de rayo láser confocado.

A – C. Membrana in toto inmunomarcada con los anticuerpos contra el receptor YI (A, verde) y contra GFAP (B, rojo). En C se muestra la combinación de A y B. Ambos marcadores aparecen en células de forma alargada orientadas paralelamente a la superficie. Se observa co-localización de la inmunorreactividad para YI y GFAP en la mayor parte de estas células.

D - F. En esta membrana, también procesada in toto, la marca verde corresponde a la inmunorreactividad para YI (D) y la roja a la inmunorreactividad para SMA (E). Como se observa claramente en la imagen combinada (F), estos marcadores reconocen poblaciones celulares diferentes. La inmunorreacción para el receptor YI identifica células delgadas y largas, mientras que el anticuerpo contra SMA detecta células más grandes y con gruesos lamelipodios.

G – I. Microfotografías del corte apicobasal de un fragmento de retina que estaba adherido a una membrana. Los anticuerpos contra YI (G, verde) y GFAP (H, rojo) detectan células alargadas que atraviesan todo el espesor de la retina. La forma de estas células y la inmunorreactividad para GFAP las identifican como células de Müller. En I se observa que la inmunorreactividad para YI co-localiza con la de GFAP en las mismas células.

Barras de calibración: columna izquierda, 50 μm ; columna derecha, 25 μm .

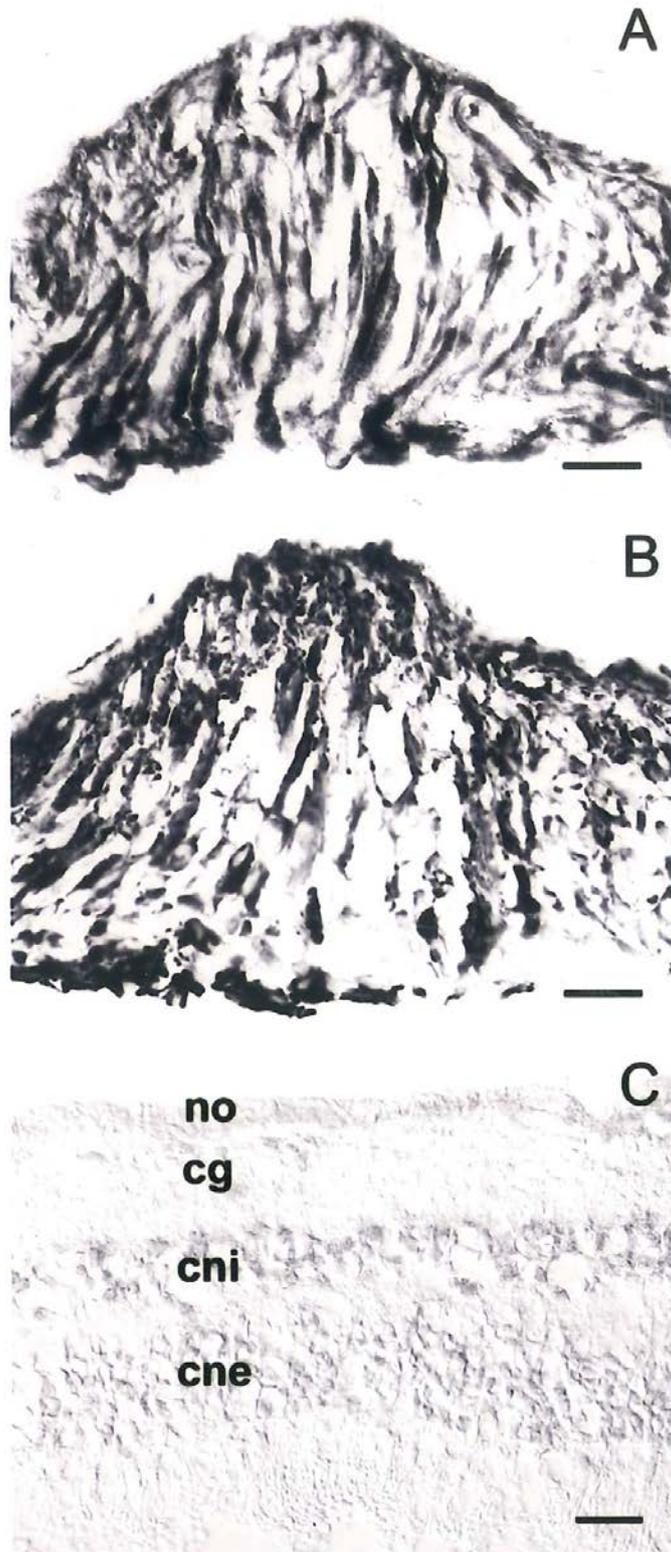


Figura III.3, A y B. Cortes ápicobasales de un fragmento de retina lesionada por PVR.

A. Aunque la histoarquitectura de la retina está parcialmente alterada, se observa que la inmunorreactividad para Y1 aparece en células alargadas dispuestas en el eje apicobasal de la retina.

B. En un corte adyacente al anterior, el anticuerpo contra vimentina marca células con una forma y distribución similares. La forma de las células y su inmunorreactividad para vimentina las identifica como células de Müller.

C. Corte ápico basal de retina humana normal. No se observa inmunorreactividad para Y1 en las células de Müller.

Barras de calibración; 25 μ m.

DISCUSIÓN

El neuropéptido Y desempeña un amplio espectro de acciones fisiológicas, no sólo en el cerebro sino también en el sistema cardiovascular (Hökfelt y col., 1998). Las respuestas a este neuropéptido están mediadas por los receptores Y (Y1, Y2, Y4 e Y5), pertenecientes a la familia de los receptores acoplados a proteína G. El receptor Y1 se expresa en células de músculo liso, neuronas y astrocitos en cultivo (Ammar y col., 1998; Gimpl y col., 1993; Hosli y Hosli, 1993; Hosli y col., 1992; St-Pierre y col., 2000).

En este estudio, detectamos inmunorreactividad positiva para el receptor Y1 en 43 membranas epi- y subretinales obtenidas de pacientes operados por PVR y en 8 fragmentos de tejido retinal asociados a estas membranas. Estas células no estaban relacionadas con los miofibroblastos, ya que los dobles marcajes indicaron ausencia de co-localización del receptor Y1 y la SMA. Por el contrario, la forma alargada y la co-localización de GFAP en las células inmunorreactivas para Y1, sugiere una estrecha semejanza con las células de Müller modificadas que migran fuera de la retina en desprendimientos experimentales (Lewis y Fisher, 2000) y en la displasia retinal de ratones deficientes de p27^{Kip1} (Dyer y Cepko, 2000). Este origen es sustentado por la presencia de numerosas células inmunorreactivas para Y1 que atravesaban el espesor de la lámina neuroepitelial; es decir, que tenían la morfología y distribución de las células de Müller. Este diagnóstico fue confirmado por la inmunorreactividad contra vimentina, desmina y GFAP, otros marcadores de la glia radial de la retina (Dahl y Bignami, 1982; Guerin y col., 1990a), que aparecían en células idénticas.

La presencia del receptor Y1 en las células gliales modificadas de la PVR apoya una correlación entre su expresión y la respuesta glial a la injuria. Como se describió en

la Introducción de este Capítulo, la asociación de la expresión glial del receptor Y1 con la hipertrofia e hiperplasia glial es sugerida por las numerosas descripciones de este receptor en astrocitos cultivados *in vitro* (St-Pierre y col., 2000), que contrastan con un único reporte de su existencia en células gliales *in vivo* (Pickel y col., 1998). Esta asociación es también confirmada por la co-localización de GFAP y el receptor Y1 en células de Müller de la retina lesionada, ya que este marcador glial no es habitualmente detectado en células de Müller normales (Bjorklund y col., 1985). La expresión de este filamento intermedio específico de las células gliales, aumenta en las células de Müller sometidas a estados de estrés o injuria, tales como lesiones del nervio óptico (Bjorklund y col., 1985), desprendimiento retinal (Lewis y col., 1989), retinopatía diabética (Mizutani y col., 1998), fototoxicidad (Burns y Robles, 1990) o glaucoma (Tanihara y col., 1997). Por lo tanto, la expresión inmunohistoquímica de GFAP en las células de Müller de la retina con PVR y en células alargadas dentro de las membranas refleja una respuesta de tipo patológico.

Aunque el rol del receptor Y1 en la gliosis y en la patogénesis de la PVR es todavía especulativo, se pueden tener en consideración los siguientes fenómenos. Uno de ellos es un efecto estimulante de la proliferación mediado por NPY, que ha sido demostrado en cardiomiocitos adultos, células musculares lisas (Goldberg y col., 1998; Zukowska-Grojec y col., 1998) y el tejido cicatrizal (Crowe y col., 1994). Además, el receptor Y1 ha sido identificado en tejidos en proliferación tales como la línea celular humana WE-68 derivada de sarcoma de Ewing's (Blomqvist y Herzog, 1997), y en carcinoma de mama primario y metastásico (Reubi y col., 2001).

NPY puede despolarizar el potencial de membrana de los astrocitos (Hosli y col., 1992) y esta despolarización parece ser importante en la proliferación glial (MacFarlane y Sontheimer, 2000). En las retinas normales, la membrana de las células

de Müller está dominada por una conductancia de K^+ con rectificación interna, pero estas corrientes se reducen significativamente después de inducido un desprendimiento de retina, y desaparecen casi totalmente cuando aparece una PVR (Francke y col., 2001). La interacción de los receptores Y1 con los canales de potasio en las neuronas centrales (Sun y col., 2001), sugiere que una interacción semejante (aunque de sentido distinto) podría ocurrir en las células de Müller injuriadas.

Con respecto al origen del ligando de este receptor podemos considerar dos posibles fuentes: el NPY producido y liberado por neuronas de la retina (Straznicki y Hiscock, 1989) y el proveniente de los nervios perivasculares de la coroides (Hirota y Gregory, 1996). Sin embargo, NPY no es necesariamente el único neuropéptido involucrado en las respuestas mediadas por los receptores Y1, ya que estos pueden ser estimulados por otros péptidos relacionados, como por ejemplo el péptido YY (Larhammar, 1996). Los receptores Y1 también responden a otros péptidos no relacionados, como la proteína gp 120 del virus del HIV, cuyo efecto mitogénico sobre células musculares lisas *in vitro* es bloqueado por antagonistas de los receptores Y1 (Kim y col., 1998).

Durante el transcurso de la PVR, la contracción de las membranas induce nuevas lesiones de la retina producidas por los desprendimientos traccionales (Walshe y col., 1992). La ausencia de inmunorreactividad para Y1 en los miofibroblastos sugiere que los ligandos de este receptor no activarían la contracción de los miofibroblastos. Sin embargo, las células de Müller también poseen actividad contráctil, que podría ser mediada por este receptor (Hardwick y col., 1997).

El papel del Y1 y sus ligandos en la patogénesis de la PVR merece nuevos estudios, ya que podría servir para diseñar nuevas estrategias terapéuticas en la prevención y tratamiento de esta enfermedad.

CAPÍTULO IV

SINTASAS DE ÓXIDO NÍTRICO EN LA PROLIFERACIÓN VITREORETINAL HUMANA Y EXPERIMENTAL

INTRODUCCIÓN

El óxido nítrico (NO), molécula gaseosa con propiedades químicas de radical libre, actúa como mensajero biológico mediando un amplio rango de eventos fisiológicos y patológicos (Moncada y col., 1991). Además de su conocida participación en la neurotransmisión (Snyder, 1992), la regulación del tono vascular (Ignarro, 1989) y en diversos mecanismos inmunológicos (Marletta, 1989), también interviene en la regulación de la transcripción génica (Xu y col., 2000) y en fenómenos de proliferación y remodelación de los tejidos conectivo (Wang y col., 1997) y muscular (Quinlan y col., 2000).

El NO se forma por oxidación de L-arginina, reacción catalizada por la enzima sintasa de NO (NOS). Existen tres isoformas constitutivas, cuya activación depende de calcio, que generan pequeños pulsos de NO capaces de actuar como señal intra- o intercelular. Las formas constitutivas son la neuronal (NOS_n), la endotelial (NOS_e) y la mitocondrial (NOS_m). Los nombres simplemente indican el lugar donde fueron descubiertas, ya que la sintasa neuronal no sólo se encuentra en neuronas, sino también en fibras musculares estriadas (Kobzik y col., 1994) y células epiteliales (Pérez Martínez y col., 1997; Garcia-Vitoria y col., 2000). Por su parte, la sintasa endotelial es también muy abundante en ciertas regiones del sistema nervioso central (Dinerman y col., 1994; Caillol y col., 2000) y la forma mitocondrial es aún poco conocida (Tatoyan y Giulivi, 1998). La forma inducible (NOS_i) es expresada por las células ante ciertos estímulos, siendo la endotoxina el más conocido. Su activación no requiere calcio y

produce NO en cantidades masivas que pueden ser tóxicas para la célula que las produce o para las células vecinas. Es característica de los macrófagos activados (Stuehr y col., 1991), pero también puede ser expresada en hepatocitos (Ohshima y col., 1992; Wood y col., 1993) y en epitelios ciliados (Pérez Martínez y col., 1997).

En la retina normal se expresa sintasa de NO neuronal en algunas células amacrinas (Kim y col., 1999; Neufeld y col., 2000) y una isoforma aún no bien identificada en los fotorreceptores (Yoshida y col., 1995). Varias enfermedades oculares han sido relacionadas con modificaciones en la producción de NO (Chiou, 2001). En fluidos oculares de pacientes afectados por retinopatía proliferativa diabética con desprendimiento traccional de retina, se detectan niveles significativamente elevados de NO (Yilmaz y col., 2000). Además, se ha encontrado una asociación entre el polimorfismo eNOS4 del gen para la sintasa endotelial y la severidad de la retinopatía diabética (Taverna y col., 2002), demostrándose que este polimorfismo se correlaciona con variaciones en los niveles de NO en plasma (Tsukada y col., 1998). Por otro lado, se sabe que las células de Müller, que en condiciones normales no expresan sintasas de NO, pueden expresarlas en situaciones patológicas. En retinas de pacientes diabéticos, las células de Müller exhiben inmunoreactividad para la forma inducible (Abu El-Asrar y col., 2001), mientras que en retinas isquémicas también presentan la forma neuronal (Kobayashi y col., 2000).

A fin de evaluar la posible participación de NO en la proliferación vitreoretinal, se realizó un estudio inmunohistoquímico de las sintasas de NO en muestras quirúrgicas obtenidas de pacientes humanos con diagnóstico clínico de PVR, utilizándose diversos anticuerpos contra las isoformas neuronal, endotelial e inducible de la sintasa de óxido nítrico. Para verificar si el desarrollo de la PVR era acompañado de la expresión de las

sintasas de NO, se estudió la presencia de dichas enzimas en ojos de conejo con PVR experimental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras quirúrgicas de PVR humanas

Las membranas vitreoretinales utilizadas en este trabajo fueron 35 de las descritas en el Capítulo III. El diagnóstico operatorio de las membranas incluidas en este estudio fue: membranas epiretinales, 25; membranas subretinales, 4; fibrosis vitreoretinal, 6. También se estudiaron muestras de segmento ocular posterior obtenidas de donantes humanos cadavéricos sin trastornos oculares conocidos.

Proliferación vitreoretinal inducida en conejos

Se utilizaron conejos machos pigmentados, variedad Burgundy, de 1,5-2,0 kg (n: 15). Para inducir una condición similar a la PVR se realizó una inyección intravítrea de plasma homólogo rico en plaquetas (Pisella y Baudouin, 1996).

Obtención de Plasma Homólogo rico en Plaquetas (PRP)

Los animales fueron anestesiados con ketamina (25 mg/kg, Holliday-Scott SA, Argentina) y xilacina (2 mg/kg, Bayer, Argentina). Se extrajo sangre (2,5 ml) de una vena marginal de la oreja con una jeringa cargada con 0,5 ml de solución anticoagulante de ácido cítrico-citrato (ACD-Fórmula A, Rivero, Argentina). La sangre fue centrifugada a 800 g durante 5 minutos en una centrífuga refrigerada a 4° C, separándose luego cuidadosamente el sobrenadante. Una alícuota del mismo fue utilizada para medir la concentración de plaquetas en un hemocitómetro (160.000-200.000 plaquetas/mm³). El PRP fue mantenido a 4° C, por no más de 15 minutos, hasta ser inyectado en la cavidad vítrea del animal de origen.

Inyección intravítrea

El plano de anestesia fue mantenido con dosis de refuerzo de ketamina y xilacina. Antes de la inyección intravítrea de PRP, todos los animales recibieron una inyección retrobulbar de xilocaína al 2 % (Astra, Argentina). Para dilatar las pupilas se utilizó una mezcla de tropicamida 1 %, y fenilefrina 5 % (Fotoretin, Laboratorios Poen, Argentina). El fondo de ojo de todos los animales fue examinado por oftalmoscopia indirecta antes de la inyección intravítrea, y únicamente fueron incluidos en el experimento aquellos conejos con fondo de ojo normal. Las inyecciones intravítreas fueron efectuadas en el ojo derecho. A fin de evitar aumentos de la presión intraocular, se realizó una paracentesis de la cámara anterior con una aguja 30 G, extrayéndose 0,2 ml de humor acuoso. El PRP homólogo (también 0,2 ml) fue inyectado en la cavidad vítrea con una aguja 30 G insertada a través de la pars plana, a 2 mm del limbo corneal, en el cuadrante dorsonasal y depositado directamente sobre la superficie retinal del hemisferio ventral.

Después de la inyección intravítrea, todos los animales fueron examinados semanalmente con oftalmoscopia indirecta.

Preparación de las muestras

Una vez extraídas, las membranas humanas fueron extendidas sobre un filtro Millipore estéril e inmediatamente fijadas por inmersión en la mezcla fijadora durante 24 hs (ver Capítulo II).

Los conejos fueron sacrificados 10 semanas después de haber recibido la inyección intravítrea. Se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU) y se los perfundió a través del ventrículo cardíaco izquierdo con 500 ml de solución fijadora (ver Capítulo II). Después de la enucleación,

se abrió la cámara anterior para extraer córnea, cristalino y cuerpo vítreo. El segmento posterior fue mantenido en fijador durante una hora después de la disección. La criopreservación y la obtención de cortes de criostato se describen en el Capítulo II.

Inmunohistoquímica

La Tabla IV.1 contiene la descripción de todos los anticuerpos primarios utilizados. Los cortes fueron incubados con anticuerpos primarios monoclonales y policlonales contra las isoformas neuronal, endotelial e inducible de la sintasa de NO. La reacción de estos anticuerpos fue comparada con la distribución de la inmunorreacción para anticuerpos contra la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) como marcador de células gliales (Dahl y Bignami, 1982; Guerin y col., 1990b) y contra la alfa actina de músculo liso (SMA), marcador selectivo de miofibroblastos (Walshe y col., 1992). La unión de los anticuerpos a su antígeno fue revelada por procedimientos inmunoenzimáticos con el complejo avidina-biotina-peroxidasa o la amplificación con tiramida (ver Capítulo II).

Tabla IV-1. Anticuerpos primarios

Anticuerpo contra:	Abreviatura	Origen	Proveedor
NOS neuronal, péptido sintético	pNOSn	policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.
NOS neuronal	mNOSn	monoclonal de ratón	BD Transduction Labs, Lexington, KY.
NOS endotelial, péptido C-terminal	pNOSe	policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.
NOS endotelial	mNOSe	monoclonal de ratón	BD Transduction Labs, Lexington, KY.
NOS inducible, péptido C-terminal	pNOSi	policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.
NOS inducible péptido C-terminal	mNOSi	monoclonal de ratón	BD Transduction Labs, Lexington, KY.
proteína glial fibrilar ácida	GFAP	monoclonal de ratón	Biogenex, San Ramon, CA.
alfa actina de músculo liso	SMA	monoclonal de ratón	Sigma, St Louis, MO.
Receptor Y1, péptido C-terminal	Y1	policlonal de conejo	Karolinska Institute, Stockholm, Suecia

RESULTADOS

Muestras quirúrgicas humanas

Estructura histológica

Las muestras fueron cortadas perpendicularmente a la superficie de la membrana y algunos cortes fueron coloreados con hematoxilina-eosina para analizar el patrón histológico general, confirmándose las observaciones descritas en el capítulo anterior.

Básicamente, las muestras estaban formadas por una población celular heterogénea, inmersa en una matriz extracelular, observándose regiones de matriz extracelular fibrosa y laxa dentro de una misma membrana. La mayor parte de las células era de forma alargada, y generalmente se disponían en láminas paralelas a la superficie de la membrana (Fig. IV.1). Las membranas también contenían abundantes células de aspecto macrofágico, con gránulos de pigmento irregulares y de tonalidad variable, semejantes a las inclusiones de lipofucsina (Fig. IV.1). En algunas muestras pudo observarse un revestimiento epitelioide, con células cúbicas, semejantes a las células del epitelio pigmentario (Fig. IV.2).

Seis de las muestras estudiadas, correspondientes a fibrosis vitreoretinales, incluían fragmentos de tejido retinal. Estos fragmentos fueron identificados por la presencia de capas semejantes a las de la retina neural normal, aunque todos ellos presentaban cierto grado de desorganización estructural.

Sintasas de NO

En todas las membranas humanas estudiadas con el procedimiento inmunoenzimático se encontraron células con inmunorreactividad citoplasmática para las sintasas de NO neuronal y endotelial. Ambas isoenzimas fueron detectadas en células alargadas, semejantes a las observadas con hematoxilina-eosina (Fig. IV.1, C y D). Como se demostró en el Capítulo III, estas células alargadas incluyen por lo menos dos fenotipos diferentes que pueden ser identificados por la presencia de un marcador glial (GFAP) o un marcador miofibroblástico (SMA), respectivamente. A fin de verificar la presencia de las sintasas en cada uno de esos fenotipos, se marcaron cortes sucesivos de una misma membrana con los anticuerpos para GFAP, SMA y las sintasas constitutivas neuronal o endotelial. Así, pudo observarse la presencia de inmunorreactividad para ambas sintasas tanto en las células portadoras de marcadores

gliales como en aquellas portadoras de marcadores miofibroblásticos (Fig. IV.1, C-H). También se detectó inmunorreactividad para ambas sintasas constitutivas en las células de aspecto epitelial, semejantes a las del epitelio pigmentario, que revestían algunas de las membranas (Fig. IV.2). La presencia de ambas sintasas constitutivas en una misma célula fue demostrada mediante dobles marcajes.

Estos procedimientos se utilizaron también para determinar la posible co-localización de cada una de las sintasas constitutivas con el receptor Y1 del neuropéptido Y que, como demostráramos previamente, se expresa inmunohistoquímicamente en las células gliales lesionadas (ver Capítulo III). La población celular que expresaba una sintasa de NO era más numerosa que la población con inmunorreactividad para Y1. De modo que todas las células inmunomarcadas con el anticuerpo Y1, también exhibían marcación para las sintasas. Por el contrario, una importante fracción de la población positiva para las sintasas no mostraba inmunorreacción para Y1 (Fig. IV.3, A-C). En este otro grupo celular, la inmunorreactividad para las sintasas constitutivas co-localizaba con el marcador miofibroblástico SMA (Fig. IV.3, D-F).

La inmunorreactividad para la sintasa inducible sólo pudo demostrarse mediante el empleo de la técnica de amplificación con tiramida, y únicamente en células identificadas como macrófagos por la presencia de inclusiones lipofuscínicas. Estas células no presentaron inmunorreactividad para las sintasas de NO de tipo constitutivo.

En los fragmentos de retina, la expresión de las sintasas constitutivas pudo ser revelada tanto mediante el procedimiento inmunoenzimático convencional, como después de la amplificación con tiramida. Por el contrario, ninguno de dichos procedimientos permitió detectar la expresión de la variedad inducible. Salvo por la presencia de sintasa neuronal en algunas células amacrinas, la inmunorreactividad para

sintasas constitutivas estaba restringida a células con la distribución y disposición de las células de Müller (Fig. IV.4). La identidad glial de estas células fue verificada por la co-localización con los marcadores GFAP (Fig. IV.5, A-C) e Y1. No se observó inmunorreacción para sintasas de NO en células de Müller de las retinas humanas normales, ni en las zonas de los fragmentos quirúrgicos donde la histoarquitectura de la retina estaba relativamente conservada. En estas regiones tampoco se detectó inmunoreactividad para GFAP, que sólo aparecía en las células de Müller injuriadas. Las células de Müller no exhibieron inmunoreactividad para actina de músculo liso, que tampoco apareció en otras célula de la retina neural.

PVR experimental en el conejo

Tanto la presencia de sintasas de NO en las células de Müller de la retina humana lesionada, como en las células de origen glial (Y1 y GFAP positivas) de la membrana, sugirieron que parte de las células que expresan sintasas de NO en las membranas podrían derivar de la glía retinal. Por lo tanto, se indujo una PVR experimental en el conejo a fin de verificar si el desarrollo de esta patología era acompañado por la expresión inmunohistoquímica de sintasas de NO en células de la retina y las membranas.

Los exámenes oftalmoscópicos efectuados después de la inyección intravítrea de PRP, demostraron la presencia de lesiones semejantes a la PVR humana de grados A y B (The Retina Society, 1983). Estas lesiones aparecieron en algunos conejos cuatro semanas después de la inyección intravítrea. Estos animales fueron sacrificados a las 10 semanas, cuando las membranas eran un poco más extensas, pero no habían alcanzado grados más severos de PVR.

Las membranas inducidas en el conejo estaban adheridas a la cara vítrea de la retina y estaban formadas por un tejido de aspecto conectivo laxo: abundante matriz extracelular no fibrosa con numerosas células alargadas o estrelladas. Las preparaciones también contenían células de aspecto macrofágico, cargadas de inclusiones lipofuscínicas, sueltas en la cavidad o dentro de las membranas. En las zonas adyacentes a las membranas la histoarquitectura de la retina aparecía desorganizada, especialmente a nivel de las zonas desprendidas (Fig. IV.6, A).

El estudio de las membranas de conejo mediante el procedimiento inmunoenzimático demostró la presencia de las tres sintasas de NO en la mayor parte de sus células (Fig. IV.6, B), algunas de las cuales también expresaban el marcador miofibroblástico SMA. En la retina normal, sólo se detectó inmunorreactividad para la sintasa de NO neuronal en algunas células amacrinas y amacrinas desplazadas (Fig. IV.6, C). En las zonas de histoarquitectura desorganizada, próximas a la inserción de las membranas o en zonas de desprendimiento, las prolongaciones vítreas de las células de Müller mostraban inmunomarcación para cualquiera de las tres isoenzimas (Fig. IV.6, D).

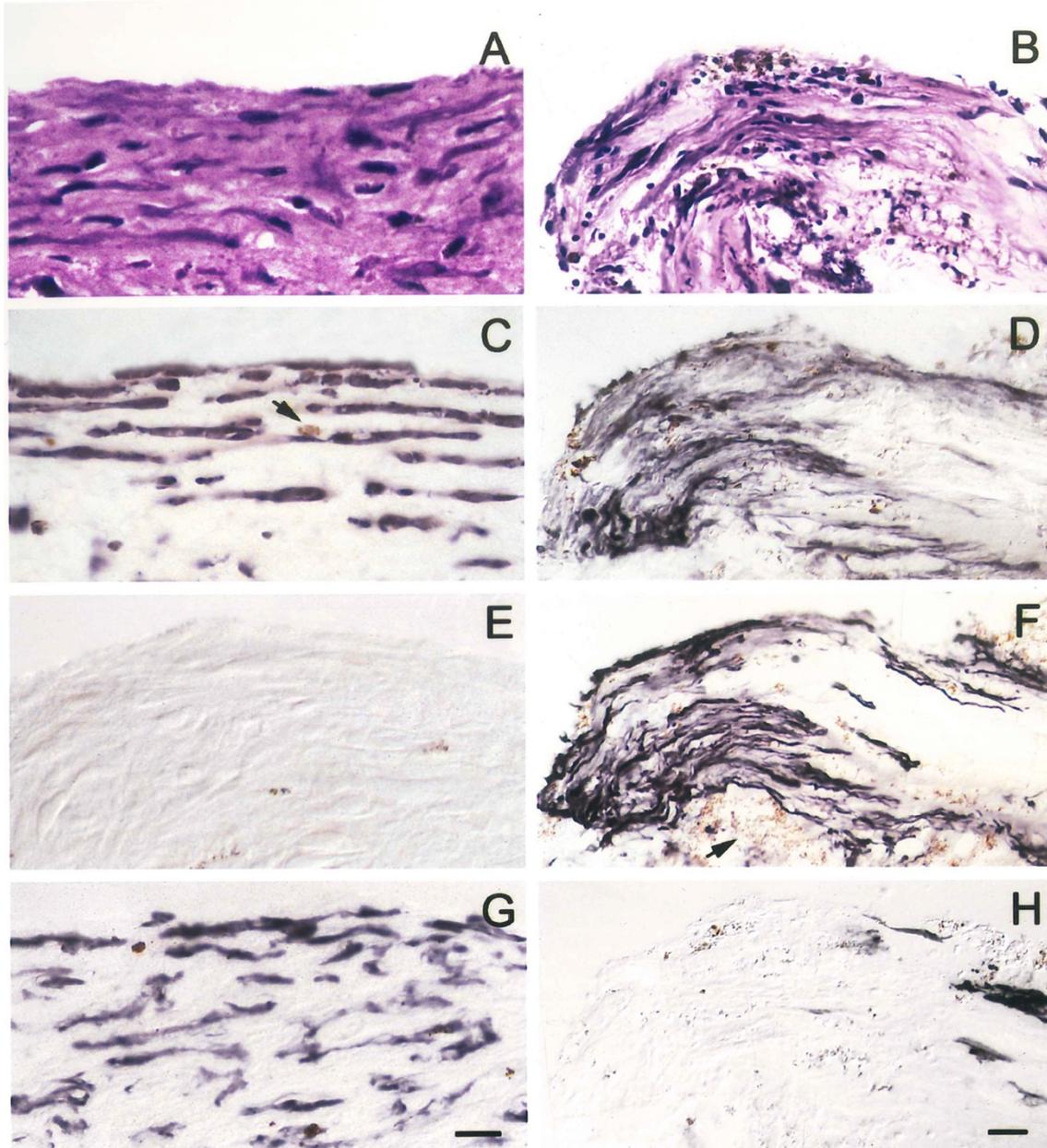


Figura IV.1. Cortes de membrana de PVR humanas observadas con microscopía de luz y óptica de Nomarski.

A - B. Cortes coloreados con hematoxilina-eosina en los que se observan numerosas células alargadas dispuestas en capas paralelas e inmersas en una matriz extracelular fibrosa (A) o laxa (B).

C - D. Cortes adyacentes a los mostrados en A y B, teñidos con el anticuerpo contra la sintasa de NO neuronal, revelado con el método de la avidina-biotina-peroxidasa. Obsérvese que el depósito negro de la inmunorreacción aparece en la mayor parte de las células.

E - F. Cortes sucesivos a los anteriores inmunomarcados con GFAP. Solo se observa inmunorreactividad en F, donde las células alargadas se encuentran rodeadas por una matriz laxa.

G - H. Cortes sucesivos a los anteriores inmunomarcados con SMA. El anticuerpo contra SMA solo reacciona con células similares a las marcadas con las sintasas de NO en G, donde la matriz extracelular es más densa que en H.

Las flechas indican células de aspecto macrofágico con gránulos de pigmento intracitoplasmáticos semejantes a gránulos de lipofucsina. Barras de calibración para cada columna: 25 μm .



Figura IV.2. Corte perpendicular a la superficie de una membrana de PVR humana que muestra células de aspecto epitelial inmunomarcadas con el anticuerpo contra la sintasa de NO de tipo endotelial. A pesar de la ausencia de microvellosidades y de la protrusión del citoplasma apical, la morfología y los gránulos de pigmento sugieren que se trata de células derivadas del EPR. Barra de calibración: 10 μm

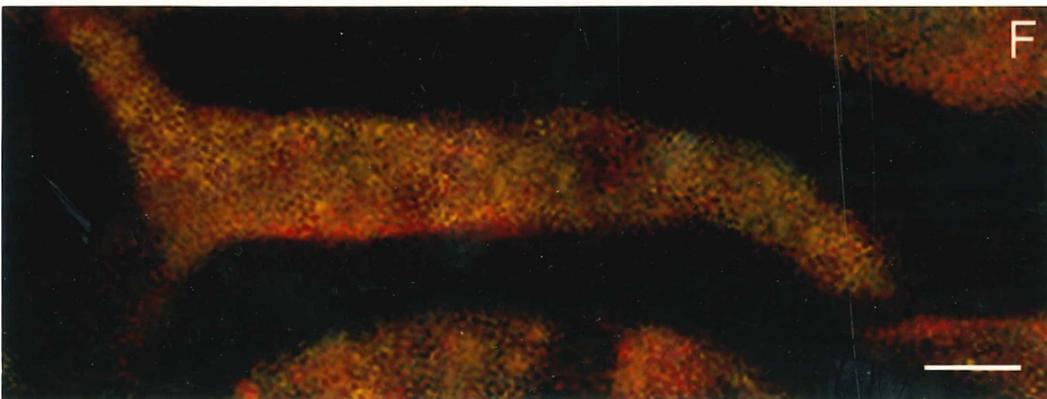
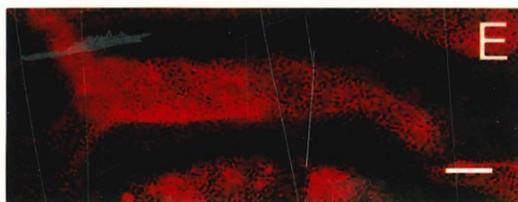
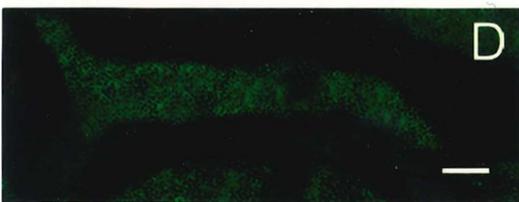
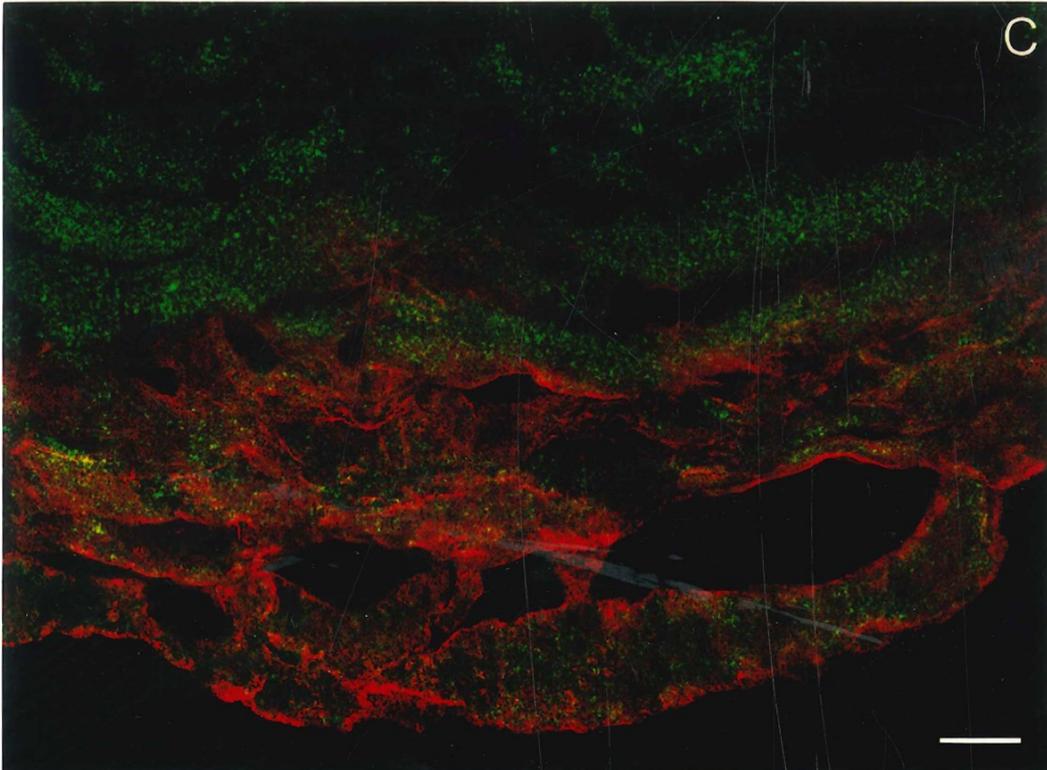
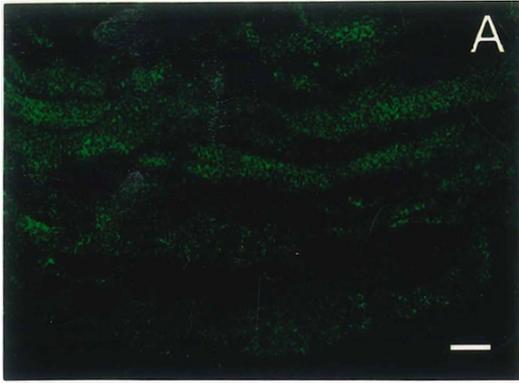


Figura IV.3. Figura IV.3. Microfotografías obtenidas por microscopía confocal de membranas de PVR humanas teñidas con procedimientos inmunofluorescentes contra dos marcadores diferentes:

A – C. La inmunofluorescencia contra sintasa de NO endotelial (verde) aparece en células alargadas distribuidas en todo el espesor de la membrana, mientras que la inmunofluorescencia contra el receptor Y1 (rojo) marca la periferia de células de morfología similar, pero menos numerosas y restringidas a una superficie de la membrana. En C, la superposición de A y B, se puede apreciar la co-localización de la sintasa de NO y el receptor Y1 en las células detectadas en B, mientras que en el resto de la membrana las células expresan exclusivamente inmunofluorescencia para la sintasa de NO endotelial. Barras de calibración: 20 μm .

D – F. En otro corte de la misma membrana, en la zona negativa para Y1, las marcaciones inmunofluorescentes para la sintasa de NO endotelial (verde) y el marcador miofibroblástico SMA (rojo) co-localizan en una cierta proporción de las células. Barra de calibración, 5 μm .

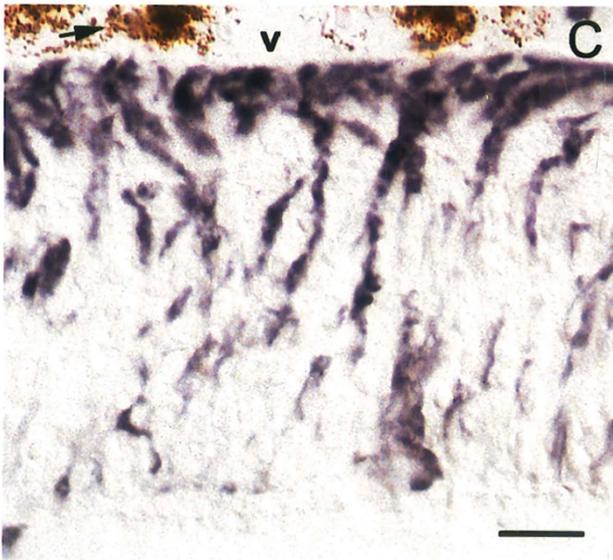
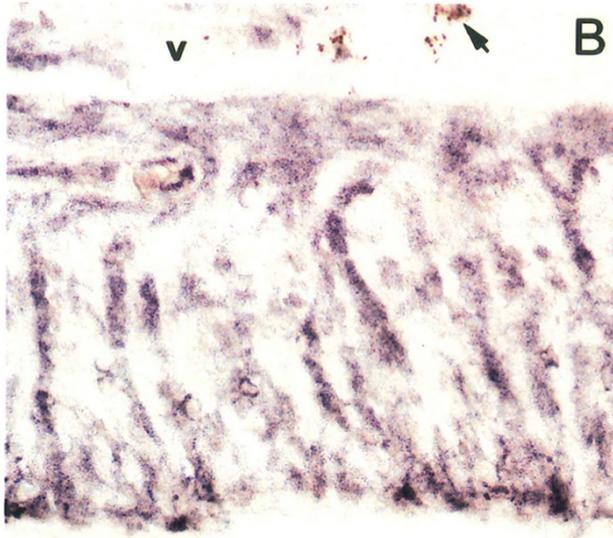
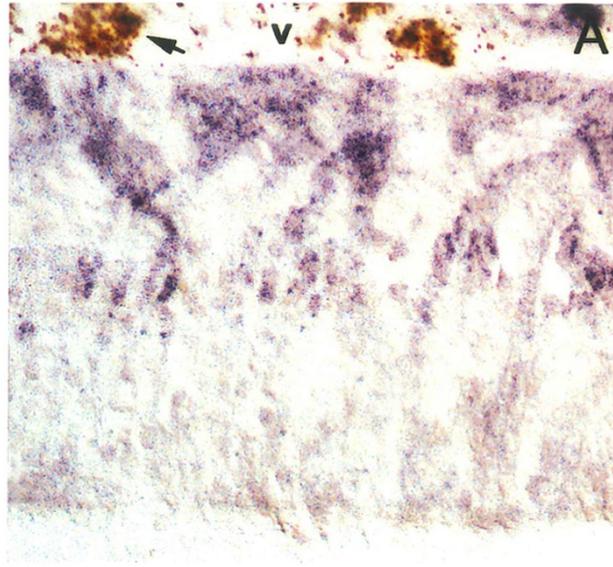


Figura IV.4. A – C. Cortes sucesivos de un fragmento de retina lesionada asociada a una membrana de PVR humana inmunoteñidos con anticuerpos contra sintasa de NO neuronal (A), sintasa de NO endotelial (B) y GFAP (C). Los depósitos negros corresponden a inmunorreactividad revelada por la técnica de la avidina-biotina-peroxidasa. En los tres cortes sucesivos la inmunorreactividad se encuentra en células alargadas que atraviesan la retina en sentido ápico-basal. La inmunorreactividad para GFAP, junto con la morfología y distribución de las células sugiere que los tres anticuerpos marcan células de Müller. Las flechas indican la presencia de acúmulos de pigmento en la cavidad vítrea (v), próximos a la superficie de la retina. Barra de calibración: 20 μ m.

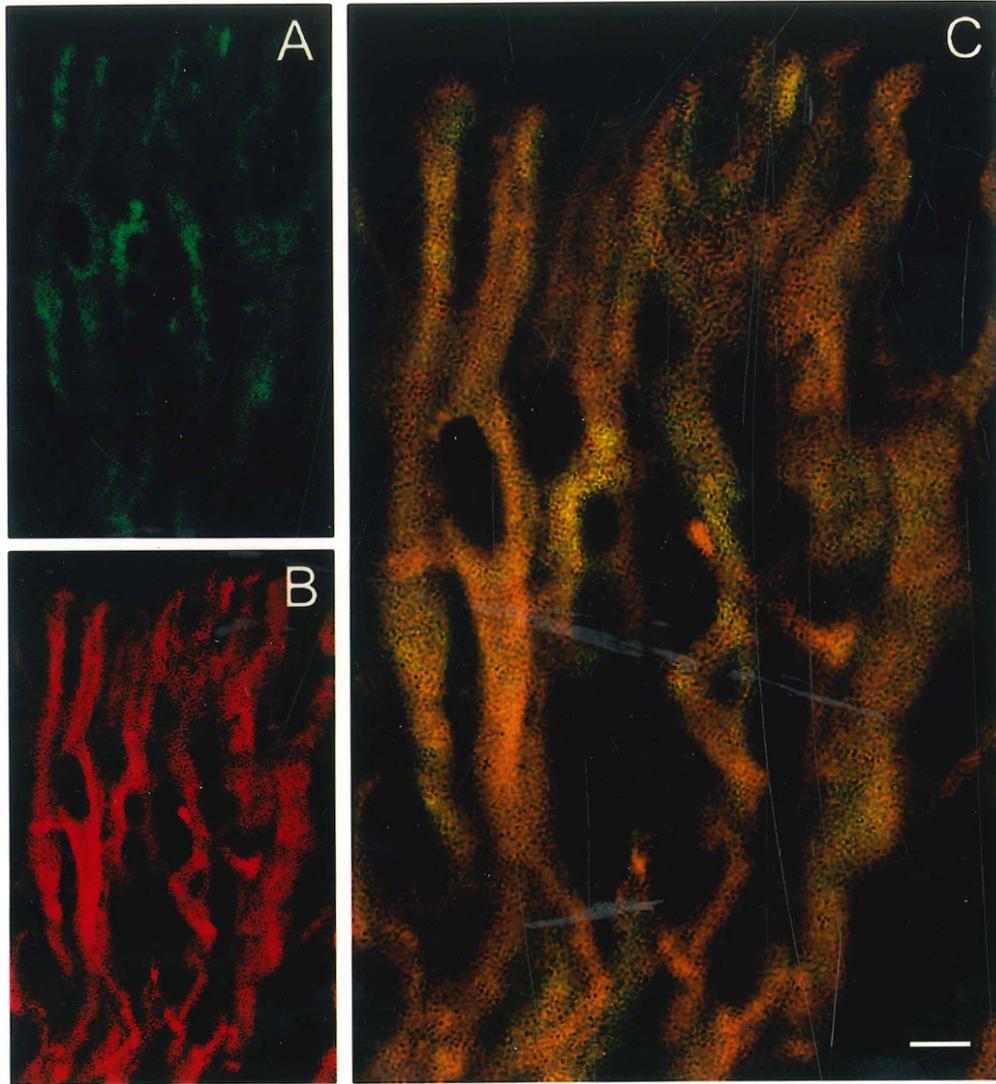


Figura IV.5. Imágenes obtenidas con microscopía confocal de un fragmento de retina lesionada por PVR. La inmunofluorescencia verde corresponde a la sintasa de NO endotelial, y la roja corresponde a GFAP. La imagen combinada (C) demuestra que ambos marcadores co-localizan en las mismas células, que atraviesan ápicobasalmente la retina. En la parte inferior de la figura se observan prolongaciones que parecían extenderse hacia una membrana adherida a la retina (no incluida en la figura). La presencia del marcador glial GFAP y la forma de las células sugiere que se trata de células de Müller en proceso de transformación fenotípica. Barra de calibración: para A y B, 10 μm ; para C, 5 μm .

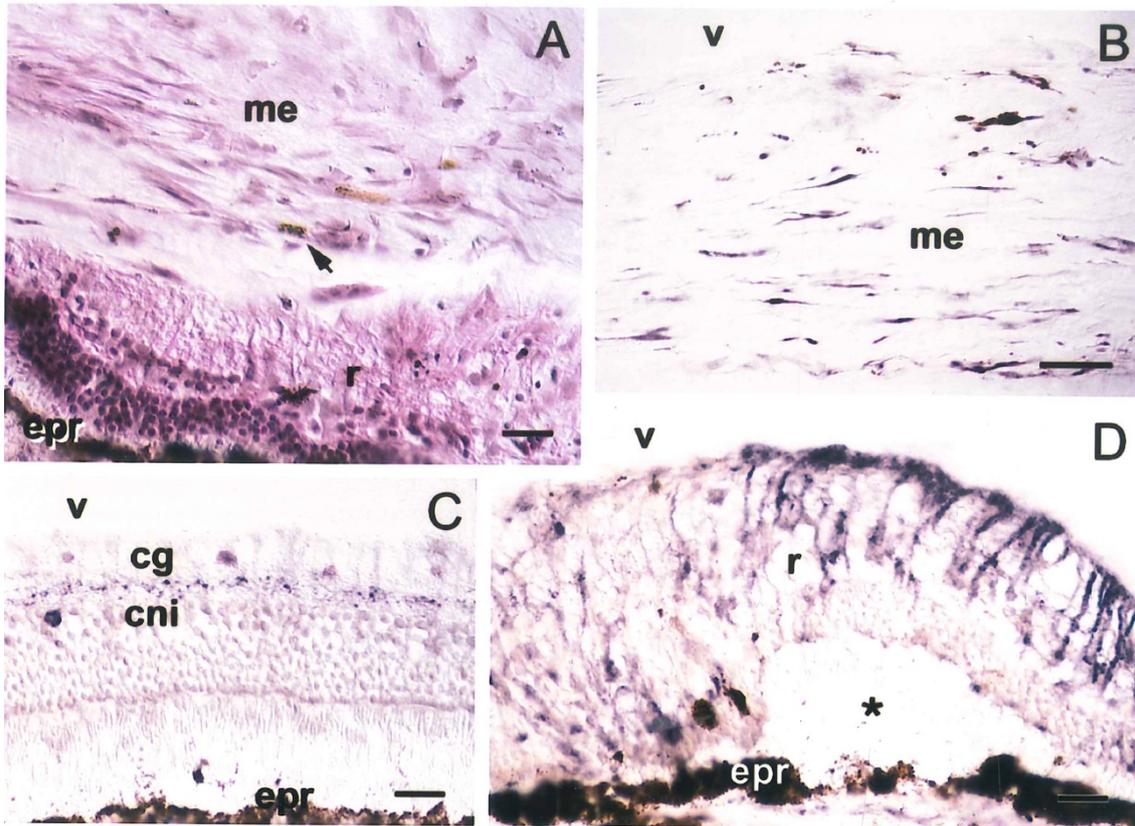


Figura IV.6. Cortes de la parte posterior del ojo de conejos. A, B y D, sacrificados 10 semanas después de la inyección intravítrea de plasma rico en plaquetas (PRP), C. ojo control. **cg**, capa de células ganglionares; **cni**, capa nuclear interna; **epr**, epitelio pigmentario de la retina; **me**, membrana epiretinal; **r**, retina neural; **v**, cavidad vítrea.

A. En este corte coloreado con hematoxilina-eosina se muestra una extensa membrana epiretinal, con células alargadas inmersas en una matriz extracelular laxa. Nótese la presencia de células pigmentadas de aspecto macrofágico (flecha). La membrana está adherida a la superficie vítrea de la retina, que presenta distintos grados de alteración histoarquitectónica. Barra de calibración, 50 μ m.

B. A mayor magnificación se muestra otro corte de la misma membrana inmunoteñido para sintasa de NO neuronal y revelado con avidina-biotina-peroxidasa. Los depósitos negros indican que una población celular de la membrana expresa inmunorreactividad para esta sintasa. Barra de calibración: 50 μ m.

C. Corte ápicobasal de la retina de un conejo normal inmunomarcado para sintasa de NO neuronal. En la retina normal, los elementos inmunorreactivos de color negro azulado corresponden a cuerpos neuronales y fibras nerviosas. Se observa una célula amacrina en la capa nuclear interna, cerca del borde izquierdo de la figura, y algunas amacrinas desplazadas en la capa de células ganglionares. Las fibras inmunorreactivas aparecen como una banda de puntos oscuros entre las dos capas celulares mencionadas. Barra de calibración: 50 μ m.

DISCUSIÓN

Este estudio inmunohistoquímico demostró que ambas sintasas constitutivas de NO pueden ser detectadas en las membranas de PVR humanas, así como en la retina lesionada cercana a las membranas. Estas sintasas se encontraron en todas las muestras quirúrgicas de PVR humana, y también en las retinas y membranas de conejo con inyección intravítrea de PRP. En estas últimas también había inmunorreactividad para la isoforma inducible, que en las muestras humanas sólo fue detectada en macrófagos.

Mientras que en la retina normal la sintasa neuronal únicamente aparece en una pequeña subpoblación de neuronas (Kim y col., 1999; Neufeld y col., 2000), las retinas lesionadas expresan abundantemente las dos isoenzimas constitutivas, tanto en el humano como en el conejo, y sintasa inducible, exclusivamente en el conejo. En todas las retinas afectadas, las sintasas aparecían en las células de Müller, que normalmente no expresan esta actividad enzimática. En estas células, la inmunorreactividad para las sintasas se correlacionaba con la expresión de GFAP y el receptor Y1 del NPY, cuya presencia indica injuria e hiperreactividad de esta población glial (Cantó Soler y col., 2002).

Se conoce bien que en los estadios iniciales de esta enfermedad, las células gliales proliferan y migran fuera de la retina para constituir las membranas, tanto epirretinales como subretinales (Laqua y Machemer, 1975a). El desprendimiento de la retina estimula la proliferación de las células de Müller y una hipertrofia de sus prolongaciones celulares (Lewis y col., 1999), así como la expresión de GFAP (Okada y col., 1990). Al igual que la hiperexpresión de GFAP, la hiperexpresión de las sintasas de NO también ocurre en otros tipos de injuria retinal con hipertrofia e hiperplasia de la glia de Müller (Abu El-Asrar y col., 2001; Kobayashi y col., 2000). Es difícil predecir la

acción del NO sobre el control de la proliferación celular, ya que existen efectos positivos y negativos. Así, las concentraciones altas de NO, semejantes a las producidas por la sintasa inducible, son capaces de bloquear la proliferación de diversos tipos celulares (Sarkar y col., 1997), incluyendo la microglia (Kawahara y col., 2001). Por otro lado, la proliferación de astrocitos de rata estimulados por ciertos antígenos depende de NO (Kawahara y col., 2001).

Las sintasas de NO presentes en las células de las membranas también podrían intervenir en el control de la proliferación, pero probablemente son de mayor importancia para la fibrogénesis.

El efecto de NO sobre la fibrosis es muy complejo. Por un lado estimula la síntesis de los colágenos (Morishima y col., 2001). Los fibroblastos de las heridas sintetizan más colágeno que los normales, y esta diferencia puede correlacionarse con los niveles de NO producidos en cada caso (Witte y col., 2000). Además, los fibroblastos normales cultivados en presencia de un dador de NO aumentan su síntesis de colágeno alrededor de un 75 % (Witte y col., 2000). Por otro lado, NO participa en la remodelación de la matriz mediante cambios en la expresión de metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y/o los inhibidores tisulares de las mismas (TIMPs) (Eagleton y col., 2002). Es interesante señalar que en pacientes sometidos a vitrectomía por desprendimiento de retina, los niveles de las metaloproteinasas se correlacionan con el desarrollo postoperatorio de una PVR (Kon y col., 1998).

La síntesis endógena de NO parece ser un modulador clave de las respuestas fibróticas en numerosos órganos (Hogaboam y col., 1998). Actualmente se desconoce el papel específico de cada isoforma en las lesiones fibróticas. Algunos estudios inmunohistoquímicos demuestran que en la fibrosis pulmonar aumenta la expresión de la isoforma inducible, mientras que se reduce la expresión de la isoforma endotelial

(Saleh y col., 1997). Sin embargo, otros estudios sugieren que el aumento de sintasa inducible desempeñaría un rol antifibrótico, porque las grandes concentraciones de NO producidas moderarían la fibrogénesis excesiva (Ferrini y col., 2002). Por otra parte en los ratones con pérdida del gen de la sintasa inducible las cicatrices son dos veces más fibrosas que en los ratones normales (Most y col., 2001). Por lo tanto, las diferencias en el grado de fibrosis de las membranas humanas y del conejo, podrían estar relacionadas con la distinta combinación de isoformas constitutivas e inducible en cada una.

La regulación transcripcional de la forma inducible es bien conocida, y se han identificado diversos sitios activadores del promotor, uno de los cuales depende del factor NF-KB (Kristof y col., 2001). El mismo NO puede controlar la transcripción del gen de la sintasa inducible inhibiendo la unión del NF-KB al ADN (Park y col., 1997). Se ha propuesto que en los astrocitos, el NO endógeno que regula la actividad del factor de transcripción NF-KB sería producido por la sintasa neuronal (Togashi y col., 1997). En la retina humana lesionada, las sintasas constitutivas podrían ejercer un papel similar, explicando así la ausencia de inmunorreactividad para la isoforma inducible.

En las membranas existen varios tipos celulares capaces de producir matriz extracelular. Nuestras observaciones sugieren que las células de origen glial suelen segregarse en las regiones de la membrana con menor cantidad de matriz extracelular, mientras que los miofibroblastos ocupan las regiones con mayor contenido de fibras. Estudios de otros autores confirman esta asociación (Morino y col., 1990; Hiscott y Grierson, 1991). Aunque ambos tipos celulares expresan las mismas sintasas de NO, el fenómeno de fibrogénesis obedece a causas multifactoriales y no depende solamente de los niveles de NO, sino de su combinación con otros factores de crecimiento y citoquinas. Esto hace aún más interesante el estudio de la síntesis y liberación de NO en los distintos momentos del desarrollo de una PVR, ya que su regulación podría ser

beneficiosa para evitar o disminuir el fenómeno fibrótico que conduce a los desprendimientos traccionales característicos de la última etapa de esta enfermedad.

CAPÍTULO V

EFFECTOS DE LA DISPASA INTRAVÍTREA EN EL RATÓN: UN NUEVO MODELO DE PROLIFERACIÓN VITREORETINAL

INTRODUCCIÓN

Nuestros estudios inmunohistoquímicos de membranas humanas hicieron ver la necesidad de contar con modelos experimentales idóneos para analizar los factores involucrados en su patogenia. Existen numerosos modelos en conejos descritos en la literatura (ver Capítulo I), y nuestros primeros ensayos, descritos en el capítulo anterior, se hicieron inyectando plasma rico en plaquetas en el vítreo del conejo (Pisella y Baudouin, 1996). Este procedimiento induce la formación de membranas intravítreas, semejantes a las de la PVR, pero se requieren diez o más semanas para su desarrollo. Su mayor inconveniente, sin embargo, es que no permite el análisis de las etapas tempranas de la patogenia de esta enfermedad. Por otra parte, es difícil obtener conejos genéticamente puros, el mantenimiento de estos animales es costoso, y el tiempo requerido para su examen oftalmoscópico complica el estudio de grupos grandes de animales. Teniendo en cuenta estos factores, se decidió establecer un modelo experimental en ratón, una especie que permite superar las dificultades enunciadas. Se eligió como inductor de PVR la inyección intravítrea de dispasa, una proteína neutra purificada de *Bacillus polymyxa*, recientemente utilizada para inducir una condición semejante a la PVR en el conejo (Frenzel y col., 1998).

En este trabajo describimos que la inyección intravítrea de dispasa en ratones pigmentados C57BL/6J induce de manera reproducible una condición similar a la PVR, que se inicia con la invasión de células en la cavidad vítrea, es seguida por la aparición

de pliegues retinales, y concluye con el crecimiento de membranas intravítreas y subretinales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inyección intravítrea

Antes de la inyección intravítrea se evaluó el fondo de ojo de todos los ratones y únicamente se incluyeron en el experimento aquellos animales sin anomalías detectables. Se inyectaron 102 ratones con los siguientes objetivos: (1) describir la evolución cronológica de los signos oftalmoscópicos y realizar el análisis estadístico del modelo (n = 67); (2) correlacionar el contenido del vítreo en los ojos tratados con algunos signos oftalmológicos observados (n = 9); (3) realizar los estudios inmunohistoquímicos (n = 36).

Para la inyección intravítrea los ratones fueron anestesiados con ketamina HCl (100 mg/kg) y además recibieron una gota de lidocaína 1 % (Xilocaína, Astra, Argentina) como anestésico local. Para dilatar la pupila se utilizó una mezcla de fenilefrina 5 % y tropicamida 1 % (Fotoretin, Labs. Poen, Argentina). Las inyecciones se hicieron bajo control oftalmoscópico en el cuadrante dorsonasal del ojo derecho, a nivel del ecuador, con una jeringa Hamilton y una aguja 30 G 1/6 colocada en el interior de una cánula de teflón; de este modo sólo se introdujo en la cavidad vítrea la porción biselada de la aguja. Se utilizó una aguja nueva para cada animal, inyectándose 3µl de solución salina estéril en los controles y el mismo volumen de Dispasa/colagenasa (Sigma, St. Louis, MO. EEEE) en una concentración de 0,2 ó 0,4 U/µl en solución salina estéril en los grupos tratados.

Examen oftalmoscópico

Los ratones fueron anestesiados y sus pupilas dilatadas de la misma manera que para la inyección intravítrea. Se aplicó suavemente un cubreobjetos sobre la superficie corneal utilizando una gota de gel oftalmológico (Viscotears, CIBAVision, Argentina) como intermediario. De este modo fue posible visualizar el fondo de ojo con un microscopio quirúrgico (Zeiss S5) conectado a un monitor y un videograbador. Las observaciones fueron realizadas por una investigadora que no conocía el tratamiento recibido por cada animal. Se registraron los siguientes signos oftalmoscópicos: hemorragia intravítrea, tejido cicatrizal en el sitio de la inyección, puntos brillantes dentro de la cavidad vítrea o sobre la superficie retinal, turbidez del vítreo, bandas vítreas, pliegues retinales en un cuadrante, pliegues retinales en dos o más cuadrantes, membranas epiretinales en un cuadrante, membranas epiretinales en dos o más cuadrantes. La presencia de cada uno de estos signos fue consignada en planillas semanales correspondientes a cada animal. Algunas de las imágenes de los fondos de ojo fueron grabadas y digitalizadas con una computadora Silicon Graphics O2.

Análisis de la evolución cronológica de los signos oftalmoscópicos

Para el análisis evolutivo de los signos oftalmoscópicos se utilizaron 67 ratones inyectados que fueron examinados en la 1^a, 2^a, 4^a, 6^a y 8^a semana después del tratamiento. Una vez finalizados todos los exámenes, los ratones fueron agrupados según el tratamiento recibido y la ausencia o presencia de hemorragia intravítrea. La presencia de tejido cicatrizal en el sitio de lesión fue excluida del análisis, ya que no puede ser considerado como indicio de PVR. También se excluyó la turbidez de vítreo, puesto que apareció solamente en dos animales durante la primera semana de tratamiento. Para los restantes signos oftalmoscópicos se calculó el porcentaje en cada grupo experimental, para cada una de las semanas estudiadas.

Para evaluar la severidad de las lesiones oculares se definió, para cada animal en cada una de las semanas, una escala oftalmoscópica como la suma de los signos de PVR observados. Los signos analizados fueron: puntos brillantes intravítreos, pliegues retinales en un solo cuadrante, pliegues retinales en dos o más cuadrantes, membranas epiretinales en un cuadrante, membranas epiretinales en dos o más cuadrantes. Se sumó un punto por cada uno los signos presentes, de modo que el rango de esta escala fue de 0 a 5. Las bandas vítreas no fueron incorporadas a la escala porque su presencia no pudo ser confirmada histológicamente.

Los valores de la escala para cada grupo experimental en cada una de las semanas analizadas, fueron comparados estadísticamente con un Análisis de Varianza de Doble Vía para Muestras Independientes (ANOVA, GraphPad Prism version 3.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA). La significación estadística de las diferencias observadas fue evaluada por la prueba de Tukey HSD (Lowrrey, 2001).

Análisis del contenido vítreo en fresco

A fin de verificar la estructura histológica de los puntos brillantes intravítreos observados en el fondo de ojo, se inyectaron ratones con solución salina, 0,2 U/ μ l de dispasa y 0,4 U/ μ l de dispasa (3 por cada tratamiento). Una semana después de la inyección intravítrea se los examinó oftalmoscópicamente para determinar la presencia o ausencia de puntos brillantes y se los sacrificó con una sobredosis de hidrato de cloral (10 mg/g de peso). Los ojos enucleados fueron disecados, el vítreo fue montado en fresco sobre un portaobjetos y observado inmediatamente con microscopía de luz.

Análisis histológico e inmunohistoquímico

Los animales utilizados para la evaluación oftalmoscópica fueron sacrificados al final del periodo experimental (8 semanas). Otros 36 ratones (12 para cada tratamiento,

salina, 0,2 y 0,4 U/ μ l de dispa) fueron examinados oftalmoscópicamente y sacrificados durante las semanas 1, 2, 4 ó 6 después de la inyección intravítrea (3 por tratamiento por semana). Los animales recibieron una sobredosis de hidrato de cloral (10 mg/g de peso) y fueron perfundidos a través del ventrículo cardíaco izquierdo con 60 ml de solución fijadora (ver Capítulo II). Los ojos fueron enucleados y disecados extrayéndose el segmento anterior. El segmento ocular posterior, conteniendo el cristalino y el vítreo, fue mantenido en fijador durante una hora y transferido a las soluciones criopreservadoras (ver Capítulo II). Los dos ojos de cada animal, inyectado y no inyectado, fueron congelados en un mismo bloque con acetona enfriada en N₂ líquido después de la extracción del cristalino.

Se obtuvieron cortes de criostato que fueron incubados con diferentes anticuerpos primarios marcadores de astrocitos, células de Müller, células del epitelio pigmentario de la retina, macrófagos y linfocitos T (Tabla V.1). La presencia de inmunorreactividad fue detectada con dos procedimientos inmunoenzimáticos, utilizándose el complejo avidina-biotina-peroxidasa con 3-3'-diamino-benzidina y níquel como sustrato; o un complejo Ig-fosfatasa alcalina con naftol y Fast Red como sustratos (ver Capítulo II). Para estudiar la co-localización de marcadores se emplearon las técnicas de inmunofluorescencia indirecta o la de amplificación con tiramida y microscopía confocal (ver Capítulo II). En todos los casos se hicieron los blancos correspondientes desprovistos del anticuerpo primario. Cortes consecutivos a los utilizados para inmunohistoquímica fueron coloreados con rojo neutro.

Tabla V.1. Anticuerpos primarios utilizados para inmunohistoquímica

Anticuerpo contra:	Abreviatura	Origen	Proveedor
Antígeno F4/80	F4/80	Monoclonal de rata	Serotec, Oxford, UK
Glutamino sintetasa	GS	Policlonal de conejo	Dr. A. Marmorstein, Cole Institute, Cleveland, OH
Proteína glial fibrilar ácida	GFAP	Policlonal de conejo	Dako Corp., Carpinteria, CA
Proteína RPE65	RPE65	Monoclonal de ratón	Dr. D. Thompson, University of Michigan, Ann Arbor, MI
Receptor CD3	CD3	Policlonal de cabra	Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ

RESULTADOS

Examen oftalmoscópico

Todos los animales inyectados mostraron una respuesta normal a la luz y no se detectaron signos de inflamación en la cámara anterior del ojo. Durante la primera y segunda semana se observó que un 26 % de los animales inyectados con salina (n = 23) tenían hemorragia intravítrea, mientras que en los animales tratados con dispasa 0,2 y 0,4 U/ μ l el porcentaje de animales con hemorragia intravítrea fue de 63 % y 68 % respectivamente (n = 19 y 25). Algunas de estas hemorragias desaparecieron antes de la octava semana. Teniendo en cuenta que la presencia de sangre en la cavidad vítrea es un conocido inductor de la PVR (Cleary y Ryan, 1979; Yoshino y col., 1989; Girard y col., 1994), cada grupo de tratamiento fue subdividido en dos subgrupos de acuerdo a la presencia o ausencia de hemorragia durante la primera y segunda semanas después de la inyección.

Durante la primera semana la observación oftalmoscópica más frecuente (32/64 ojos) fueron pequeños puntos brillantes en el vítreo o sobre la superficie de la retina, generalmente en el hemisferio ventral. El análisis microscópico del contenido del vítreo demostró que reflejaban la presencia de células pigmentadas, aunque también se observaron algunos gránulos de pigmento sueltos. Estas observaciones fueron luego confirmadas en los cortes histológicos (ver más adelante), y en lo sucesivo el signo es descrito como acúmulos intravítreos pigmentados. Durante esta primera semana también se observaron bandas vítreas y pliegues retinales. Las bandas vítreas aparecían como delgadas hebras blanquecinas sobre el plano retinal. Los pliegues aparecieron como pequeñas líneas blanquecinas por debajo del plano vascular de la retina. Tanto el número de pliegues como la longitud y el grosor de los mismos aumentó durante las semanas posteriores. Las membranas epiretinales se observaron por encima del plano retinal y generalmente mostraron zonas pigmentadas. En la Figura V.1 se ilustran algunas de las principales diferencias entre el fondo de ojo de los ratones inyectados con salina y los inyectados con dispasa. En algunos casos se observaron desprendimientos de retina, pero esto ocurrió sólo en animales que habían desarrollado una membrana epiretinal extensa.

Las bandas vítreas fueron observadas en pocos animales y su frecuencia no incrementó significativamente durante las semanas siguientes. Por el contrario, la frecuencia de cada uno de los otros signos fue en aumento hasta el final del periodo experimental (Figuras V.2 y V.3). En los ojos no-hemorrágicos, la comparación de los histogramas muestra que los acúmulos intravítreos pigmentados, las bandas vítreas y los pliegues retinales fueron los signos de PVR más precoces, manifestándose durante la primera semana después de la inyección intravítrea de dispasa. Los acúmulos intravítreos pigmentados y los pliegues retinales también aparecieron en ratones

inyectados con salina, pero en un periodo más tardío y sólo en una pequeña proporción de animales. La extensión de los pliegues retinales a dos o más cuadrantes ocurrió muy pronto en animales inyectados con 0,4 U/ μ l de dispasa, y rara vez fue observada en animales inyectados con la dosis menor de dispasa o con salina. Los histogramas muestran claramente que los pliegues retinales siempre aparecieron antes que las membranas. Estas sólo fueron observadas en animales tratados con dispasa, y siempre después de la sexta semana. Las membranas extensas, que cubrían más de un cuadrante, sólo aparecieron en los animales inyectados con la dosis mayor de dispasa, siempre en las últimas semanas del periodo experimental.

Los ojos con hemorragia sufrieron una evolución similar, pero más rápida (Figuras V.2 y V.3). Todos los animales con hemorragia presentaron acúmulos intravítreos pigmentados, pero estos eran mucho más frecuentes en los ojos inyectados con dispasa. Las bandas vítreas se observaron con mayor frecuencia en los animales inyectados con salina y dispasa 0,2 U/ μ l, que en aquellos inyectados con la dosis mayor de dispasa. Probablemente, los pliegues retinales y las membranas epiretinales más extensas de los animales con mayor concentración de dispasa dificultaron la detección de las bandas. En los ojos inyectados con dispasa que hicieron una hemorragia inicial, los pliegues retinales aparecieron durante la primera semana y hacia el final del periodo experimental se encontraban en casi el 100 % de los animales. La extensión de los pliegues retinales hacia otros cuadrantes ocurrió antes en los ojos hemorrágicos que en los no-hemorrágicos y, al finalizar el periodo experimental, cerca del 75% de los ratones inyectados con dispasa mostraban pliegues en dos o más cuadrantes. También en los ojos hemorrágicos, como en los no-hemorrágicos, las membranas epiretinales fueron detectadas al menos una semana después que los pliegues retinales. El número de ojos con membranas extensas fue mayor en los hemorrágicos que en los no-hemorrágicos.

En los ojos inyectados con salina, aún con hemorragia inicial, se observaron muy pocos signos de tipo PVR. Los pliegues retinales sólo aparecieron en una pequeña proporción de animales, y no antes de la sexta semana de evolución. Tampoco se observaron pliegues retinales ni membranas epiretinales que ocuparan más de un cuadrante.

Como se puede apreciar, la inyección de dispasa indujo un fenómeno complejo con diversas modificaciones patológicas. Para comparar la gravedad de las distintas condiciones experimentales se definió una escala oftalmoscópica, tal como se describió en materiales y métodos. La figura V.4 muestra, para cada semana del estudio, el valor promedio en esta escala de los distintos grupos experimentales. El análisis estadístico demostró diferencias significativas entre los animales inyectados con salina y los inyectados con dispasa, tanto en los ojos hemorrágicos como en los no-hemorrágicos. En los ojos hemorrágicos, el puntaje de la escala oftalmoscópica siempre fue mayor que en los ojos no-hemorrágicos. Las dos concentraciones de dispasa tuvieron efectos significativamente distintos únicamente durante las dos primeras semanas de evolución en los ojos con hemorragia. Al comparar los efectos de la concentración mayor de dispasa entre los ojos hemorrágicos y no-hemorrágicos, se encontraron valores significativamente mayores en los ojos hemorrágicos desde la semana 1 hasta la semana 6, mientras que en los ojos inyectados con $0,2 \text{ U}/\mu\text{l}$ estas diferencias se detectaron desde la semana cuatro hasta el final del experimento. Estos resultados sugieren una relación entre los fenómenos dependientes de dispasa y los dependientes de la hemorragia; sin embargo no se detectó una interacción estadísticamente significativa entre los dos factores.

Observaciones histológicas e inmunohistoquímicas

La evolución de la lesión inducida por dispasa fue analizada en cortes de ojos de ratones sacrificados en diferentes momentos de la evolución. Como ya se había

demostrado con el examen en fresco, los cortes histológicos confirmaron que los puntos brillantes del examen oftalmoscópico correspondían a células redondas con gránulos pigmentados libres en la cavidad vítrea (Figura V.5, A y B). Los pliegues retinales aparecieron como microdesprendimientos localizados, con escasa ampliación del espacio subretinal, que afectaban principalmente la retina externa (Figura V.5, C). En etapas más avanzadas, la retina mostró pliegues más complejos y estructuras con forma de roseta. Rara vez se observaron desprendimientos de retina con grandes espacios subretinales, y sólo en aquellos ojos donde se había desarrollado una membrana epiretinal extensa. En el espacio subretinal, en el espesor de la retina y en las membranas también aparecieron células redondas con gránulos pigmentados semejantes a las observadas en la cavidad vítrea (Figura V.5, D). También aparecieron membranas subretinales, no detectadas en el examen oftalmoscópico. Estas membranas tenían una capa de células con pigmento, semejantes a las del epitelio pigmentario de la retina, que cubrían por lo menos una de sus superficies (ver más adelante).

En los ojos no inyectados, la retina exhibía inmunorreactividad para GS en las células de Müller, e inmunorreactividad para GFAP en los astrocitos apoyados en la marginal interna. En los ojos inyectados no se detectaron modificaciones de la inmunorreactividad para GS, pero apareció inmunorreactividad para GFAP en las células de Müller. Durante la primera semana de evolución, las prolongaciones marcadas aparecieron alrededor del sitio de inyección, tanto en los controles como en los ojos inyectados con dispasa. En los primeros, la expresión del marcador glial quedó restringida al sitio de inyección hasta el final del periodo experimental. Por el contrario, en los ojos inyectados con dispasa, la inmunorreactividad para GFAP se extendió a las células de Müller en los pliegues de la retina (Figura V.6, A), y en las últimas semanas del periodo estudiado, abarcó toda la retina, inclusive las zonas no plegadas.

El anticuerpo contra F4/80, selectivo para células de linaje monocítico, marcó células en diversas localizaciones (Figura V.6, B, C, H, y K). Todas las células redondas con pigmento mostraron esta inmunorreactividad. En la retina, también reaccionó con células de cuerpo celular pequeño y delgadas prolongaciones ramificadas, identificadas como células microgliales (Figura V.6, I). Las células de la microglia aparecieron durante la primer semana después de la inyección. Su número aumentó considerablemente durante las semanas siguientes, encontrándose en las zonas de retina con y sin pliegues. En las membranas, el anticuerpo contra F4/80 marcó células pigmentadas y no pigmentadas (Figura V.6, H y K).

Sólo se observó inmunorreactividad para RPE65 en el epitelio pigmentario de la retina (Figura V.6, F). Los pliegues retinales, las células redondas pigmentadas y las membranas epiretinales carecían de este marcador. En las membranas subretinales, las células epiteliales pigmentadas fueron positivas para este anticuerpo, pero negativas para F4/80 (Figura V.6, K, L). No se detectó inmunorreactividad para CD3 en los ojos inyectados con salina ni en los inyectados con dispa.

Las membranas exhibieron numerosas células alargadas no pigmentadas inmunorreactivas para GFAP. El análisis con microscopía confocal demostró que estas células también eran inmunorreactivas para GS (Figura V.7, A-C). Por otra parte, el doble marcaje permitió demostrar que los marcadores GFAP y F4/80 detectaban poblaciones celulares diferentes (Figura V.7, D-F).

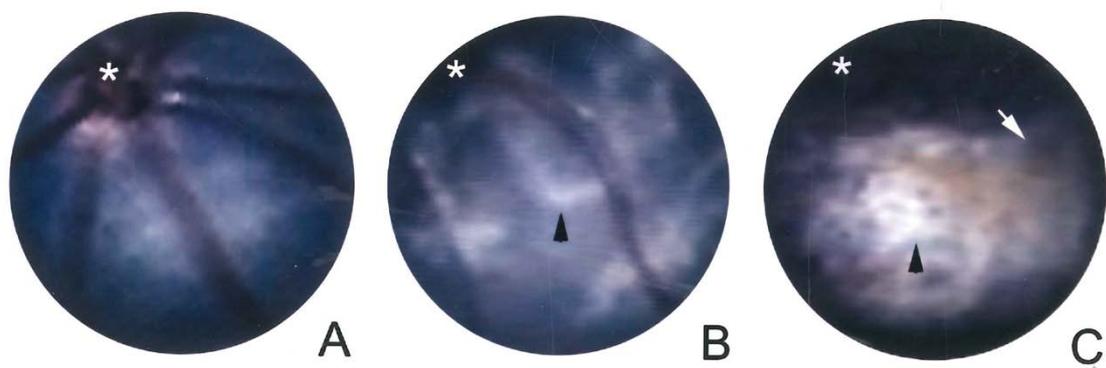


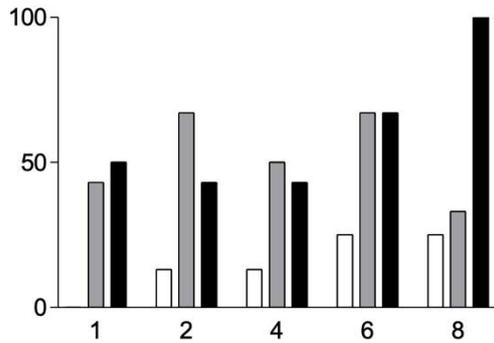
Figura V.1. Imágenes del fondo de ojo de ratones C57BL/6J, (A) control, (B) y (C), después de la inyección intravítrea de 0,2 U/ μ l de dispasa. El asterisco indica la posición de la papila del nervio óptico.

A. El fondo de ojo de un ratón inyectado con solución salina muestra las características de un fondo de ojo normal: superficie retinal lisa y vasos radiales rectos.

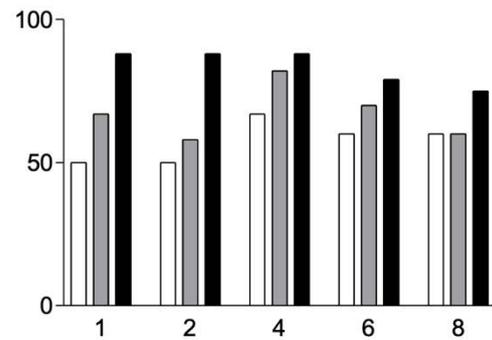
B. Fondo de ojo de un animal examinados dos semanas después de la inyección intravítrea de dispasa. Se observan numerosos pliegues retinales (punta de flecha) que aparecen como líneas pálidas por debajo del plano de los vasos.

C. Cuatro semanas después de la inyección de dispasa, este animal exhibía numerosos pliegues retinales (punta de flecha) y una membrana epiretinal pigmentada (flecha blanca).

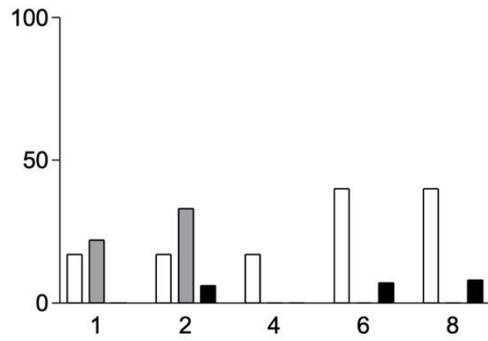
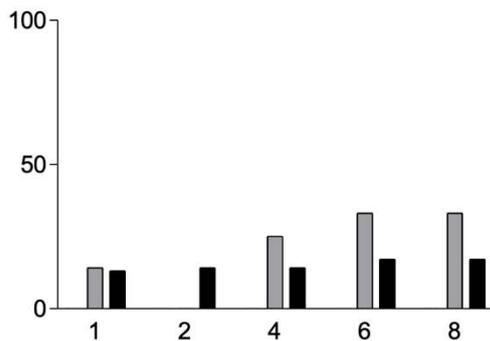
NO-HEMORRÁGICOS



HEMORRÁGICOS



Acúmulos intravítreos pigmentados



Bandas vítreas

Figura V.2. Histogramas que ilustran la frecuencia (como porcentaje del total de animales examinados) de los signos oftalmoscópicos acúmulos intravítreos pigmentados y bandas vítreas. Las observaciones corresponden a las semanas 1, 2, 4, 6 y 8 después de la inyección intravítrea de solución salina (◇), 0,2 U/μl de dispasa (◆), 0,4 U/μl de dispasa (◆◆), para los grupos sin hemorragia (columna izquierda) y con hemorragia (columna derecha). El número de animales (n) para cada grupo experimental en las semanas 1, 2, 4, 6 y 8 fue:

Grupos sin hemorragia: salino 17, 15, 15, 8, 6; 0,2 U/μl de dispasa, 7, 6, 4, 8, 8; 0,4 U/μl de dispasa, 8, 7, 7, 6, 3.

Grupos con hemorragia: salino 6, 6, 6, 5, 5; 0,2 U/μl de dispasa, 9, 12, 11, 10, 10; 0,4 U/μl de dispasa, 17, 17, 16, 14, 12.

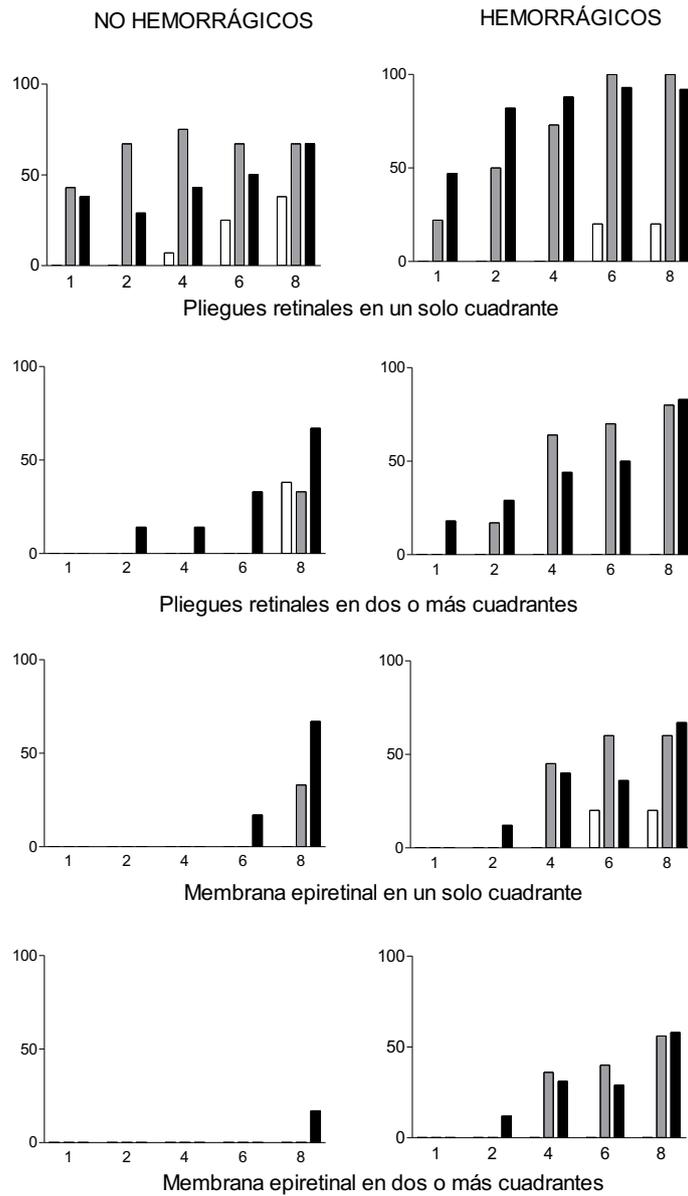


Figura V.3. Histogramas que ilustran la frecuencia de signos oftalmoscópicos (pliegues retinales y membranas epiretinales), 1, 2, 4, 6 y 8 semanas después de la inyección intravítrea de solución salina (\diamond), 0,2 U/ μ l de dispasa (\blacklozenge), 0,4 U/ μ l de dispasa ($\blacklozenge\blacklozenge$). Los histogramas corresponden a los sin hemorragia (columna izquierda) y con hemorragia (columna derecha). El número (n) de animales en cada grupo es igual que en la figura V.2.

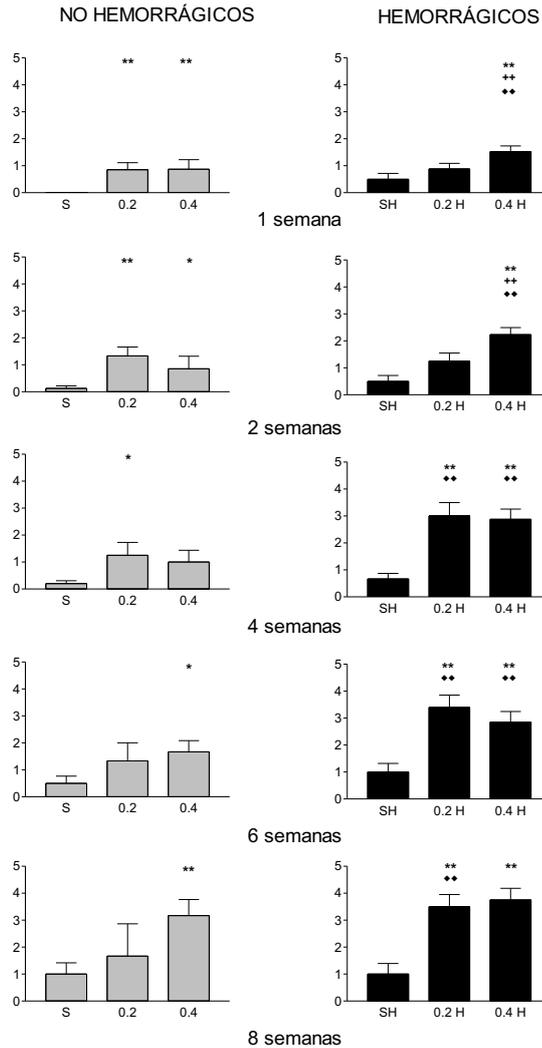


Figura V.4. El gráfico ilustra el puntaje promedio en la escala oftalmoscópica de signos de PVR en ojos no hemorrágicos (◇) y hemorrágicos (◆). Los grupos fueron los mismos que para las figuras V.2 y V.3. Las barras representan la media \pm error estándar del puntaje para los ojos inyectados con salina (S), 0,2 U/ μ l de dispasa (0.2) y 0,4 U/ μ l de dispasa (0.4). Las observaciones de cada semana fueron comparadas con un ANOVA de doble vía para detectar posibles diferencias entre animales tratados y no tratados, el efecto de distintas concentraciones de dispasa y el efecto de la hemorragia. Las comparaciones entre pares específicos se hicieron con la prueba de Tukey HSD únicamente cuando el ANOVA demostró diferencias significativas entre las filas y las columnas. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo tratado con dispasa y el correspondiente grupo tratado con salina (*, $P < 0,05$ y **, $P < 0,01$). Las cruces indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos tratados con distintas dosis de dispasa (+, $P < 0,05$ y ++, $P < 0,01$). Las diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo hemorrágico y el correspondiente no hemorrágico están representadas por ♦, $P < 0,05$ y ♦♦, $P < 0,01$.

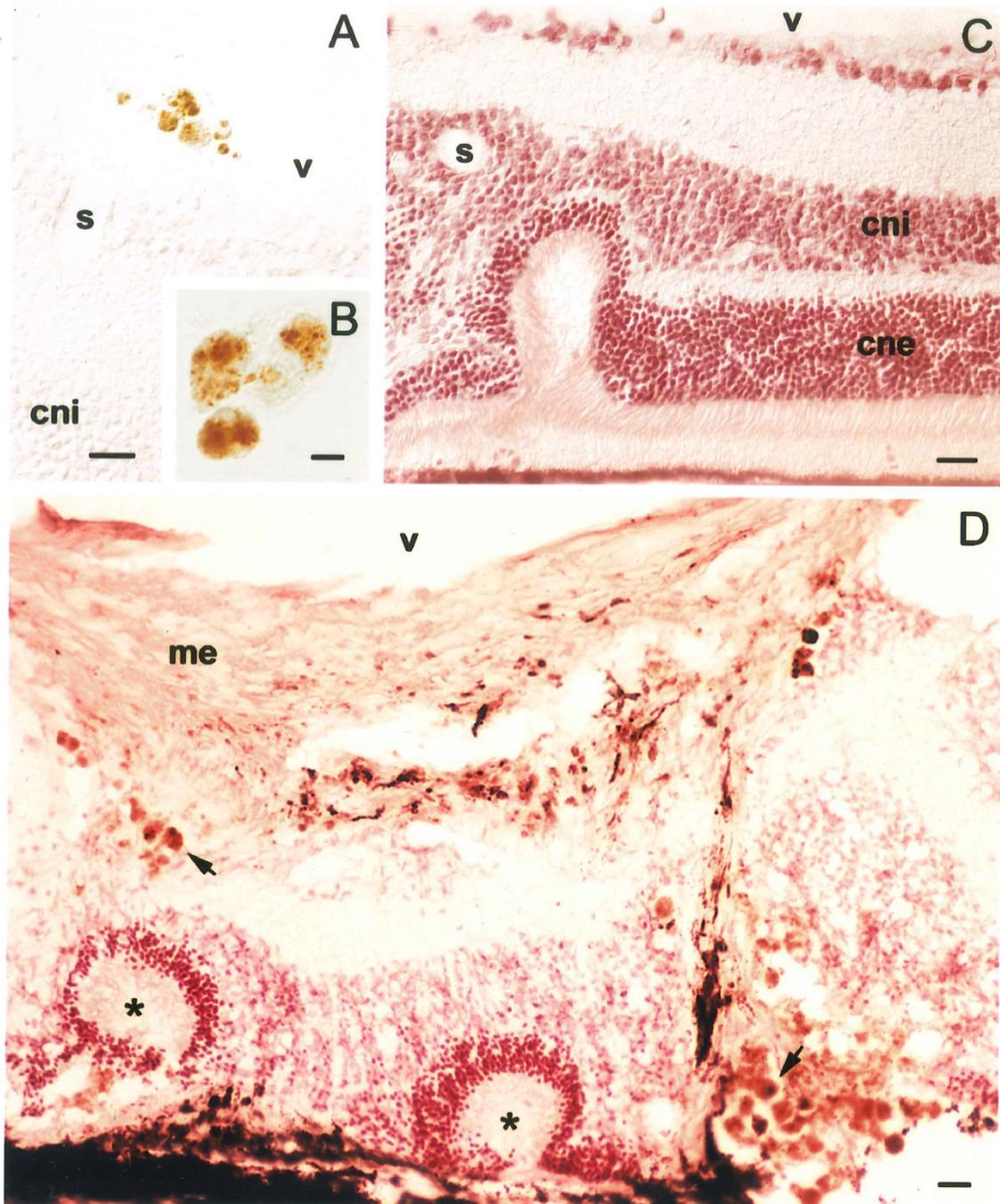


Figura V.5. Cortes del ojo de ratones inyectados con dispassa que muestran modificaciones histológicas observadas después de la inyección. **cne**, capa nuclear externa; **cni**, capa nuclear interna; **me**, membrana epiretinal; **s**, vaso sanguíneo; **v**, cavidad vítrea.

A y B. Preparaciones no coloreadas observadas con microscopía de Nomarski que muestran células redondas con gránulos pigmentados en la cavidad vítrea. En el examen oftalmoscópico de este animal se detectaron puntos brillantes intravítrea. B ilustra un acúmulo de células con gránulos pigmentados a mayor aumento.

C. En este corte coloreado con rojo neutro, proveniente de un animal fijado 2 semanas después de la inyección de 0,2 U/ μ l de dispassa, se observa un pliegue de la retina. La imagen muestra

que el pliegue solo afecta la capa nuclear externa, fácilmente identificable por el pequeño diámetro y la intensa coloración de sus núcleos. Nótese que en la zona del pliegue subsisten los segmentos externos de los fotorreceptores. En este ojo no se detectaron membranas epi- ni subretinales.

D. Corte coloreado con rojo neutro de un ojo fijado con 0,2 U/ μ l de dispasa y fijado 8 semanas después. Se observa una membrana epiretinal fibrosa íntimamente adherida a las capas internas de la retina, que ha perdido completamente su estructura histológica normal. No se observan segmentos externos de los fotorreceptores y los núcleos de la capa nuclear externa. Han desaparecido, salvo en las estructuras con forma de rosetas (asteriscos), que parecen como invaginadas en la capa nuclear interna. Obsérvese la presencia de numerosas células redondas con gránulos pigmentados (flechas) en el espacio subretinal, la retina y la membrana epiretinal.

Barra de calibración, 25 μ m.

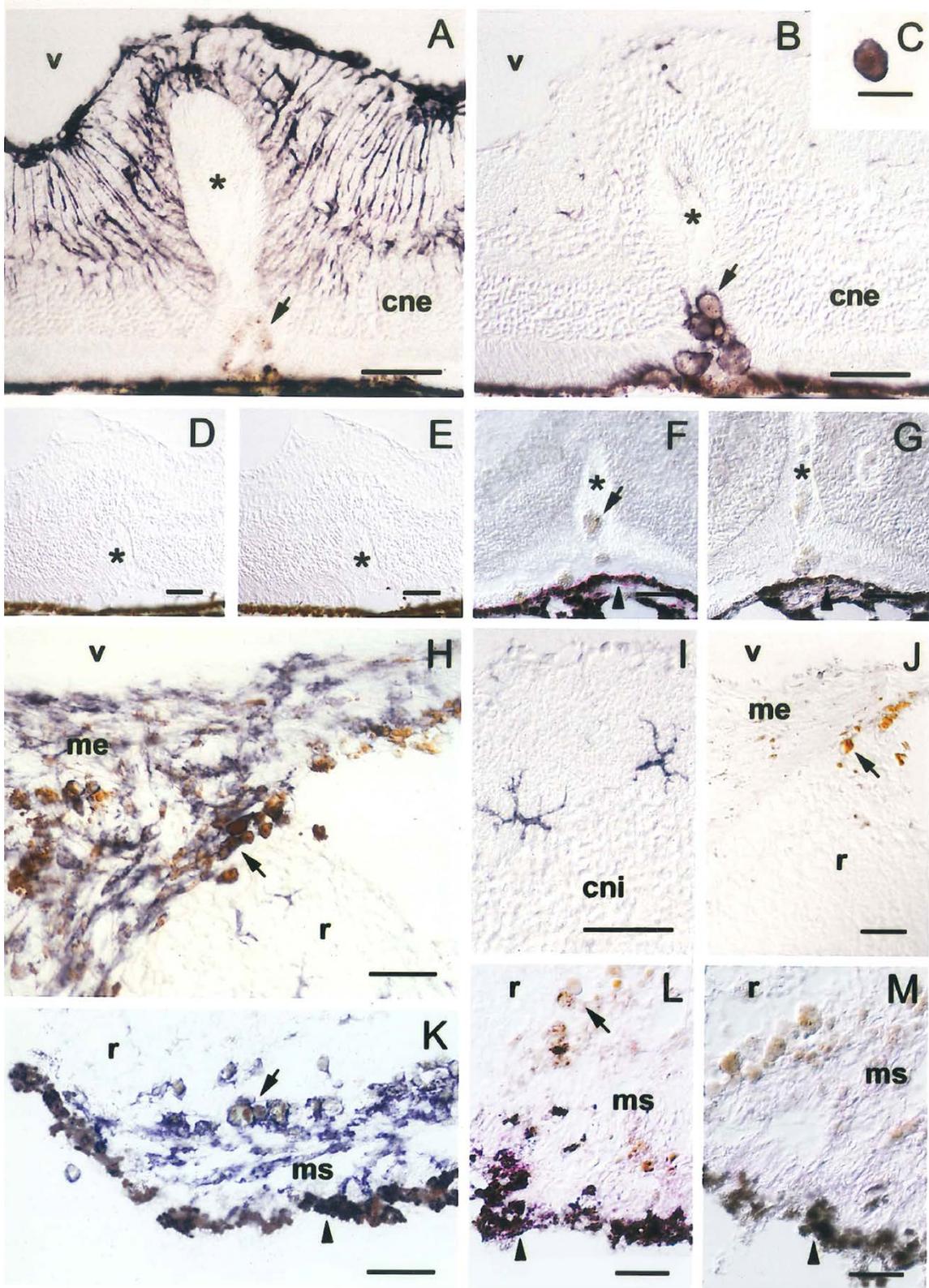


Figura V.6. Cortes del ojo de ratones tratados con dispasa, con inmunotinción para marcadores de células gliales (GFAP), células de Müller (GS), macrófagos (F4/80) y EPR (RPE65). **cne**, capa nuclear externa; **cni**, capa nuclear interna; **me**, membrana epiretinal; **s**, vaso sanguíneo; **v**, cavidad vítrea.

A – G. Cortes sucesivos que muestran un pliegue de la retina (asteriscos) en un animal fijado 6 semanas después de la inyección de 0,4 U/μl de dispasa. En las microfotografías A-E la

inmunorreactividad fue detectada con avidina-biotina-peroxidasa, produciendo una coloración negra azulada. Para los cortes F y G se utilizó una reacción de fosfatasa alcalina con producto rojo.

- A. La inmunotinción con GFAP coloreó intensamente la superficie interna de la retina, reflejando la inmunorreactividad de los astrocitos y de las prolongaciones radiales de las células de Müller. La flecha indica un pequeño acúmulo de células con gránulos pigmentados localizadas en el espacio subretinal.
- B. La inmunorreacción para F4/80 en un corte adyacente coloreó células redondas con gránulos de pigmento ubicadas en el espacio subretinal. Las pequeñas marcas oscuras en el espesor de la retina corresponden a células microgliales como las que se muestran en I.
- C. Una célula redonda con pigmento intracitoplasmático ubicada en la cavidad vítrea exhibe una marcación periférica con F4/80.

D y E. La especificidad de la inmunorreacción para GFAP (D) y F4/80 (E) es demostrada en estos blancos, que fueron procesados sin el primer anticuerpo correspondiente.

- F. Un corte cercano a los mostrados en A y B teñido con RPE65 muestra la inmunorreacción del EPR (punta de flecha). Las células redondas con pigmento no fueron inmunoreactivas para este anticuerpo (flecha).
- G. Un corte adyacente procesado sin el anticuerpo RPE65 demostró la especificidad de la inmunorreacción.
- H-J. Estos cortes fueron obtenidos de un ojo fijado después de 8 semanas de la inyección de 0,4 U/ μ l de dispa. La inmunorreacción con avidina-biotina-peroxidasa es de color azulado.
- H. En esta membrana epiretinal y la retina adherida, la inmunorreactividad para F4/80 aparece en células pigmentadas (flecha) y no pigmentadas de la membrana, así como en células microgliales de la retina.
- I. A mayor aumento se observa que la inmunorreactividad para F4/80 colorea los pequeños cuerpos celulares y las delgadas prolongaciones de las células de la microglía.
- J. Un corte cercano fue utilizado como blanco. Nótese la falta de coloración en las células redondas pigmentadas (flecha), las células de la membrana y las de la retina.

K – M. Estos cortes corresponden a una membrana subretinal en un ojo fijado 8 semanas de la inyección de 0,4 U/ μ l de dispa.

- K. En este corte inmunoteñido con F4/80, la coloración azul oscuro de la reacción aparece en células pigmentadas de aspecto epitelial. Nótese la presencia de células pigmentadas de aspecto epitelial que cubren una de las superficies de la membrana y que carecen de inmunorreactividad para F4/80 (punta de flecha).
- L. Un corte adyacente inmunomarcado con RPE65 muestra que la inmunorreacción aparece exclusivamente en las células de aspecto epitelial (punta de flecha).
- M. El blanco correspondiente demuestra la especificidad de la reacción inmunohistoquímica para RPE65. La leve coloración rosácea que se observa en la matriz extracelular de la membrana probablemente es inespecífica.

Barras de calibración para todas las figuras excepto C: 50 μ m; para C: 25 μ m.

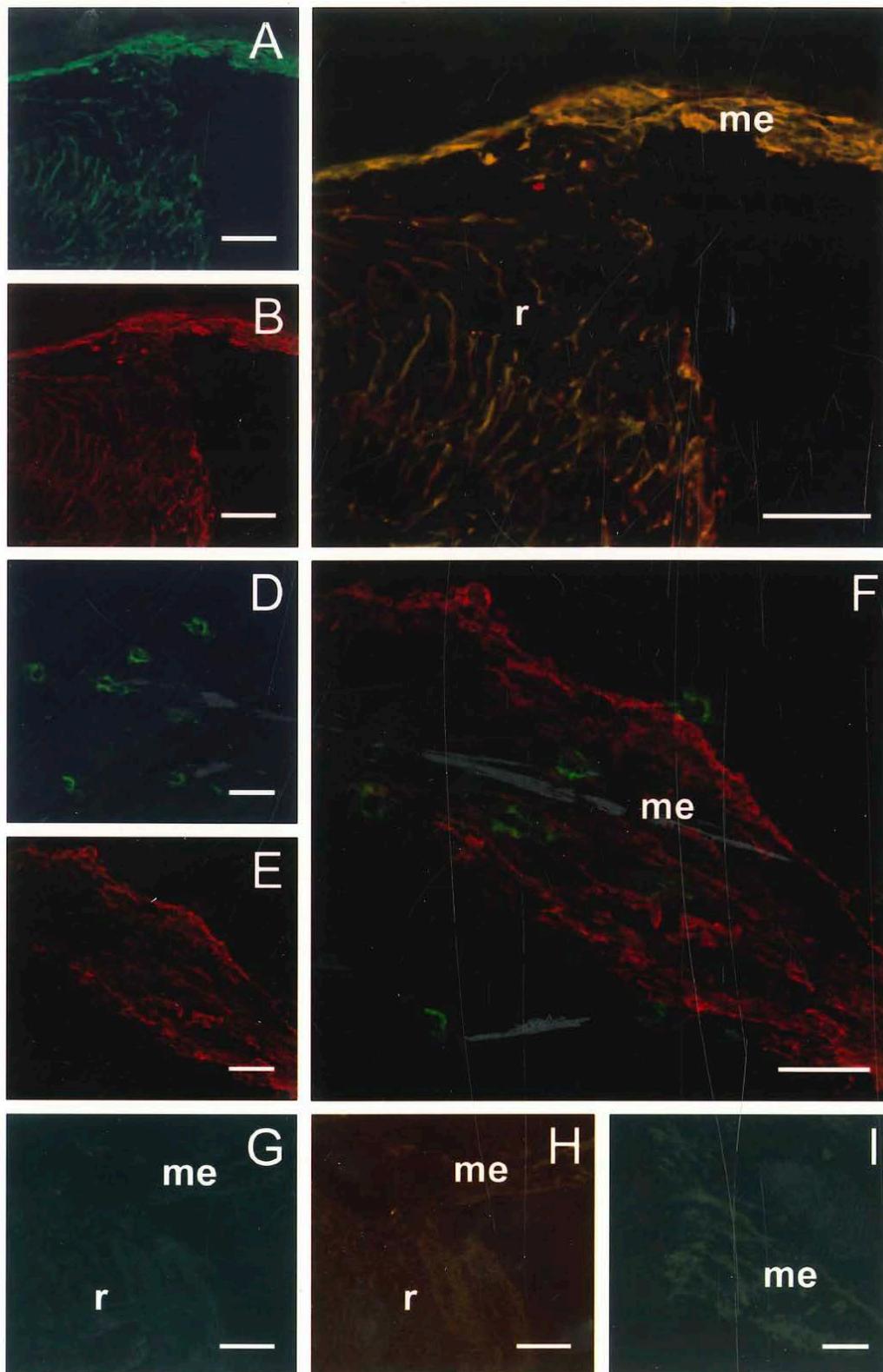


Figura V.7. imágenes de microscopía de rayo láser confocado obtenidas de preparaciones con tinción inmunofluorescente para dos anticuerpos distintos. Se muestran zonas distintas de la retina (r) y una membrana epiretinal (me) proveniente de un ojo fijado 8 semanas después de la inyección de 0,4 U/ μ l de dispasa.

A – C. Este corte muestra una membrana epiretinal adherida a la retina, que fue sucesivamente marcada para GFAP (utilizando el procedimiento de amplificación con tiramida (verde) y GS (rojo). La imagen combinada (C) muestra la presencia de numerosas prolongaciones radiales en la retina con co-localización de los dos marcadores. De manera similar, en la membrana epiretinal se observa una intensa inmunofluorescencia para GFAP y GS que co-localiza en elementos celulares de la misma morfología.

D – F. Un corte cercano marcado en forma consecutiva con los anticuerpos para F4/80 (verde) y GFAP (rojo). Nótese que la inmunorreacción para F4/80 detecta pequeñas células con prolongaciones cortas. La imagen combinada (F) demuestra que las células positivas para F4/80 están inmersas en el interior de la membrana, rodeadas por numerosas células alargadas positivas para GFAP. La observación con microscopía de luz convencional mostró que las células marcadas con F4/80 no contienen gránulos de pigmento.

G – I. Cortes adyacentes a los anteriores procesados sin el primer anticuerpo correspondiente que demuestran la especificidad de la inmunoreacción para GFAP (g), GS (H) y F4/80 (I).

Barras de calibración: A, B, C, G, H, 100 μm ; D, E, F e I, 25 μm .

DISCUSIÓN

Nuestras observaciones muestran que la administración intravítrea de dispasa en ratones induce una condición similar a la PVR, caracterizada por la aparición secuencial de (1) células libres en la cavidad vítrea que expresan un marcador de macrófagos, (2) pliegues de la retina neural, que involucran principalmente la retina externa, y (3) desarrollo de membranas epi- y subretinales con una población celular heterogénea.

La inyección de dispasa estuvo acompañada por una hemorragia intravítrea en un 63-68 % de los ratones, mientras que en el conejo, la inyección de dispasa produce hemorragia en el 100 % de los animales (Frenzel y col., 1998). En consecuencia, el empleo de ratones permitió evaluar el efecto específico de la dispasa en ausencia de hemorragia. Los signos oftalmoscópicos observados con y sin hemorragia fueron similares; sin embargo, todas las manifestaciones de PVR aparecieron antes en los ojos hemorrágicos que en los no-hemorrágicos. Además, en los ojos hemorrágicos, los pliegues retinales y las membranas fueron mucho más frecuentes y afectaron una superficie mayor de la retina.

Los acúmulos intravítreos pigmentados, que aparecieron rápidamente después de la inyección de dispasa, se parecen a los acúmulos de pigmento ("*tobacco dust*") considerados como uno de los signos clínicos iniciales de la PVR humana (Machemer, 1977). Las células pigmentadas que constituyen dichos acúmulos son morfológicamente semejantes a las descritas como "macrófagos epiteliales pigmentados" después del desprendimiento de retina experimental en el mono y que podrían derivar del epitelio pigmentario (Machemer y Laqua, 1975). Sin embargo, las células redondas pigmentadas del ratón no presentaron inmunorreactividad para el marcador epitelial RPE65, pero sí mostraron una fuerte marcación con F4/80 que sugiere un origen

monocítico/macrofágico. Nuestras observaciones permiten suponer que la dispasa induce un intenso reclutamiento de monocitos sanguíneos que migrarían hacia la cavidad vítrea, probablemente debido a la ruptura de la barrera retinal externa.

El plegamiento de la retina fue uno de los eventos más tempranos en la PVR inducida por dispasa en el ratón. Estos pliegues no eran de naturaleza traccional, ya que siempre aparecieron antes que las membranas. Por otra parte, la forma de los pliegues se asemeja a las invaginaciones displásticas y rosetas observadas en injertos de retina que se han desprendido del epitelio pigmentario (Seiler y Aramant, 1998). Este patrón histológico sugiere que la forma de las células de la retina sufre alteraciones que determinarían su plegamiento en una etapa previa a la formación de las membranas. Congruentemente con esta hipótesis, las células de Müller ubicadas en los pliegues retinales mostraron una hiperexpresión temprana de la inmunorreactividad para GFAP, sin que se detectaran modificaciones de la inmunorreactividad para GS. Teniendo en cuenta que GFAP también es hiperexpresada en la etapa inicial de desprendimientos de retina experimentalmente provocados en conejo (Lewis y col., 1989), estos plegamientos displásticos podrían reflejar los estadios iniciales de un desprendimiento de retina regmatógeno o exudativo.

Estos pliegues tempranos no fueron descritos en el modelo de dispasa en el conejo (Frenzel y col., 1998). Estos autores utilizaron una escala de Fastenberg (Fastenberg y col., 1982) modificada para evaluar la severidad de la PVR al finalizar el periodo experimental, generalmente más de 10 semanas después de la intervención. El grado 1 de dicha escala (diseñada para comparar PVRs inducidas por la inyección de distintos tipos celulares) está caracterizado por la presencia de membranas en la cavidad vítrea, en consecuencia, la presencia de pliegues tempranos en el modelo en conejo probablemente pasó desapercibida.

Las membranas desarrolladas en el ratón tenían una composición celular heterogénea, que incluía células pigmentadas y no pigmentadas. La mayor parte de las células con pigmento probablemente representan células de linaje macrofágico, ya que eran inmunorreactivas para F4/80. El papel de las células inflamatorias en esta enfermedad ha sido enfatizado por varios autores (Charteris y col., 1993; Esser y col., 1993); además, se han utilizado monocitos para inducir la formación de membranas intravítreas (Planck y col., 1992) y se ha demostrado que *in vitro* estas células pueden transformarse en células similares a los fibroblastos (Reuter y col., 1995). Por otra parte, la retina de los ratones inyectados con dispasa contenía numerosas células microgliales. Estas podrían ser la fuente de las células no pigmentadas positivas para F4/80 presentes en las membranas de estos animales. La participación de la microglia retinal en el desarrollo de la PVR fue propuesta por Weller y colaboradores (1991), quienes identificaron este fenotipo en membranas humanas. Un fenómeno semejante fue observado en un modelo en conejo (McGillem y Dacheux, 1998).

Tanto las membranas epi- como las subretinales contenían también numerosas células de presumible origen glial, probablemente derivadas de las células de Müller, ya que expresaban inmunorreactividad para GFAP y GS simultáneamente. Por consiguiente, la composición de las membranas desarrolladas en el ratón se asemeja a las membranas humanas por su contenido en células derivadas de la glia y de los macrófagos, mientras que difiere en el contenido de células derivadas del epitelio pigmentario (Charteris, 1995). En las membranas de los ratones, la inmunorreactividad para RPE65, un marcador específico de este tejido, sólo pudo ser detectado en células de aspecto epitelial que cubrían la superficie de las membranas subretinales. La participación de las células del epitelio pigmentario en las membranas humanas ha sido postulada por varios autores, basándose en la presencia de células inmunorreactivas para

citoqueratina (Charteris, 1995). Sin embargo, aunque ensayamos dos anticuerpos diferentes para citoqueratina utilizando diversos protocolos de recuperación antigénica (datos no publicados), este antígeno no pudo ser detectado ni en células libres ni dentro de las membranas. La presencia de células inmunorreactivas para RPE65 en membranas subretinales pero no en membranas epiretinales, se asemeja al comportamiento de las células del epitelio pigmentario transplantadas al espacio subretinal, que no migran hacia la cavidad vítrea (Crafoord y col., 1999). Las células inmunorreactivas para citoqueratina detectadas en las membranas humanas podrían derivar de otros tejidos epiteliales del ojo, aunque su ausencia en la PVR inducida en el ratón podría explicarse por su llegada a la cavidad vítrea en etapas posteriores de la enfermedad, una vez formadas las membranas por las células de origen glial y monocítico.

Aunque los signos patológicos aparecieron aún en ausencia de hemorragia, la presencia de sangre en el vítreo estimuló el desarrollo de la PVR, tal como lo demuestra la presencia más temprana de pliegues y membranas. La importancia de las hemorragias vítreas como factores predisponentes de la PVR en un desprendimiento de retina ha sido demostrada en varias ocasiones (Yoshino y col., 1989; Girard y col., 1994). Mas aún, la inyección de sangre en la cavidad vítrea del conejo induce la formación de membranas gliales y fibrosas (Cleary y Ryan, 1979; Ehrenberg y col., 1984). El efecto de la sangre se debe probablemente a la presencia de proteínas séricas, entre ellas el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), ya que el vítreo de pacientes con hemorragia intravítrea presenta niveles de PDGF similares a los niveles detectados en pacientes con desprendimiento de retina y PVR (Cassidy y col., 1998).

En resumen, la inyección de dispasa en los ojos de los ratones parece desencadenar un proceso caracterizado por la migración de macrófagos, el plegamiento de la retina externa, la activación de la microglia y la hiperexpresión de GFAP en las

células de Müller. Estos eventos son seguidos por la formación de membranas epi- y subretinales similares a las observadas en la PVR humana. El efecto inicial de la dispasa no ha sido aún determinado, pero la rápida aparición de macrófagos libres en la cavidad vítrea sugiere la ruptura de la barrera hémato-ocular, un efecto también postulado por Frenzel y colaboradores (1998). La mayor frecuencia de hemorragia intravítrea en los ojos inyectados con dispasa sostiene esta hipótesis, que concuerda con el clivaje selectivo de fibronectina y colágeno tipo IV de las membranas basales producido por la dispasa (Stenn y col., 1989). La fibronectina es un componente importante de la membrana limitante interna (Kohn y col., 1987) y probablemente participa en la adhesión vitreoretinal y la acción disolvente de la dispasa ha sido utilizada en cirugías oculares para separar la hialoides posterior de la membrana limitante interna sin provocar grandes cambios morfológicos en la retina interna (Tezel y col., 1998). Aunque el papel del vítreo en el desprendimiento de la retina todavía no es del todo conocido, parece muy difícil mantener un desprendimiento experimental si el cuerpo vítreo permanece intacto (Marmor, 2001).

A pesar de los grandes avances realizados en el tratamiento quirúrgico de la PVR, los factores que causan o estimulan esta condición no son modificados por este tipo de intervención. Una reducción de estos factores podría resultar en un menor número de operaciones por PVR recurrente y una mejor recuperación de la visión. Este nuevo modelo de PVR desarrollado en ratón puede ser de gran utilidad, puesto que permitiría la utilización de ratones genéticamente modificados para el estudio de los factores que predisponen para esta enfermedad. Además, el estudio de los estadios iniciales de la PVR en este modelo experimental probablemente ayude a comprender mejor la patogénesis de la enfermedad humana.

CAPÍTULO VI

ÓXIDO NÍTRICO Y EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA

INTRODUCCIÓN

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una monocapa celular polarizada que se apoya sobre la membrana de Bruch y cuyas células están eslabonadas por un complejo de uniones adherentes y ocluyentes. El espacio extracelular comprendido entre la superficie apical del EPR por un lado, y por los fotorreceptores y las prolongaciones de las células de Müller, por el otro, se denomina espacio interfotorreceptor. También se lo denomina subretinal, pero se prefiere usar esta designación sólo cuando existe un desprendimiento de la retina (Fisher y Anderson, 2001).

El EPR constituye la barrera hemato-ocular externa, pues aísla a la retina neural de los capilares fenestrados de la coroides. La efectividad del EPR como barrera depende del sellamiento del espacio paracelular por parte de las uniones estrechas u ocluyentes (Williams y Rizzolo, 1997). La rotura de esta barrera hemato-ocular es uno de los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de una PVR (Nagasaki y col., 1998).

NO aumenta la permeabilidad de las láminas epiteliales (Cuzzocrea y col., 2000) y de la barrera hemato-cerebral (Thiel y Audus, 2001; Shyamaladevi y col., 2002). Sin embargo, bajo algunas condiciones, NO puede preservar la integridad de la barrera hemato-cerebral dañada por hipoxia/reoxigenación y mantener su permeabilidad (Utepergenov y col., 1998). Un efecto semejante ocurre en monocapas confluyentes de EPR, donde las citoquinas inflamatorias reducen la resistencia eléctrica transepitelial,

mientras que un dador de NO la aumenta (Zech y col., 1998). Estas modificaciones de la resistencia epitelial son acompañadas por cambios en la inmunotinción de la ZO-1, una proteína característica de las uniones ocluyentes (Zech y col., 1998).

Estudios en las aves sugieren que el EPR puede sintetizar su propio NO (Fischer y Stell, 1999). Además, en el EPR de ratones BALB-c, observamos actividad de NADPH diaforasa (no publicado), que sugiere la presencia de una sintasa de NO (Matsumoto y col., 1993). Por otro lado, esta lámina epitelial se encuentra acotada entre dos fuentes importantes de NO, el endotelio de los vasos coroideos (Chakravarthy y col., 1995) y el segmento interno de los fotorreceptores (Lopez-Costa y col., 1997; Neufeld y col., 2000). Las pequeñas distancias entre el EPR y los tejidos vecinos indican que el NO producido por estos últimos podría llegar hasta la lámina epitelial (Vaughn y col., 1998). Nuestras observaciones en la PVR humana y experimental (Capítulo IV) demuestran la hiperexpresión de las enzimas que sintetizan NO en las células de Müller lesionadas y en las células que constituyen las membranas epi- y subretinales. Por lo tanto, la oferta de NO para el EPR aumentaría a medida que las células de Müller se vuelven hiperreactivas.

En los últimos años se ha establecido que las células del EPR son altamente sensibles a una gran variedad de citoquinas, producidas por el mismo epitelio o por células inflamatorias. Estas citoquinas poseen profundos efectos sobre el EPR, incluyendo la liberación de óxido nítrico y la pérdida de la función de barrera (Holtkamp y col., 2001). La mayor parte de las citoquinas activan la transcripción del ARNm de la sintasa inducible, estimulando la producción de grandes cantidades de NO; sin embargo, la activación de esta enzima requiere un periodo de inducción de unas 12 horas (Goureau y col., 1995).

Por lo tanto, nos preguntamos cuál sería el efecto del NO sobre el EPR en una situación experimental asimilable a la de un desprendimiento de retina. Para esto utilizamos distintas preparaciones de EPR separado de la retina neural, pero todavía adherido a la coroides-esclera, que fueron incubados en presencia de distintas concentraciones de nitroprusiato sódico (NPS), un dador de NO, y de N(omega)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), un inhibidor de las sintasas de NO. Como principal criterio de indemnidad de la barrera utilizamos la conservación del patrón de inmunotinción normal para ZO-1. Esta proteína es característica de las uniones ocluyentes, y en las preparaciones inmunoteñidas aparece como un límite nítido y rectilíneo entre las células epiteliales, formando una red poligonal regular (Williams y Rizzolo, 1997; Chang y col., 1997). La ZO-1, al igual que ZO-2 y ZO-3, funciona como proteína de ensamble entre las proteínas transmembranas de la unión ocluyente y el citoesqueleto (Gonzalez-Mariscal y col., 2000; Fanning y col., 1998). Al igual que el patrón de inmunotinción para ocludina y el transportador de glucosa GLUT1, este patrón poligonal de ZO-1 ha sido correlacionado con la presencia de una barrera funcional (Tserentsoodol y col., 1998; Zech y col., 1998).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratones machos pigmentados C57BL/6J y albinos BALB-c de 18-22 gr. Los animales fueron mantenidos en ciclo de luz/oscuridad con intervalos de 12 hs (7am/7pm) hasta el inicio del periodo experimental.

Obtención de los explantos

Los animales, anestesiados con una sobredosis de hidrato de cloral (15 mg/kg de peso corporal), fueron enucleados en condiciones de asepsia. El globo ocular se sumergió en Ringer-lactato estéril y, una vez eliminados el conectivo circundante y el

nervio óptico, se pasó a una cápsula nueva, también con Ringer-lactato. Después de hacer una incisión alrededor del limbo corneal, y extraer el cristalino y el vítreo, la retina neural se separó fácilmente, bien de manera espontánea o mediante suaves tironeos desde el borde. El casquete EPR-coroides-esclera remanente fue utilizado para la obtención de explantos, según dos protocolos que se describen más abajo. Los explantos fueron incubados a 37° C en medio RPMI 1640 suplementado con 25 mM HEPES y L-Glutamina (GIBCO, Invitrogen) bajo atmósfera 5 % CO₂ en aire húmedo, durante periodos de 1 a 12 horas.

Protocolo 1. Obtención de explantos bajo condiciones de iluminación convencional. Los animales fueron anestesiados y enucleados entre las 09.00 y 12.00 horas del periodo de iluminación. Los explantos se obtuvieron por sección del casquete EPR-coroides-esclera con tijeras de iridectomía.

Protocolo 2. Los ratones, previamente mantenidos en el ciclo luz/oscuridad (7am/7pm) ingresaron a un módulo de oscuridad completa a las 7 pm y permanecieron en dicho módulo hasta la obtención de los explantos. Todos los procedimientos de anestesia, enucleación y disección fueron efectuados con iluminación roja, en un cuarto mantenido a 28° C. La disección del ojo fue como se describió más arriba, pero los explantos se obtuvieron con un microsacabocados fabricado con un tubo de aguja 25 G. También se empleó este procedimiento para obtener explantos de animales sometidos a un régimen normal de luz y oscuridad.

Se utilizaron las siguientes drogas: nitroprusiato sódico (NPS, Laboratorios FADA, Buenos Aires, Argentina) en concentraciones de 0,005 a 2,5 mM; N(G)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EEUU), en concentraciones de 100-300 µM y Azul de metileno, 0,10 mM (preparación farmacéutica estéril).

Análisis de la integridad celular

La integridad de las células EPR de los explantos fue evaluada mediante la prueba de exclusión de colorantes y microscopía electrónica de barrido.

La prueba de exclusión de colorante se realizó con una solución de 0,1 % Azul Tripán (1 minuto) o 1µg/ml de Ioduro de Propidio (15 minutos), ambos disueltos en medio RPMI 1640. Estos colorantes no atraviesan la membrana citoplasmática de las células normales, por lo tanto, la aparición de coloración nuclear indica ruptura de la membrana plasmática y sugiere la muerte de esas células. Después de ser lavados cuatro veces con medio de cultivo sin colorante, los explantos fueron fijados durante 30 minutos en paraformaldehído al 4% en solución salina buffereada con fosfato (PBS) 0,1 M (ver Apéndice). Los explantos lavados en PBS, fueron observados inmediatamente o procesados para inmunohistoquímica de fluorescencia. Para su observación microscópica, los explantos fueron montados con glicerina, entre dos cubreobjetos. Este procedimiento facilitó el análisis de ambas caras de los explantos.

Inmunohistoquímica

Los explantos fueron incubados con un anticuerpo policlonal de conejo contra ZO-1 (Zymed, South San Francisco, CA, EEUU) durante 8-12 horas, con agitación constante y a temperatura ambiente. Una vez lavados, fueron incubados con sueros anticonejo marcados con fluoresceína-isotiocianato o lisamina-rodamina (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, PA, EEUU) (ver Capítulo II). El montaje también se efectuó con glicerina entre dos cubreobjetos, y fueron observados con un microscopio de fluorescencia NIKON Eclipse 800 o un Láser Scanning System Radiance 2000 (BioRad, Hemel Hempstead, UK, ver Capítulo II). Algunos explantos

fueron desmontados y recolorados con Violeta de Cresilo 0,1 % a fin de evaluar la estructura histológica.

Microscopía electrónica de barrido

Los explantos fueron fijados en una solución de glutaraldehído al 2 % en buffer fosfato (PB) 0,1 M y pH 7,4 durante 90 minutos, lavados con sacarosa 0,12 M en PB 0,1 M, mantenidos durante 1 hora a 4° C en una solución de tetróxido de osmio 1% con sacarosa 0,12 M en PB y finalmente deshidratados en soluciones crecientes de etanol (50, 60, 70, 80, 90 y 100%) 10 minutos en cada una (ver apéndice para la descripción de las diferentes soluciones). Los explantos fueron desecados por evaporación de hexametil-disilazano (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EEUU). Las muestras fueron metalizadas con plata en un “Sputter Coater” (SCD 050, BAL-TEC) y observadas con un microscopio electrónico de barrido (JEOL, JSM-35CF). Estos procedimientos se realizaron en el Servicio de Microscopía de Barrido del Instituto de Neurobiología (Buenos Aires, Argentina).

RESULTADOS

Efectos del nitroprusiato sódico sobre la distribución de ZO-1 en explantos obtenidos mediante el protocolo 1.

En condiciones basales, al comenzar la incubación, la inmunofluorescencia para ZO-1 aparecía como un patrón poligonal regular, con bordes celulares rectos (Fig. VI.1, A), que cubría más del 75 % de la superficie del explanto. La incubación durante 1 a 3 horas indujo alteraciones del patrón poligonal, con aumento de los ángulos de intersección celular e irregularidades de los bordes celulares (Fig. VI.1, B). La incubación en presencia de NPS en concentraciones crecientes de 0,005 a 2,5 mM mejoró la preservación del patrón poligonal regular con respecto a los controles

incubados por el mismo tiempo en ausencia de nitroprusiato (Fig. VI.2). Este efecto de preservación fue máximo con NPS 0,5 mM y fue bloqueado por la incubación simultánea con azul de metileno. En los explantos incubados en ausencia de NPS o con concentraciones diferentes de 0,5 mM, aparecían islas con desaparición total de la inmunofluorescencia para ZO-1 (Fig. VI.1, C.D). Las condiciones experimentales no permitieron determinar si tal desaparición se debía a la exclusiva desintegración de las uniones ocluyentes, o si era acompañada por muerte celular.

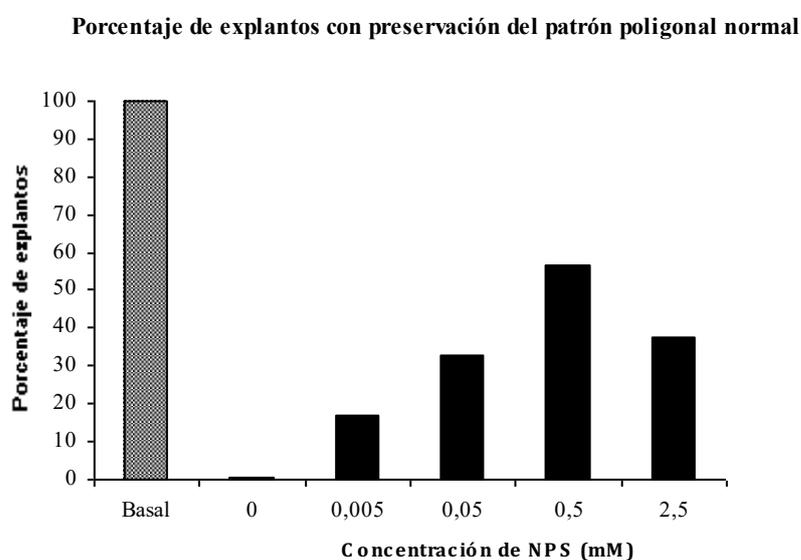


Fig. VI-2. El histograma muestra el porcentaje de explantos ($n > 12$ explantos) donde la inmunofluorescencia para ZO-1 mostraba un patrón poligonal regular. Basal, explantos fijados al comenzar la incubación. Las restantes barras indican el porcentaje después de 3 horas de incubación en presencia de las concentraciones indicadas de NPS.

La preservación del patrón poligonal regular en presencia de NPS sugirió que NO podría tener un efecto benéfico sobre la indemnidad de la lámina epitelial, tal como ha sido descrito en monocapas de EPR (Zech y col., 1998). A fin de poder evaluar el posible papel de la muerte celular en este fenómeno, se modificó el procedimiento para obtener explantos según se describe en el protocolo 2.

Explantos obtenidos bajo distintas condiciones de iluminación

A fin de encontrar las condiciones óptimas de viabilidad, se tomaron explantos de animales sometidos a distintos regímenes de iluminación. Todos los explantos mostraron un delgado anillo periférico de núcleos coloreados, que indicaba la muerte celular por el traumatismo del microsacabocados. La zona central del explanto presentó un número variable de núcleos coloreados, cuya densidad dependía de las condiciones previas de iluminación.

En los explantos provenientes de animales mantenidos bajo el régimen de luz/oscuridad periódica siempre se encontraron núcleos coloreados (Fig. VI.3, A), independientemente de la hora de obtención de los explantos, o el tipo de iluminación durante la disección

En los animales mantenidos en oscuridad permanente, la densidad de núcleos coloreados en la zona central de los explantos varió según el tiempo de permanencia en el ambiente oscuro, la hora en que fueron obtenidos y la cepa de ratón utilizada.

Los ratones BALB-c fueron mantenidos en oscuridad permanente durante 12, 24, 36 y 48 horas. Los animales que permanecieron 12 y 36 horas fueron sacrificados entre las 7 y 10 am, mientras que aquellos que permanecieron 24 y 48 horas fueron sacrificados entre las 7 y 10 pm. Se detectaron núcleos coloreados en todos los explantos obtenidos a las 7 am, y también en aquellos obtenidos a las 7 pm después de sólo 24 horas de oscuridad (Fig. VI.3, B). Por el contrario, la zona central de los explantos estaba totalmente desprovista de núcleos coloreados en los animales sacrificados a las 7 pm después de 48 horas (Fig. VI.3, C) o más de oscuridad permanente. Los explantos provenientes de animales sacrificados a las 7 am siempre mostraron coloración nuclear indicativa de muerte celular, aún después de 48 horas o más de oscuridad.

Se hicieron experimentos similares con ratones pigmentados C57BL/6J. En estos explantos el número de núcleos coloreados en el área central disminuyó en función del número de horas en oscuridad permanente. Sin embargo, siempre mostraron algunos núcleos coloreados, aún después de siete días de oscuridad, e independientemente de la hora de obtención (Fig. VI.3, D). En consecuencia, todos los siguientes experimentos fueron realizados con ratones no pigmentados BALB-c.

Para verificar la indemnidad de las células del EPR en los explantos de BALB-c obtenidos a las 7 pm después de 48 horas de oscuridad permanente, las muestras fueron fijadas y procesadas para microscopía electrónica de barrido. Esto permitió observar la continuidad de la lámina epitelial, así como la presencia de abundantes microvellosidades en la membrana apical (Fig. VI.4). Por el contrario, los explantos provenientes de los otros regímenes de oscuridad mostraban discontinuidades del epitelio y/o pérdida de las microvellosidades.

Los explantos sin lesión aparente de la membrana EPR fueron incubados durante periodos variables y estudiados de la misma manera para evaluar su viabilidad in vitro. Todas las células centrales excluyeron el colorante, aún después de 12 horas de incubación, que fue el periodo más prolongado. Durante ese lapso tampoco se detectaron modificaciones del patrón poligonal de inmunofluorescencia contra ZO-1 (Fig. VI.5).

Efectos del NPS y del L-NAME sobre los explantos EPR-coroides-esclera

En estos experimentos se utilizaron explantos provenientes de ratones BALB-c, mantenidos en oscuridad durante 48 horas, y sacrificados entre las 8 y 10 pm. La incubación de este tipo de muestras durante 1,5 horas con 0,5 mM NPS no indujo cambios del patrón poligonal de inmunomarcación con ZO-1, ni tampoco la aparición de células incapaces de excluir colorante.

La incubación de este tipo de explantos en presencia de 100 μM L-NAME durante 30 minutos no produjo alteraciones detectables de dichos parámetros. Cuando la incubación se prolongó durante 1 hora, se observaron cambios en el patrón poligonal de inmunomarcación para ZO-1. Los límites intercelulares perdieron parcialmente su aspecto rectilíneo (Fig. VI.6, A-B), pero todas las células excluían el colorante. En presencia de 200 y 300 μM L-NAME durante 1 hora, el patrón poligonal de inmunomarcación para ZO-1 se perdió completamente, siendo reemplazado por una coloración difusa de baja intensidad. Sin embargo, todas las células excluían el Ioduro de Propidio, y la coloración ulterior con Violeta de Cresilo demostró que, a pesar de la falta de ZO-1 inmunodetectable, los explantos estaban cubiertos por una lámina epitelial continua.

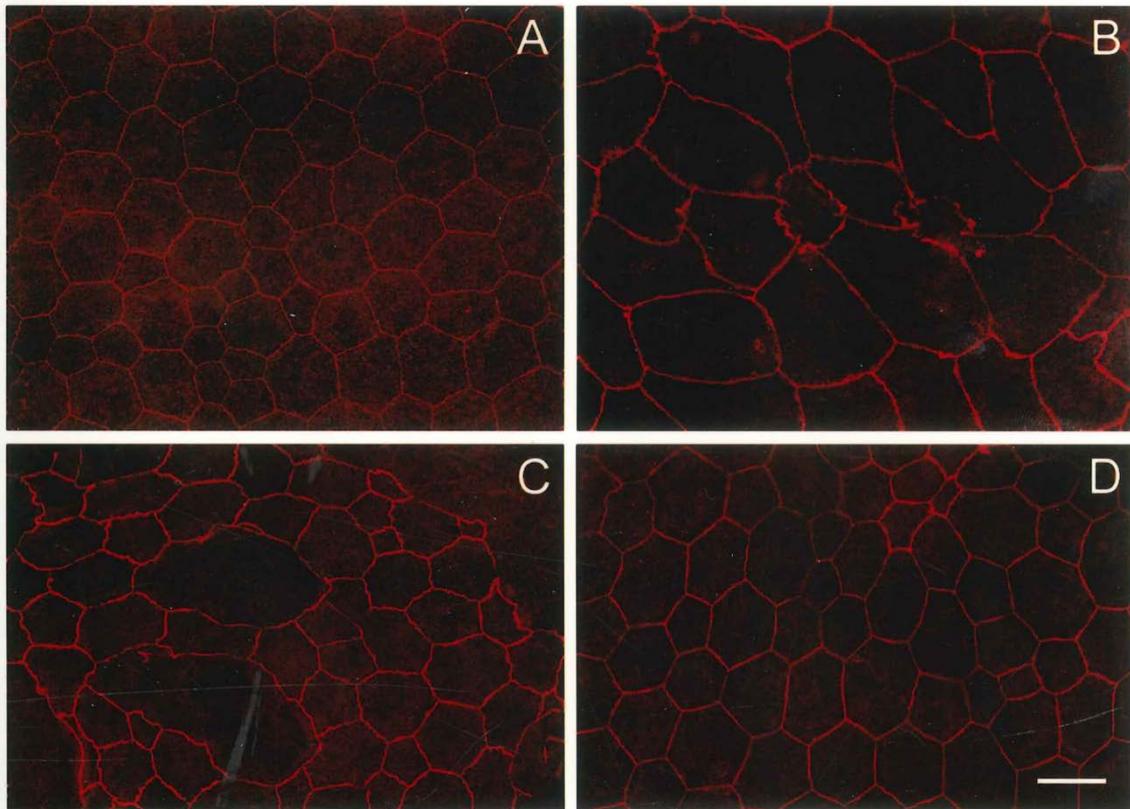


Figura VI.1. Imágenes de microscopía confocal de explantos obtenidos según el protocolo 1 en condiciones basales y después de la incubación con diferentes concentraciones de NPS.

- A. Explanto fijado inmediatamente después de su obtención. La inmunofluorescencia para ZO-1 presenta un patrón poligonal normal, con bordes celulares rectos y ángulos semejantes en los vértices de unión de los lados celulares.*
- B. Explanto fijado después de 1 hora de incubación en RPMI. Se observa un patrón poligonal alterado, con bordes celulares irregulares y ampliación de los ángulos de intersección. Algunas células presentan bordes curvos y ondulados.*
- C. Explanto fijado después de 3 horas de incubación en RPMI en presencia de NPS 50 μ M. La inmunofluorescencia para ZO-1 en los bordes celulares presenta un patrón ondulado. La inmunomarcación con ZO-1 falta en algunas zonas de la lámina epitelial.*
- D. Explanto incubado durante 3 horas en RPMI en presencia de NPS 0,5 mM. La inmunofluorescencia para ZO-1 demuestra un patrón poligonal normal, con bordes celulares regulares, similar al observado en los explantos controles.*
- E. Barra de calibración: para A, C y D, 20 μ m; para B, 10 μ m.*

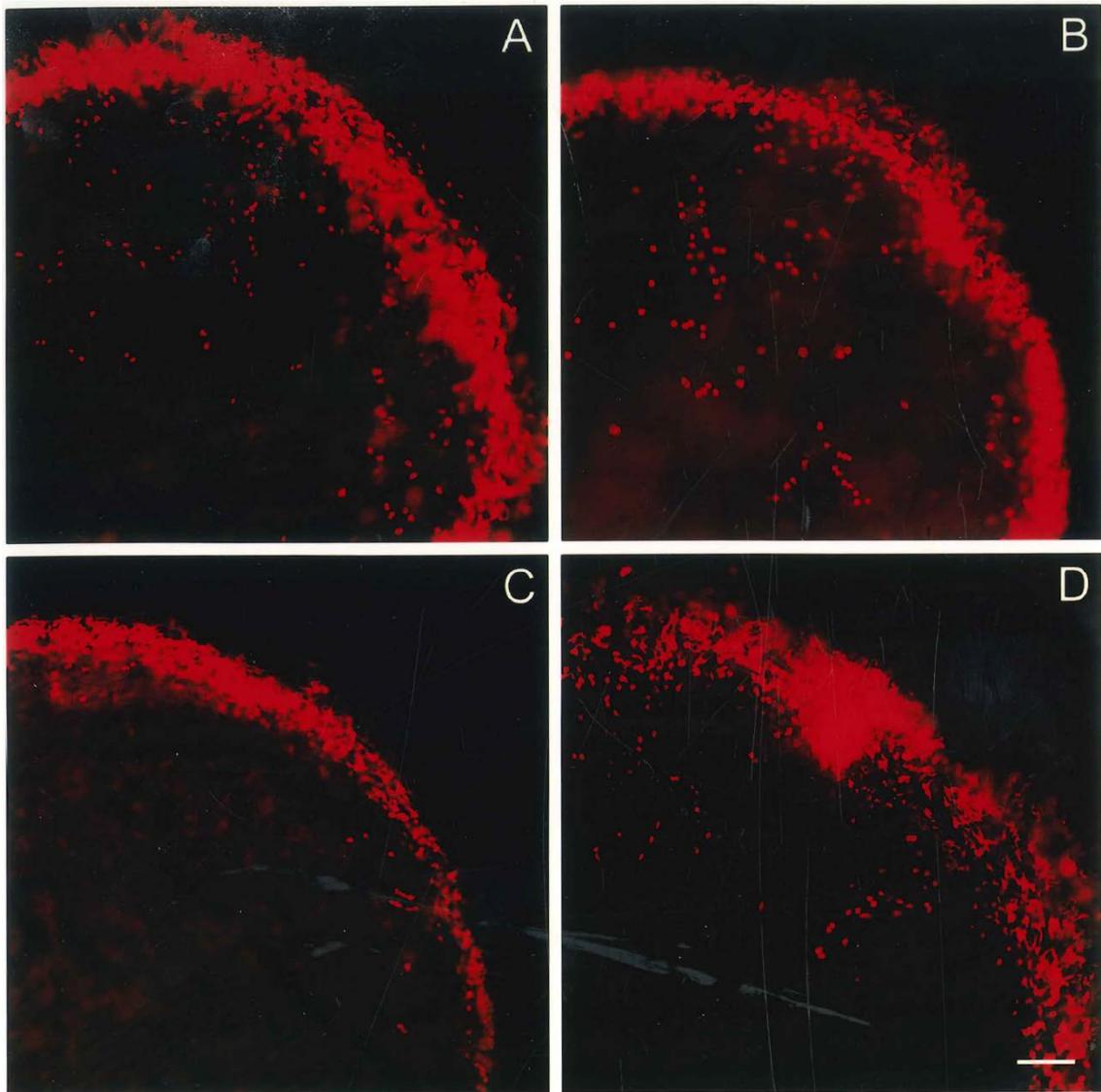


Figura VI. 3. Microfotografías de bajo aumento tomadas con un microscopio de fluorescencia convencional. Los explantos fueron sometidos a la prueba de exclusión de colorante con yoduro de propidio inmediatamente después de su obtención. En todos los casos se observa un anillo periférico de núcleos marcados que refleja la muerte celular por el traumatismo del microsacabocados. La densidad de núcleos marcados en el interior del explanto indica el grado de preservación de las células de la lámina epitelial.

- A. Explanto proveniente de un ratón BALB-c mantenido en condiciones de luz/oscuridad normal y sacrificado a las 7 pm bajo luz roja. Se observan numerosos núcleos marcados con yoduro de propidio en el interior del explanto.*
- B. Explanto proveniente de un ratón BALB-c sacrificado a las 7 pm bajo luz roja, después de 24 horas de oscuridad. Se observa una imagen similar a la anterior, con numerosos núcleos coloreados en el interior del explanto.*

- C. Explanto proveniente de un ratón BALB-c que, como el anterior, fue sacrificado a las 7 pm y bajo luz roja, pero después de 48 horas de oscuridad. Únicamente se observan núcleos coloreados en la periferia del explanto, mientras que en la zona central todas las células excluyen colorante. La leve coloración de fondo corresponde a los planos inferiores del explanto.
- D. Explanto de un ratón C57BL/6J sometido al mismo régimen de iluminación y disección que el ratón cuyo explanto se muestra en C. A pesar de utilizarse las mismas condiciones, aparecen núcleos incapaces de excluir colorante en la zona central del explanto.

Barra de calibración, 25 μm .

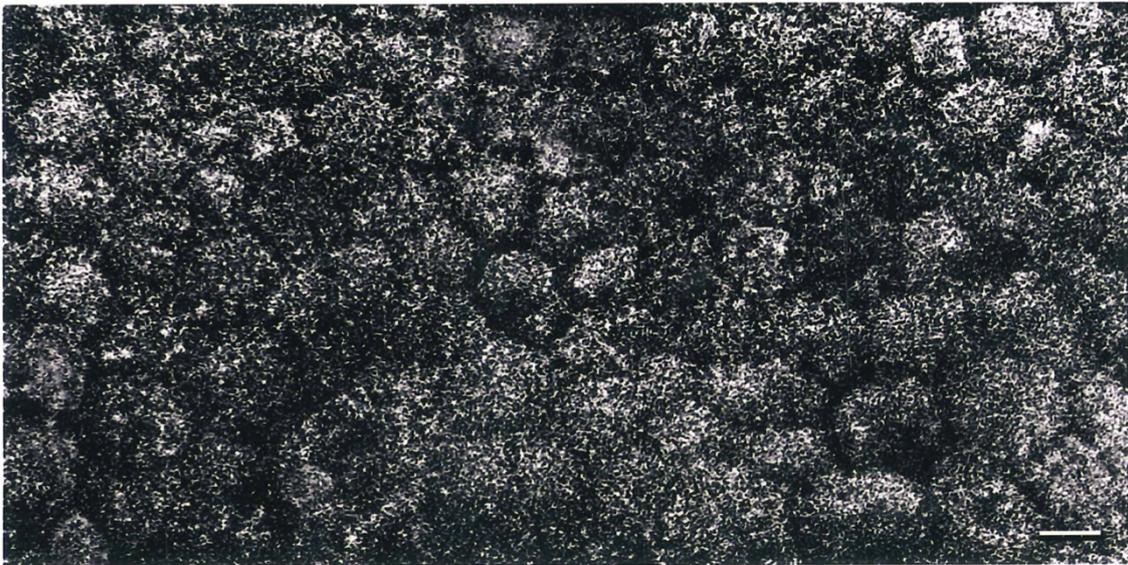


Figura VI.4. Microscopía electrónica de barrido de un explanto proveniente de un ratón BALB-c mantenido en oscuridad durante 48 h y sacrificado a las 7 pm bajo luz roja. Se observa una lámina epitelial continua que cubre la totalidad del explanto. Las células de la lámina epitelial tienen una forma poligonal regular y presentan numerosas microvellosidades en la superficie apical. Barra de calibración: 5 μm .

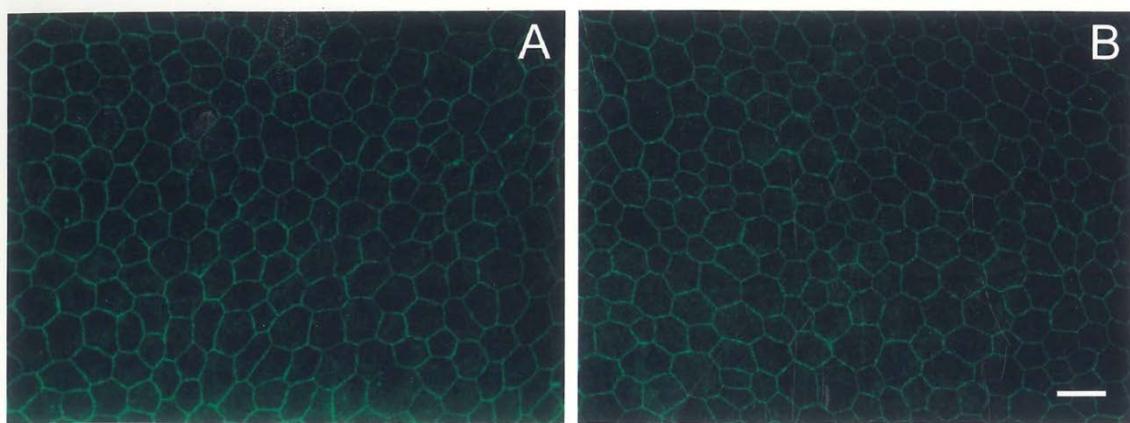


Figura VI.5. Explantos obtenidos de ratones BALB-c sacrificados entre las 8 y 10 pm, bajo luz roja, después de 48 h de oscuridad e incubados en RPMI durante 1 hora (A) y 12 horas (B). AL finalizar el periodo de incubación, los explantos fueron sometidos a la prueba de exclusión de colorante con yoduro de propidio, fijados e inmunomarcados para ZO-1. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal. En los dos casos se observa un patrón poligonal normal que cubre la totalidad de explanto y ausencia completa de coloración nuclear. Barra de calibración: 25 μ m.

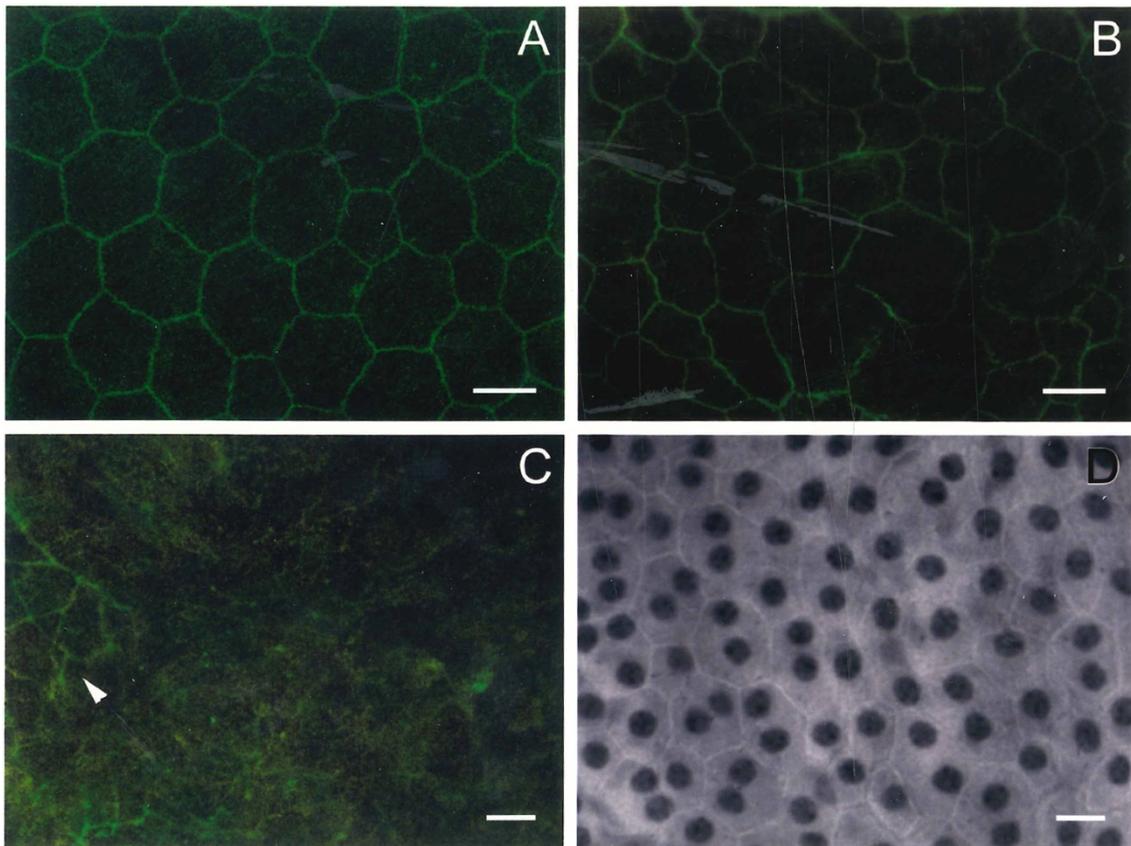


Figura VI.6. Imágenes de microscopía confocal de explantos incubados durante 1 hora en RPMI en presencia de distintas concentraciones de L-NAME. Los explantos fueron obtenidos y procesados de la misma manera que los de la figura VI.4.

- A. Los explantos controles incubados en RPMI muestran un patrón poligonal normal, con una intensa marcación para ZO-1 en los bordes celulares y ausencia de núcleos marcados con yoduro de propidio.*
- B. En los explantos incubados en RPMI con 100 μ M de L-NAME se observa alteración del patrón poligonal, que adquiere características similares a las mostradas en la Figura VI.1.B. Todos los núcleos del área central excluyen el colorante.*
- C. Explanto incubado en RPMI en presencia de L-NAME 200 μ M. El patrón poligonal visualizado con ZO-1 ha desaparecido casi completamente. La punta de flecha blanca indica un pequeño grupo de células que aún presenta una tenue inmunofluorescencia para ZO-1. Todos los núcleos del área central excluyen colorante.*
- D. El explanto mostrado en C fue desmontado y coloreado con violeta de cresilo, para observarlo con microscopía confocal en modo transmisión. La imagen demuestra que el explanto sin inmunofluorescencia para ZO-1 poseía una lámina epitelial continua. Barras de calibración: 15 μ m.*

DISCUSIÓN

La adhesión entre la retina y el EPR es un proceso multifactorial que resulta de los siguientes fenómenos: la presión ejercida por el vítreo, la matriz interfotorreceptora y la presión osmótica de la coroides (Thummann y Hinton, 2001). A estas fuerzas, se une la capacidad del EPR de deshidratar activamente el espacio subretinal (Marmor, 1990). Las interdigitaciones entre las microvellosidades apicales del EPR y los fotorreceptores podrían también participar en el proceso de adhesión, ya que la citocalasina D, que despolimeriza los microfilamentos, debilita la unión retina-EPR (Chiang y col., 1995).

Clínicamente, los desprendimientos de retina se agrupan en tres categorías: (1) regmatógenos, que suceden a una rotura de retina; (2) traccionales, cuando las adherencias vítreas o membranas epiretinales tironean mecánicamente de la retina y (3) exudativos o serosos, secundarios a procesos patológicos que determinan la acumulación de líquido en el espacio subretinal (Bradbury y Landers III, 2001). El estudio experimental de los desprendimientos ha sido realizado en conejos y gatos, abriendo el espacio subretinal mediante la inyección de distintos fluidos (Anderson y col., 1986). Quince minutos después de un desprendimiento de este tipo ya es posible detectar fosforilación del factor de transcripción ERK en los núcleos del EPR (Geller y col., 2001). Algunas horas más tarde desaparecen sus largas y delgadas microvellosidades, que son reemplazadas por microvellosidades más cortas (Anderson y col., 1983). Unas 24 horas después del desprendimiento, la superficie apical del EPR protruye en el espacio subretinal y el núcleo se desplaza hacia una localización más apical (ver Figura IV.2). Estas alteraciones han sido atribuidas a cambios en el citoesqueleto de actina que bordea la cara apical de estas células (Matsumoto y col., 1990). Como la recuperación visual depende de la prontitud del reposicionamiento de la

retina, podemos suponer que estos cambios impiden la recomposición del espacio interfotorreceptor. También podemos especular que las moléculas que impiden esos cambios podrían ser útiles en el tratamiento de los desprendimientos de retina.

A fin de analizar esta posibilidad bajo condiciones controladas, se utilizaron explantos del casquete EPR-coroides-esclera provenientes de ratones de la cepa BALB-c. En los primeros experimentos se obtuvieron los explantos en forma convencional, separando la retina en un medio líquido, tal como se hace para medir la adhesividad *in vitro* (Endo y col., 1988). Sin embargo, la mala conservación de la lámina epitelial durante la ulterior incubación *in vitro* sugirió que este procedimiento lesionaba a las células del EPR. Se comprobó que, a pesar de las máximas precauciones durante la disección, todas las preparaciones contenían células incapaces de excluir colorante, fenómeno que reflejaba la lesión de su membrana citoplasmática. Como estos explantos presentaban un patrón epitelial poligonal regular, con inmunofluorescencia normal para la proteína ZO-1 de las uniones ocluyentes, el daño estaba probablemente localizado en las microvellosidades apicales. Dicha lesión fue confirmada por microscopía electrónica de barrido.

Para obtener explantos con todas sus células capaces de excluir colorantes, fue necesario mantener a los animales en oscuridad completa al menos durante 48 horas y sacrificarlos después de las 7 pm bajo luz roja. Estos explantos mostraron total conservación de sus microvellosidades. Tanto la duración del periodo de adaptación a la oscuridad como la hora del día fueron requisitos indispensables. Estas condiciones pueden ser explicadas por los cambios sufridos por la matriz interfotorreceptora bajo distintas condiciones de iluminación (Uehara y col., 1991). Además, el desprendimiento de los discos de los fotorreceptores y la fagocitosis de los mismos por el EPR depende de un ritmo circadiano que tiene su máximo pocas horas después del encendido de la luz

(LaVail, 1980). Este fenómeno sugiere que a las 7 pm, después del apagado de la luz, los contactos entre fotorreceptores y microvellosidades del EPR serían mínimos. Sin embargo, el mismo protocolo de disección no fue suficiente para conseguir explantos indemnes a partir de ratones C57BL/6J. Estas diferencias probablemente se deben al menor número de fotorreceptores existentes en los BALB-c (Donatien y Jeffery, 2002).

Es posible argumentar que las primeras preparaciones serían comparables al EPR después de un desprendimiento traccional; mientras que las segundas, sin lesión de las microvellosidades, simularían el estado del EPR después de un desprendimiento por modificaciones intrínsecas del espacio interfotorreceptor. La mayor fragilidad del EPR en los ratones pigmentados C57BL/6J sugiere, sin embargo, que es poco probable la producción de un desprendimiento espontáneo sin lesiones en la membrana apical del EPR.

Las incubaciones con NPS de los explantos obtenidos con el protocolo 1, sugieren que NO puede, dentro de ciertos límites de concentración, mantener la estructura de las uniones ocluyentes, aún cuando la membrana celular se encuentre lesionada. El efecto del NPS observado en este tipo de explantos concuerda con los resultados obtenidos en monocapas de EPR, donde el dador de NO 3-morpholino-sydnonimine induce un aumento de la resistencia eléctrica transepitelial, sin llegar a alterar la inmunorreactividad para ZO-1 (Zech y col., 1998). El efecto protector probablemente es más evidente cuando las uniones estrechas están previamente lesionadas, ya que NO protege la barrera hemato-cerebral en un modelo lesionado experimentalmente por hipoxia/reoxigenación, pero no influye sobre su función bajo condiciones de normoxia (Utepbergenov y col., 1998). En concordancia con esas observaciones, tampoco pudimos demostrar un efecto de NPS sobre los explantos obtenidos con el protocolo 2, mejor preservados que los anteriores.

Las uniones ocluyentes de estos últimos explantos, sin embargo, fueron sensibles al bloqueo de la sintasa de NO producido por L-NAME. Estas observaciones sugieren que los explantos producen NO endógeno suficiente para mantener la organización estructural de las uniones ocluyentes. En condiciones basales, el EPR no contiene la isoforma inducible (Goureau y col., 1995). Por lo tanto, suponemos que el NO endógeno proviene de una sintasa constitutiva, probablemente la isoforma endotelial. Se ha demostrado que la ausencia de esta isoforma agrava las situaciones con inflamación y edema cerebral (Koedel y col., 2001), mientras que por el contrario, la ausencia de la isoforma inducible protege la función de la barrera hemato-cerebral (Winkler y col., 2001).

Para comprender qué relación existe entre la dispersión de la inmunorreactividad de ZO-1 en una lámina epitelial que mantiene la forma y vitalidad de sus células, sería necesario estudiar cuáles son los cambios concomitantes sufridos por el citoesqueleto. Una explicación posible es la pérdida de los microfilamentos asociados a las uniones ocluyentes (Gordon y Essner, 1987) cuando los niveles de NO son insuficientes, sin alteraciones de las proteínas citoesqueléticas necesarias para mantener la forma celular y las uniones adherentes. Las modificaciones inducidas por NO podrían incluso dejar casi intacta la organización de las uniones ocluyentes, tal como ocurre en células epiteliales renales tratadas con ésteres de forbol, donde se pierde el patrón inmunohistoquímico de ZO-1 y se reduce la resistencia eléctrica transepitelial sin modificaciones en la localización de ocludina ni en la ultraestructura de la unión ocluyente (Clarke y col., 2000). Un efecto semejante ocurre en células de epitelio colónico tratadas con la toxina A de *Clostridium difficile* (Chen y col., 2002). La ocludina es una proteína transmembranosa de las uniones ocluyentes que también

interactúa en forma directa con los filamentos de actina (Wittchen y col., 1999). Estas hipótesis merecen ser estudiadas en el futuro.

Estos resultados demuestran que el NO podría regular la permeabilidad de la barrera hemato-ocular y que sus niveles podrían desempeñar un importante papel en la evolución de los desprendimientos de retina. El modelo de explantos diseñado para este trabajo aparece como una buena herramienta para estudiar los efectos de este neuromediador sobre el estado funcional de dicha barrera y las posibles transformaciones fenotípicas de las células del EPR.

CONCLUSIONES

La proliferación vitreoretinal (PVR) es una patología ocular que se caracteriza por el desarrollo de membranas celulares en la cavidad vítrea y/o sobre ambas superficies de la retina. La evolución de la PVR sugiere la existencia de una cascada de eventos, que generalmente comienza con un desprendimiento de retina, y que culmina en el desarrollo de esta enfermedad. Desde hace unos años se piensa que algunos neuromediadores podrían participar en dicha cascada.

A partir de los estudios preliminares sobre los neuromediadores potencialmente involucrados en el desarrollo de la PVR, seleccionamos el neuropéptido Y y su receptor Y1; el óxido nítrico y las enzimas que lo sintetizan. Los resultados de los trabajos presentados en esta Tesis demuestran que ambos neuromediadores participarían en mecanismos celulares inherentes al desarrollo de esta enfermedad.

Los estudios inmunohistoquímicos en muestras quirúrgicas obtenidas de pacientes con diagnóstico de PVR, demostraron la expresión del receptor Y1 del neuropéptido Y en las células de Müller de la retina lesionada y en células derivadas de la glia retinal en las membranas. Estos resultados indican que la transformación fenotípica de la glia de la retina que ocurre en una PVR incluye la expresión de este receptor. Son necesarios nuevos estudios para determinar si este fenómeno es propio de la enfermedad, o es un concomitante de la reacción glial que se produce. En ambas situaciones, la activación de este receptor, que en condiciones normales no se expresa en las células de Müller, parecería ser importante para la fisiopatología de la PVR. La activación del receptor Y1, mediada por NPY u otro ligando no identificado, podría tener un efecto tanto sobre la proliferación de las células de Müller, como sobre la capacidad de estas células para contraerse.

La detección inmunohistoquímica de las sintasas del óxido nítrico en estas mismas muestras, demostró la expresión de las sintasas constitutivas, neuronal y endotelial, en la retina lesionada y en células de las membranas. El modelo de PVR en el conejo confirmó la expresión de estas enzimas durante la evolución de la enfermedad, también en las células de Müller, las mismas que expresan Y1 cuando la retina está lesionada. Postulamos que la expresión de las sintasas de NO en las células de Müller de la retina, al igual que la del receptor Y1, estaría relacionada con los mecanismos que controlan la proliferación de estas células. Las sintasas de NO también se expresan histoquímicamente en las células de las membranas. Pero a diferencia del receptor Y1, que sólo se encuentra en células de estirpe glial, las sintasas de NO también aparecen en miofibroblastos. Entonces, además de considerar el posible papel del óxido nítrico en la proliferación glial, hemos analizado su relación con los procesos de fibrosis. De estos resultados se desprende que ambos sistemas de transducción de señales estarían involucrados en la patogenia de la PVR, tal vez desde sus etapas iniciales.

Diversas consideraciones experimentales nos hicieron ver la necesidad de desarrollar un nuevo modelo experimental de PVR en ratones. Para lograrlo, efectuamos inyecciones intravítreas de dispa en ratones pigmentados C57BL/6J. Estas indujeron lesiones reproducibles, que se asemejan desde sus primeras etapas a la PVR humana. La PVR del ratón se inició con la aparición de células portadoras de marcadores de macrófagos en la cavidad vítrea, seguida por la aparición de pliegues retinales y el crecimiento ulterior de membranas intravítreas y subretinales. Los hallazgos en este modelo indican la importancia de la ruptura hemato-ocular externa, que permite la invasión de la cavidad vítrea por los macrófagos y originaría también los microdesprendimientos retinales. Hemos confirmado que estos microdesprendimientos o plegamientos, que afectan fundamentalmente a la retina externa, ocurren antes que el

crecimiento de las membranas. Efectivamente, la rápida hiperexpresión de GFAP en las células de Müller y del marcador de activación F4/80 en la microglia, indica que estos son los fenómenos que debemos seguir estudiando para comprender el crecimiento de las membranas y su eventual recidiva en ciertos pacientes.

Otra conclusión importante de nuestro modelo, fue que las membranas epiretinales del ratón pudieron formarse y crecer hasta fibrosarse sin la contribución de las células del EPR. Aunque numerosos estudios indican la presencia de este tipo celular en las membranas epiretinales humanas, su ausencia en el ratón sugiere una diferencia de especie o, lo que es más probable, su ausencia en los estadios iniciales del crecimiento membranoso.

Pensamos que este nuevo modelo de PVR será de gran utilidad, tanto para el estudio de las etapas iniciales de la enfermedad, como para el ensayo de nuevos tratamientos farmacológicos. El empleo de ratones será también importante para comprender los factores genéticos que predisponen al desarrollo y recidiva de las membranas, ya que permitirá el uso de animales genéticamente modificados.

Los experimentos realizados para obtener explantos de EPR demostraron que la adhesividad de la retina al EPR depende de al menos tres factores: la adaptación a la oscuridad, un ritmo circadiano de adhesividad y la pigmentación. Nuestras observaciones sugieren que, cuando la retina se ha separado del EPR, el NO podría cumplir un papel importante en el mantenimiento de las uniones ocluyentes que constituyen la base celular de la barrera hemato-ocular externa.

Los resultados presentados en esta Tesis sugieren que por lo menos dos mecanismos de señalización, el receptor Y1 del neuropéptido Y, y la producción endógena de óxido nítrico, están fuertemente involucrados en la patogenia de la PVR, probablemente desde el inicio de esta enfermedad.

Referencias

- Abounader R, Elhusseiny A, Cohen Z, Olivier A, Stanimirovic D, Quirion R, Hamel E (1999) Expression of Neuropeptide Y Receptors mRNA and Protein in Human Brain Vessels and Cerebromicrovascular Cells in Culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:155-163.
- Abu El-Asrar AM, Desmet S, Meersschaert A, Dralands L, Missotten L, Geboes K (2001) Expression of the Inducible Isoform of Nitric Oxide Synthase in the Retinas of Human Subjects with Diabetes Mellitus. *Am J Ophthalmol* 132:551-556.
- Ammar DA, Hughes BA, Thompson DA (1998) Neuropeptide Y and the Retinal Pigment Epithelium: Receptor Subtypes, Signaling, and Bioelectrical Responses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:1870-1878.
- Anderson DH, Stern WH, Fisher SK, Erickson PA, Borgula GA (1983) Retinal Detachment in the Cat: The Pigment Epithelial-Photoreceptor Interface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:906-926.
- Anderson DH, Guerin CJ, Erickson PA, Stern WH, Fisher SK (1986) Morphological Recovery in the Reattached Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27:168-183.
- Ando N, Sen HA, Berkowitz BA, Wilson CA, De Juan E, Jr. (1994) Localization and Quantitation of Blood-Retinal Barrier Breakdown in Experimental Proliferative Vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 112:117-122.
- Andrews A, Balciunaite E, Leong FL, Tallquist M, Soriano P, Refojo M, Kazlauskas A (1999) Platelet-Derived Growth Factor plays a key role in Proliferative Vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2683-2689.
- Bao L, Kopp J, Zhang X, Xu ZQ, Zhang LF, Wong H, Walsh J, Hokfelt T (1997) Localization of Neuropeptide Y Y1 Receptors in Cerebral Blood Vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12661-12666.
- Baudouin C, Fredj-Reygrobellet D, Gordon WC, Baudouin F, Peyman G, Lapalus P, Gstaad P, Bazan NG (1990) Immunohistologic study of Epiretinal Membranes in Proliferative Vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 110:593-598.
- Barthel, L.K. and Raymond, P.A. (1990). Improved method for obtaining 3 μ m cryosections for immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 38,1383-8.

- Berger AS, Cheng CK, Pearson PA, Ashton P, Crooks PA, Cynkowski T, Cynkowska G, Jaffe GJ (1996) Intravitreal sustained release Corticosteroid-5-Fluoruracil conjugate in the treatment of Experimental Proliferative Vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:2318-2325.
- Bjorklund H, Bignami A, Dahl D (1985) Immunohistochemical demonstration of Glial Fibrillary Acidic Protein in Normal Rat Muller Glia and Retinal Astrocytes. *Neurosci Lett* 54:363-368.
- Blomqvist AG, Herzog H (1997) Y-receptor subtypes--how many more? *Trends Neurosci* 20:294-298.
- Bradbury MJ, Landers I Mb (2001) Pathogenetic Mechanisms of Retinal Detachment. In: *Retina, Third Edition* (Ryan S, Ed), Pp 1987-1993: Mosby.
- Bruun A, Edvinsson L, Ehinger B (1994) Neuropeptide Y Inhibits Adenylyl Cyclase Activity in Rabbit Retina. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 72:326-331.
- Burke JM, Twining SS (1987) Vitreous macrophage elicitation: Generation of stimulants for Pigment Epithelium in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:1100-1107.
- Burns MS, Robles M (1990) Muller cell GFAP expression exhibits gradient from focus of photoreceptor light damage. *Curr Eye Res* 9:479-486.
- Caillol M, Devinoy E, Lacroix MC, Schirar A (2000) Endothelial and neuronal nitric oxide synthases are present in the suprachiasmatic nuclei of Syrian hamsters and rats. *Eur J Neurosci* 12:649-661.
- Campochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM, Cardin A, Michels RG (1985) Vitreous aspirates from patients with proliferative vitreoretinopathy stimulate retinal pigment epithelial cell migration. *Arch Ophthalmol* 103:1403-1405.
- Campochiaro PA, Bryan JA, Conway BP, Jaccoma EH (1986) Intravitreal chemotactic and mitogenic activity. Implication of blood- retinal barrier breakdown. *Arch Ophthalmol* 104:1685-1687.
- Campochiaro PA (2001) Pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. In: *Retina* (Ryan S, Ed), Pp 2221-2227: Mosby.

- Cantó Soler MV, Gallo JE, Dodds RA, Hökfelt T, Villar MJ, Suburo AM (2002) "The Y1 Receptor of Neuropeptide Y as a glial marker in Proliferative Vitreoretinopathy and diseased human retina". *Glia*.
- Casaroli-Marano RP, Pagan R, Vilaro S (1999) Epithelial-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy: intermediate filament protein expression in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2062-2072.
- Cassidy L, Barry P, Shaw C, Duffy J, Kennedy S (1998) Platelet Derived Growth Factor and Fibroblast Growth Factor basic levels in the vitreous of patients with vitreoretinal disorders. *Br J Ophthalmol* 82:181-185.
- Chakravarthy U, Stitt AW, McNally J, Bailie Jr, Hoey Em, Duprex P (1995) Nitric oxide synthase activity and expression in retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Curr Eye Res* 14:285-294.
- Chang C, Wang X, Caldwell RB (1997) Serum opens tight junctions and reduces ZO-1 protein in retinal epithelial cells. *J Neurochem* 69:859-867.
- Charteris DG, Hiscott P, Grierson I, Lightman SL (1992) Proliferative Vitreoretinopathy. Lymphocytes in Epiretinal Membranes. *Ophthalmology* 99:1364-1367.
- Charteris DG, Hiscott P, Robey HL, Gregor ZJ, Lightman SL, Grierson I (1993) Inflammatory cells in proliferative vitreoretinopathy subretinal membranes. *Ophthalmology* 100:43-46.
- Charteris DG (1995) Proliferative Vitreoretinopathy: pathobiology, surgical management, and adjunctive treatment. *Br J Ophthalmol* 79:953-960.
- Chen ML, Pothoulakis C, Lamont JT (2002) Protein Kinase C signaling regulates ZO-1 translocation and increased paracellular flux of T84 colonocytes exposed to *Clostridium difficile* Toxin A. *J Biol Chem* 277:4247-4254.
- Chiang RK, Yao XY, Takeuchi A, Dalal R, Marmor MF (1995) Cytochalasin D reversibly weakens retinal adhesiveness. *Curr Eye Res* 14:1109-1113.
- Chiou GC (2001) Review: Effects of nitric oxide on eye diseases and their treatment. *J Ocul Pharmacol Ther* 17:189-198.

- Choudhury P, Chen W, Hunt RC (1997) Production of Platelet-Derived Growth Factor by Interleukin-1 Beta and Transforming Growth Factor-Beta-stimulated retinal pigment epithelial cells leads to contraction of collagen gels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:824-833.
- Clarke H, Soler AP, Mullin JM (2000) Protein Kinase C activation leads to dephosphorylation of Occludin and tight junction permeability increase in LLC-Pk1 epithelial cell sheets. *J Cell Sci* 113:3187-3196.
- Cleary PE, Ryan SJ (1979) Experimental posterior penetrating eye injury in the rabbit. I. Method of production and natural history. *Br J Ophthalmol* 63:306-311.
- Crafoord S, Algvere PV, Seregard S, Kopp ED (1999) Long-Term outcome of RPE allografts to the subretinal space of rabbits. *Acta Ophthalmol Scand* 77:247-254.
- Crowe R, Parkhouse N, Mcgrouther D, Burnstock G (1994) Neuropeptide-containing nerves in painful hypertrophic human scar tissue. *Br J Dermatol* 130:444-452.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, De Sarro A, Caputi AP (2000) Role of free radicals and poly(adp-ribose) synthetase in intestinal tight junction permeability. *Mol Med* 6:766-778.
- Dahl D, Bignami A (1982) Immunohistological localization of desmin, the muscle-type 100 a filament protein, in rat astrocytes and muller glia. *J Histochem Cytochem* 30:207-213.
- Dinerman JL, Dawson TM, Schell MJ, Snowman A, Snyder SH (1994) Endothelial Nitric Oxide Synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4214-4218.
- Distler C, Weigel H, Hoffmann KP (1993) Glia cells of the monkey retina. I. Astrocytes. *J Comp Neurol* 333:134-147.
- Donatien P, Jeffery G (2002) Correlation between rod photoreceptor numbers and levels of ocular pigmentation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1198-1203.
- Dyer MA, Cepko CL (2000) Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci* 3:873-880.

- Eagleton MJ, Peterson DA, Sullivan VV, Roelofs KJ, Ford JA, Stanley JC, Upchurch GR, Jr. (2002) Nitric Oxide inhibition increases aortic wall matrix metalloproteinase-9 expression. *J Surg Res* 104:15-21.
- Ehrenberg M, Thresher RJ, Machemer R (1984) Vitreous hemorrhage nontoxic to retina as a stimulator of glial and fibrous proliferation. *Am J Ophthalmol* 97:611-626.
- Endo EG, Yao XY, Marmor MF (1988) Pigment adherence as a measure of retinal adhesion: dependence on temperature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29:1390-1396.
- Esser P, Heimann K, Wiedemann P (1993) Macrophages in Proliferative Vitreoretinopathy and Proliferative Diabetic Retinopathy: differentiation of subpopulations. *Br J Ophthalmol* 77:731-733.
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein Occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273:29745-29753.
- Fastenberg DM, Diddie KR, Sorgente N, Ryan SJ (1982) A comparison of different cellular inocula in an experimental model of Massive Periretinal Proliferation. *Am J Ophthalmol* 93:559-564.
- Ferrini MG, Vernet D, Magee TR, Shahed A, Qian A, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid NF (2002) Antifibrotic role of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Nitric Oxide* 6:283-294.
- Fisher SK, Erickson PA, Lewis GP, Anderson DH (1991) Intraretinal proliferation induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:1739-1748.
- Fischer AJ, Stell WK (1999) Nitric Oxide Synthase-containing cells in the retina, pigmented epithelium, choroid, and sclera of the chick eye. *J Comp Neurol* 405:1-14.
- Fisher SK, Anderson DH (2001) Cellular Effects of Detachment on the Neural Retina and the Retinal Pigment Epithelium. In: *Retina, 3 Edition* (Ryan S, Ed), Pp 1961-1986: Mosby.
- Francke M, Faude F, Pannicke T, Bringmann A, Eckstein P, Reichelt W, Wiedemann P, Reichenbach A (2001) Electrophysiology of rabbit Müller (Glial) cells in experimental retinal detachment and PVR. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1072-1079.
- Frenzel EM, Neely KA, Walsh AW, Cameron JD, Gregerson DS (1998) A New Model of Proliferative Vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2157-2164.

- Garcia-Arumi J, Corcostegui B, Tallada N (1992) Subretinal Membranes in Proliferative Vitreoretinopathy. An immunohistochemical study. *Retina* 12:S55-59.
- Garcia-Layana A, Pastor JC, Saornil MA, Gonzalez G (1997) Porcine model of Proliferative Vitreoretinopathy with platelets. *Curr Eye Res* 16:556-563.
- Garcia-Vitoria M, Garcia-Corchon C, Rodriguez JA, Garcia-Amigot F, Burrell MA (2000) Expression of Neuronal Nitric Oxide Synthase in several cell types of the rat gastric epithelium. *J Histochem Cytochem* 48:1111-1120.
- Geller SF, Lewis GP, Fisher SK (2001) FGFR1, signaling, and Ap-1 expression after Retinal Detachment: reactive Muller and RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1363-1369.
- Gimpl G, Kirchhoff F, Lang Re, Kettenmann H (1993) Identification of Neuropeptide Y Receptors in cultured astrocytes from neonatal rat brain. *J Neurosci Res* 34:198-205.
- Girard P, Mimoun G, Karpouzas I, Montefiore G (1994) Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery. *Retina* 14:417-424.
- Goldberg Y, Taimor G, Piper HM, Schluter KD (1998) Intracellular signaling leads to the hypertrophic effect of Neuropeptide Y. *Am J Physiol* 275:C1207-1215.
- Gonzalez-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A (2000) Maguk proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 11:315-324.
- Gordon Sr, Essner E (1987) Investigations on circumferential microfilament bundles in rat retinal pigment epithelium. *Eur J Cell Biol* 44:97-104.
- Goureau O, Faure V, Courtois Y (1995) Fibroblast Growth Factors decrease Inducible Nitric Oxide Synthase mRNA accumulation in bovine retinal pigmented epithelial cells. *Eur J Biochem* 230:1046-1052.
- Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK (1990a) Changes in intermediate filament immunolabeling occur in response to retinal detachment and reattachment in primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:1474-1482.
- Guerin CJ, Wolfshagen RW, Eifrig DE, Anderson DH (1990b) Immunocytochemical identification of Muller's Glia as a component of human Epiretinal Membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:1483-1491.

- Hardwick C, Feist R, Morris R, White M, Witherspoon D, Angus R, Guidry C (1997) Tractional force generation by porcine Müller cells: stimulation by growth factors in human vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2053-2063.
- Herzog H, Baumgartner M, Vivero C, Selbie LA, Auer B, Shine J (1993) Genomic organization, localization, and allelic differences in the gene for the human Neuropeptide Y Y1 Receptor. *J Biol Chem* 268:6703-6707.
- Hilton GF, Mclean JB, Brinton DA (1995) Retinal Detachment. Principles And Practice. In: Second Edition Edition (Ophthalmology Aao, Ed). San Francisco, Ca.
- Hirota A, Gregory DS (1996) Neuropeptide Y levels in the aqueous humor of rabbits. *J Ocul Pharmacol Ther* 12:51-56.
- Hiscott PS, Grierson I, Trombetta CJ, Rahi AH, Marshall J, McLeod D (1984) Retinal and epiretinal glia--an immunohistochemical study. *Br J Ophthalmol* 68:698-707.
- Hiscott P, Morino I, Alexander R, Grierson I, Gregor Z (1989) Cellular components of Subretinal Membranes in Proliferative Vitreoretinopathy. *Eye* 3:606-610.
- Hiscott P, Grierson I (1991) Subretinal Membranes of Proliferative Vitreoretinopathy. *Br J Ophthalmol* 75:53.
- Hogaboam CM, Gallinat CS, Bone-Larson C, Chensue SW, Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL (1998) Collagen deposition in a non-fibrotic lung granuloma model after nitric oxide inhibition. *Am J Pathol* 153:1861-1872.
- Hökfelt T, Broberger C, Zhang X, Diez M, Kopp J, Xu Z, Landry M, Bao L, Schalling M, Koistinaho J, Dearmond SJ, Prusiner S, Gong J, Walsh JH (1998) Neuropeptide Y: some viewpoints on a multifaceted peptide in the normal and diseased nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 26:154-166.
- Holtkamp GM, Kijlstra A, Peek R, De Vos AF (2001) Retinal Pigment Epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes. *Prog Retin Eye Res* 20:29-48.
- Hosli L, Hosli E, Kaeser H, Lefkovits M (1992) Colocalization of receptors for vasoactive peptides on astrocytes of cultured rat spinal cord and brain stem: electrophysiological effects of Atrial and Brain Natriuretic Peptide, Neuropeptide Y and Bradykinin. *Neurosci Lett* 148:114-116.

- Hosli E, Hosli L (1993) Autoradiographic localization of binding sites for Neuropeptide Y and bradykinin on astrocytes. *Neuroreport* 4:159-162.
- Hui YN, Hu D (1999) Prevention of experimental proliferative vitreoretinopathy with daunomycin and triamcinolone based on the time course of the disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237:601-605.
- Hunt RC, Pakalnis VA, Choudhury P, Black EP (1994) Cytokines and serum cause alpha 2 beta 1 integrin-mediated contraction of collagen gels by cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:955-963.
- Ignarro LJ (1989) Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *Faseb J* 3:31-36.
- Ikuno Y, Leong FL, Kazlauskas A (2000) Attenuation Of experimental proliferative vitreoretinopathy by inhibiting the platelet-derived growth factor receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3107-3116.
- Jerdan JA, Pepose JS, Michels RG, Hayashi H, De Bustros S, Sebag M, Glaser BM (1989) Proliferative Vitreoretinopathy membranes. An immunohistochemical study. *Ophthalmology* 96:801-810.
- Kawahara K, Gotoh T, Oyadomari S, Kuniyasu A, Kohsaka S, Mori M, Nakayama H (2001) Nitric Oxide inhibits the proliferation of murine microglial mg5 cells by a mechanism involving P21 but independent of P53 and cyclic guanosine monophosphate. *Neurosci Lett* 310:89-92.
- Kieselbach GF, Wiedermann C, Kunze C, Gottinger W, Humpel C, Saria A (1991) Elevated levels of Substance P in intraocular fluid in proliferative vitreoretinopathy. *Peptides* 12:275-278.
- Kim IB, Lee EJ, Kim KY, Ju WK, Oh SJ, Joo CK, Chun MH (1999) Immunocytochemical localization of Nitric Oxide Synthase in the mammalian retina. *Neurosci Lett* 267:193-196.
- Kim J, Ruff M, Karwatowska-Prokopczuk E, Hunt L, Ji H, Pert CB, Zukowska-Grojec Z (1998) Hiv envelope protein Gp120 induces Neuropeptide Y Receptor-mediated proliferation of vascular smooth muscle cells: relevance to aids cardiovascular pathogenesis. *Regul Pept* 75-76:201-205.

- Kirman M, Santana M, Sorgente N, Wiedemann P, Ryan SJ (1983) Antiproliferative drugs in the treatment of experimental proliferative vitreoretinopathy. *Retina* 3:269-272.
- Kobayashi M, Kuroiwa T, Shimokawa R, Okeda R, Tokoro T (2000) Nitric Oxide Synthase expression in ischemic rat retinas. *Jpn J Ophthalmol* 44:235-244.
- Kobzik L, Reid MB, Brecht DS, Stamler JS (1994) Nitric Oxide in skeletal muscle. *Nature* 372:546-548.
- Koedel U, Paul R, Winkler F, Kastenbauer S, Huang PL, Pfister HW (2001) Lack of Endothelial Nitric Oxide Synthase aggravates murine pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:1041-1050.
- Kohno T, Sorgente N, Ishibashi T, Goodnight R, Ryan SJ (1987) Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:506-514.
- Kon CH, Occleston NL, Charteris D, Daniels J, Aylward GW, Khaw PT (1998) A prospective study of matrix metalloproteinases in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:1524-1529.
- Kristof AS, Marks-Konczalik J, Moss J (2001) Mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1-dependent human inducible nitric-oxide synthase promoter activation. *J Biol Chem* 276:8445-8452.
- Laqua H, Machemer R (1975a) Glial cell proliferation in retinal detachment (Massive Periretinal Proliferation). *Am J Ophthalmol* 80:602-618.
- Laqua H, Machemer R (1975b) Clinical-pathological correlation in Massive Periretinal Proliferation. *Am J Ophthalmol* 80:913-929.
- Larhammar D (1996) Structural diversity of receptors for Neuropeptide Y, Peptide YY and Pancreatic Polypeptide. *Regul Pept* 65:165-174.
- LaVail MM (1980) Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19:407-411.
- Lean JS, Stern WH, Irvine AR, Azen SP (1989) Classification of Proliferative Vitreoretinopathy used in The Silicone Study. The Silicone Study Group. *Ophthalmology* 96:765-771.

- Leaver PK (1995) Proliferative Vitreoretinopathy. *Br J Ophthalmol* 79:871-872.
- Lewis GP, Erickson PA, Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK (1989) Changes in the expression of specific Müller cell proteins during long- term retinal detachment. *Exp Eye Res* 49:93-111.
- Lewis G, Mervin K, Valter K, Maslim J, Kappel PJ, Stone J, Fisher S (1999) Limiting the proliferation and reactivity of retinal Müller cells during experimental retinal detachment: the value of oxygen supplementation. *Am J Ophthalmol* 128:165-172.
- Lewis GP, Fisher SK (2000) Müller cell outgrowth after retinal detachment: association with cone photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:1542-1545.
- Limb GA, Franks WA, Munasinghe KR, Chignell AH, Dumonde DC (1993) Proliferative Vitreoretinopathy: An examination of the involvement of lymphocytes, adhesion molecules and HLA-DR antigens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231:331-336.
- Lopez-Costa JJ, Goldstein J, Saavedra JP (1997) Neuronal and macrophagic nitric oxide synthase isoforms distribution in normal rat retina. *Neurosci Lett* 232:155-158.
- Lowry R (2001) Vassarstats, Web Site For Statistical Computation. [<http://faculty.vassar.edu/Lowry/Vassarstats.html>]. Accessed 4 March 2002. In.
- Macfarlane SN, Sontheimer H (2000) Changes in ion channel expression accompany cell cycle progression of spinal cord astrocytes. *Glia* 30:39-48.
- Machemer R, Laqua H (1975) Pigment epithelium proliferation in Retinal Detachment (Massive Periretinal Proliferation). *Am J Ophthalmol* 80:1-23.
- Machemer R (1977) Massive Periretinal Proliferation: a logical approach to therapy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 75:556-586.
- Machemer R (1978) Pathogenesis and classification of Massive Periretinal Proliferation. *Br J Ophthalmol* 62:737-747.
- Machemer R (1988) Proliferative Vitreoretinopathy (PVR): A personal account of its pathogenesis and treatment. Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29:1771-1783.

- Machemer R, Aaberg TM, Freeman HM, Irvine AR, Lean JS, Michels RM (1991) An updated classification of Retinal Detachment with Proliferative Vitreoretinopathy. *Am J Ophthalmol* 112:159-165.
- Marletta MA (1989) Nitric Oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem Sci* 14:488-492.
- Marmor MF (1990) Control of subretinal fluid: experimental and clinical studies. *Eye* 4:340-344.
- Marmor MF (2001) Mechanism of normal retinal adhesion. In: *Retina* (Ryan SJ, Ed): Mosby.
- Matsumoto B, Guerin CJ, Anderson DH (1990) cytoskeletal redifferentiation of feline, monkey, and human RPE cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:879-889.
- Matsumoto T, Nakane M, Pollock JS, Kuk JE, Forstermann U (1993) A correlation between soluble Brain Nitric Oxide Synthase and NADPH- diaphorase activity is only seen after exposure of the tissue to fixative. *Neurosci Lett* 155:61-64.
- McGille GS, Dacheux RF (1998) Migration of retinal microglia in experimental proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Res* 67:371-375.
- Mietz H, Stodtler M, Wiedemann P, Heimann K (1994a) Immunohistochemistry of cellular proliferation in eyes with longstanding retinal detachment. *Int Ophthalmol* 18:329-337.
- Mietz H, Walshe R, Wiedemann P, Heimann K, Green WR (1994b) Histopathologic study of epiretinal proliferations after vitrectomy with daunomycin and silicone oil. *Retina* 14:425-429.
- Mietz H, Heimann K (1995) Onset and recurrence of proliferative vitreoretinopathy in various vitreoretinal disease. *Br J Ophthalmol* 79:874-877.
- Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M (1998) Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes* 47:445-449.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142.

- Morino I, Hiscott P, Mckechnie N, Grierson I (1990) Variation in epiretinal membrane components with clinical duration of the proliferative tissue. *Br J Ophthalmol* 74:393-399.
- Morishima Y, Nomura A, Uchida Y, Noguchi Y, Sakamoto T, Ishii Y, Goto Y, Masuyama K, Zhang MJ, Hirano K, Mochizuki M, Ohtsuka M, Sekizawa K (2001) Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:1-11.
- Most D, Efron DT, Shi HP, Tantry US, Barbul A (2001) Differential cytokine expression in skin graft healing in Inducible Nitric Oxide Synthase knockout mice. *Plast Reconstr Surg* 108:1251-1259.
- Nagasaki H, Shinagawa K, Mochizuki M (1998) Risk factors for Proliferative Vitreoretinopathy. *Prog Retin Eye Res* 17:77-98.
- Neufeld AH, Shareef S, Pena J (2000) Cellular localization of Neuronal Nitric Oxide Synthase (Nos-1) in the human and rat retina. *J Comp Neurol* 416:269-275.
- Newman E, Reichenbach A (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19:307-312.
- Ohshima H, Brouet IM, Bandaletova T, Adachi H, Oguchi S, Iida S, Kurashima Y, Morishita Y, Sugimura T, Esumi H (1992) Polyclonal antibody against an Inducible form of Nitric Oxide Synthase purified from the liver of rats treated with propionibacterium acnes and lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1291-1297.
- Okada M, Matsumura M, Ogino N, Honda Y (1990) Müller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 228:467-474.
- Park SK, Lin HL, Murphy S (1997) Nitric Oxide regulates Nitric Oxide Synthase-2 gene expression by inhibiting NF-KappaB binding to DNA. *Biochem J* 322:609-613.
- Pena RA, Jerdan JA, Glaser BM (1994) Effects of TGF-beta and TGF-beta neutralizing antibodies on fibroblast- induced collagen gel contraction: implications for proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:2804-2808.

- Pérez Martínez S, Franchi AM, Suburo AM, Herrero MB, Goin JB, Ohshima H, Gimeno MF (1997) Several isoforms of Nitric Oxide (NO) Synthase are present in rat oviduct. *Biocell*:215-223.
- Peters MA, Burke JM, Clowry M, Abrams GW, Williams GA (1986) Development of traction retinal detachments following intravitreal injections of retinal Müller and Pigment Epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 224:554-563.
- Pickel VM, Beck-Sickinger AG, Chan J, Weiland HA (1998) Y1 Receptors in the nucleus accumbens: ultrastructural localization and association with Neuropeptide Y. *J Neurosci Res* 52:54-68.
- Pisella PJ, Baudouin C (1996) Stages of cell proliferation in an experimental model of vitreoretinal proliferation following injection of platelet-rich plasma. *J Fr Ophtalmol* 19:576-584.
- Planck SR, Andresevic J, Chen JC, Holmes DL, Rodden W, Westra I, Wu SC, Huang XN, Kay G, Wilson DJ, et al. (1992) Expression of growth factor mRNA in rabbit PVR model systems. *Curr Eye Res* 11:1031-1039.
- Proenca R, Carvalho M, Proenca D, Verissimo J, Regadas I, Travassos A (1994) HLA antigens and lymphocytes in Proliferative Vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232:25-32.
- Quinlan TR, Li D, Laubach VE, Shesely EG, Zhou N, Johns RA (2000) eNOS-deficient mice show reduced pulmonary vascular proliferation and remodeling to chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L641-650.
- Radtke ND, Tano Y, Chandler D, Machemer R (1981) Simulation of Massive Periretinal Proliferation by autotransplantation of Retinal Pigment Epithelial cells in rabbits. *Am J Ophthalmol* 91:76-87.
- Reubi JC, Gugger M, Waser B, Schaer JC (2001) Y(1)-mediated effect of Neuropeptide Y in cancer: breast carcinomas as targets. *Cancer Res* 61:4636-4641.
- Reuter U, Champion C, Kain HL (1995) Transdifferentiation of human monocytes into fibroblast-like cells in vitro. *Ger J Ophthalmol* 4:182-187.
- Rodrigues MM, Newsome DA, Machemer R (1981) Further characterization of epiretinal membranes in human Massive Periretinal Proliferation. *Curr Eye Res* 1:311-315.

- Saleh D, Barnes PJ, Giaid A (1997) Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 155:1763-1769.
- Sarkar R, Gordon D, Stanley JC, Webb RC (1997) Cell cycle effects of Nitric Oxide on vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 272:H1810-1818.
- Schwartz D, De La Cruz ZC, Green WR, Michels RG (1988) Proliferative Vitreoretinopathy. Ultrastructural study of 20 retroretinal membranes removed by vitreous surgery. *Retina* 8:275-281.
- Seiler MJ, Aramant RB (1998) Intact sheets of fetal retina transplanted to restore damaged rat retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2121-2131.
- Sen HA, Robertson TJ, Conway BP, Campochiaro PA (1988) The role of breakdown of the blood-retinal barrier in cell-injection models of proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 106:1291-1294.
- Shyamaladevi N, Jayakumar AR, Sujatha R, Paul V, Subramanian EH (2002) Evidence that nitric oxide production increases gamma-amino butyric acid permeability of blood-brain barrier. *Brain Res Bull* 57:231-236.
- Snyder SH (1992) Nitric Oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* 257:494-496.
- Stenn KS, Link R, Moellmann G, Madri J, Kuklinska E (1989) Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol* 93:287-290.
- Stodtler M, Mietz H, Wiedemann P, Heimann K (1994) Immunohistochemistry of anterior proliferative vitreoretinopathy. Report of 11 cases. *Int Ophthalmol* 18:323-328.
- St-Pierre JA, Nouel D, Dumont Y, Beaudet A, Quirion R (2000) Association of Neuropeptide Y Y1 receptors with glutamate-positive and npy-positive neurons in rat hippocampal cultures. *Eur J Neurosci* 12:1319-1330.
- Straznicky C, Hiscock J (1989) Neuropeptide Y-like immunoreactivity in neurons of the human retina. *Vision Res* 29:1041-1048.

- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF (1991) Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7773-7777.
- Suburo AM, Chaud M, Franchi A, Polak JM, Gimeno M (1995) Distribution of neuronal and non-neuronal NADPH diaphorases and Nitric Oxide Synthases in the uterine horns of rat under different hormonal conditions. *Biol Reprod*:631-637.
- Suburo AM, Gallo JE, Cantó Soler MV, Dodds RA, Zanutigh VE, Polak JM, Villar MJ (1998) Immunoreactivity of constitutive NO Synthases in Proliferative Vitreoretinopathy (PVR) membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:S123:1998.
- Sugita G, Tano Y, Machemer R, Abrams G, Claflin A, Fiorentino G (1980) Intravitreal autotransplantation of fibroblasts. *Am J Ophthalmol* 89:121-130.
- Sun QQ, Huguenard JR, Prince DA (2001) Neuropeptide Y Receptors differentially modulate G-Protein-Activated Inwardly Rectifying K⁺ Channels and high-voltage-activated Ca²⁺ channels in rat thalamic neurons. *J Physiol* 531:67-79.
- Tabandeh H, Callejo SA, Rosa RH, Jr., Flynn HW, Jr. (2000) Subretinal "napkin-ring" membrane in proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 118:1287-1289.
- Tang S, Scheiffarth OF, Wildner G, Thureau SR, Lund OE (1992) Lymphocytes, macrophages and HLA-DR expression in vitreal and epiretinal membranes of proliferative vitreoretinopathy. An Immunohistochemical Study. *Ger J Ophthalmol* 1:176-179.
- Tanihara H, Hangai M, Sawaguchi S, Abe H, Kageyama M, Nakazawa F, Shirasawa E, Honda Y (1997) Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of primate eyes with experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 115:752-756.
- Tatoyan A, Giulivi C (1998) Purification and characterization of a Nitric-Oxide Synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 273:11044-11048.
- Taverna MJ, Sola A, Guyot-Argenton C, Pacher N, Bruzzo F, Chevalier A, Slama G, Reach G, Selam JL (2002) eNOS4 polymorphism of the Endothelial Nitric Oxide Synthase predicts risk for severe diabetic retinopathy. *Diabet Med* 19:240-245.
- Tezel TH, Del Priore LV, Kaplan HJ (1998) Posterior vitreous detachment with dispase. *Retina* 18:7-15.

- The Retina Society Terminology Committee (1983) The Classification of Retinal Detachment with Proliferative Vitreoretinopathy. *Ophthalmology* 90:121-125.
- Thiel VE, Audus KL (2001) Nitric oxide and blood-brain barrier integrity. *Antioxid Redox Signal* 3:273-278.
- Thompson JT (2001) Proliferative Vitreoretinopathy. In: *Retina* (Ryan Sj, Ed), Pp 2287-2316: Mosby.
- Thummann G, Hinton DR (2001) Cell biology of the Retinal Pigment Epithelium. In: *Retina*, 3 Edition (Ryan Sj, Ed), Pp 104-121: Mosby.
- Togashi H, Sasaki M, Frohman E, Taira E, Ratan RR, Dawson TM, Dawson VL (1997) neuronal (Type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (Type II) nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2676-2680.
- Tolentino FI, Schepens CL, Freeman HM (1967) Massive Preretinal Retraction. A biomicroscopic study. *Arch Ophthalmol* 78:16-22.
- Toti P, Greco G, Catella AM (1994) morphological and pathogenetic aspects of proliferative vitreo- retinopathy. A histological and immunohistochemical study. *Doc Ophthalmol* 88:105-112.
- Trese MT, Chandler DB, Machemer R (1985) Subretinal strands: ultrastructural features. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 23:35-40.
- Troger J, Kieselbach G, Gottinger W, Metzler R, Kahler C, Saria A (1994) Different concentrations of vasoactive intestinal polypeptide in aqueous humor of patients with proliferative vitreoretinopathy and cataract patients. *Ger J Ophthalmol* 3:245-247.
- Troger J, Kremser B, Irschick E, Gottinger W, Kieselbach G (1998) Substance P in proliferative vitreoretinopathy: the significance of aqueous humor levels for evolution of the disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236:900-903.
- Tserentsoodol N, Shin BC, Suzuki T, Takata K (1998) Colocalization of tight junction proteins, occludin and ZO-1, and glucose transporter GLUT1 in cells of the blood-ocular barrier in the mouse eye. *Histochem Cell Biol* 110:543-551.

- Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T, Igari J (1998) Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma no metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 245:190-193.
- Uehara F, Yasumura D, LaVail MM (1991) Development of light-evoked changes of the interphotoreceptor matrix in normal and rcs rats with inherited retinal dystrophy. *Exp Eye Res* 53:55-60.
- Utepergenov DI, Mertsch K, Sporbert A, Tenz K, Paul M, Haseloff RF, Blasig IE (1998) Nitric Oxide protects blood-brain barrier in vitro from hypoxia/reoxygenation-mediated injury. *Febs Lett* 424:197-201.
- Van Bockxmeer FM, Martin CE, Constable IJ (1985) Models for assessing scar tissue inhibitors. *Retina* 5:47-60.
- Van Horn DL, Aaberg TM, Machemer R, Fenzl R (1977) Glial cell proliferation in human retinal detachment with massive periretinal proliferation. *Am J Ophthalmol* 84:383-393.
- Vaughn MW, Kuo L, Liao JC (1998) effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. *Am J Physiol* 274:H1705-1714.
- Villar MJ, Suburo AM (1999) Los neuropéptidos: de la plasticidad neuronal a la enfermedad. In: *Neurogénesis* (Carri Ng, Ed), Pp 315-336. La Plata - Buenos Aires - Argentina.: Gráfica Barsa Srl.
- Vinores SA, Campochiaro PA, Conway BP (1990) Ultrastructural and electron-immunocytochemical characterization of cells in epiretinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:14-28.
- Vinores SA, Van Niel E, Kim HJ, Campochiaro PA (1992) Simultaneous expression of keratin and glial fibrillary acidic protein by the same cells in epiretinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:3361-3366.
- Walshe R, Esser P, Wiedemann P, Heimann K (1992) Proliferative Retinal Diseases: myofibroblasts cause chronic vitreoretinal traction. *Br J Ophthalmol* 76:550-552.
- Wang R, Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE (1997) Nitric Oxide Synthase expression and Nitric Oxide production are reduced in hypertrophic scar tissue and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 108:438-444.

- Weller M, Heimann K, Wiedemann P (1988a) Immunochemical studies of epiretinal membranes using apaap complexes: evidence for macrophage involvement in traumatic proliferative vitreoretinopathy. *Int Ophthalmol* 11:181-186.
- Weller M, Heimann K, Wiedemann P (1988b) Demonstration of mononuclear phagocytes in a human epiretinal membrane using a monoclonal anti-human macrophage antibody. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 226:252-254.
- Weller M, Esser P, Heimann K, Wiedemann P (1991) Retinal Microglia: a new cell in idiopathic proliferative vitreoretinopathy? *Exp Eye Res* 53:275-281.
- Wiedemann P, Weller M (1988) The pathophysiology of Proliferative Vitreoretinopathy. *Acta Ophthalmol Suppl* 189:3-15.
- Williams CD, Rizzolo LJ (1997) Remodeling of junctional complexes during the development of the outer blood-retinal barrier. *Anat Rec* 249:380-388.
- Winkler F, Koedel U, Kastenbauer S, Pfister HW (2001) Differential expression of Nitric Oxide Synthases in bacterial meningitis: role of the inducible isoform for blood-brain barrier breakdown. *J Infect Dis* 183:1749-1759.
- Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR (1999) Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and Zo-1 forms independent complexes with Zo-2 and Zo-3. *J Biol Chem* 274:35179-35185.
- Witte MB, Thornton FJ, Efron DT, Barbul A (2000) Enhancement of fibroblast collagen synthesis by nitric oxide. *Nitric Oxide* 4:572-582.
- Wood ER, Berger H, Jr., Sherman PA, Lapetina EG (1993) Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine Inducible Nitric Oxide Synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 191:767-774.
- Xu W, Liu L, Smith GC, Charles G (2000) Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-damaging anti-tumour agents. *Nat Cell Biol* 2:339-345.
- Yilmaz G, Esser P, Kociok N, Aydin P, Heimann K (2000) Elevated vitreous nitric oxide levels in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 130:87-90.

- Yoshida A, Pozdnyakov N, Dang L, Orselli SM, Reddy VN, Sitaramayya A (1995) Nitric oxide synthesis in retinal photoreceptor cells. *Vis Neurosci* 12:493-500.
- Yoshino Y, Ideta H, Nagasaki H, Uemura A (1989) Comparative study of clinical factors predisposing patients to proliferative vitreoretinopathy. *Retina* 9:97-100.
- Zech JC, Pouvreau I, Cotinet A, Goureau O, Le Varlet B, De Kozak Y (1998) Effect of cytokines and nitric oxide on tight junctions in cultured rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:1600-1608.
- Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Fisher TA, Ji H (1998) Mechanisms of vascular growth-promoting effects of Neuropeptide Y: role of its inducible receptors. *Regul Pept* 75-76:231-238.

Digitalizado, agosto 2022