

LOCALIZACION DE LA LIPOPROTEINA LIPASA EN EL CUERPO CILIAR DE OJOS HUMANOS. (Estudio inmunocitoquímico)*

RICARDO PEDRO CASAROLI MARANO^{1-2,3},
MANUEL REINA¹, SENEN VILARO¹
Barcelona (España)

INTRODUCCIÓN

La Lipoproteína lipasa (LPL, E.C. 3.1.1.34) es una glucoproteína sintetizada por diferentes tipos celulares, principalmente en adipocitos, células musculares y macrófagos.¹ Se trata de un enzima extracelular que, una vez sintetizado es transportado hasta el endotelio vascular donde, anclado a las cadenas de heparán sulfato,² realiza su acción consistente en la hidrólisis de los triglicéridos circulantes en forma de lipoproteínas de muy baja densidad y quilomicrones.² Se localiza en la mayor parte de los tejidos del organismo, mayoritariamente en tejido adiposo, muscular esquelético y cardíaco pero también en otros muchos tejidos como en el ovario, riñón, adrenales, pulmón, cerebro, etc.³ Los ácidos grasos liberados son captados por el tejido subyacente y utilizados en su metabolismo, por ejemplo para la producción de energía en el músculo, para almacenaje en forma de triglicéridos en el tejido adiposo, como base de la síntesis de surfactantes en el pulmón o de hormonas esteroideas en las glándulas adrenales y como elementos estructurales de los fosfolípidos de membrana en cerebro y retina.

Las deficiencias genéticas de lipoproteína lipasa, que se manifiestan con un cuadro clínico de Hipertrigliceridemias de tipo I, son caracterizadas por una elevada con-

* Parte de este trabajo ha sido presentado en el "96ème Congrès de la Société Française d'Ophtalmologie, Journées de la Recherche, Mai 1990".

¹ Unidad de Biología Celular (DBF). Facultad de Biología de la Universidad de Barcelona. (Prof. M. Durfort.)

² Dpto. de Biología Celular y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona. (Prof. J. Domingo.)

³ Instituto Barraquer. Barcelona.

concentración de triacilglicéridos plasmáticos en forma de quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y con importantes alteraciones tisulares, principalmente desarrollo de xantomas eruptivos, dolores abdominales, pancreatitis, pérdida de memoria, etc.⁴

Varios estudios⁵⁻⁶⁻⁷⁻⁸ han demostrado la importancia de los lípidos en los tejidos oculares, poniendo en evidencia la necesidad de los triglicéridos y ácidos grasos para su metabolismo, fisiología y estructura, pero hay pocos que se refieran al cuerpo ciliar. El cuerpo ciliar no mantiene reservas de grasa, hecho común al resto de los tejidos oculares, por lo que cualquier necesidad de éstos se suple por captación directa de la circulación.⁹

Dada la elevada actividad fisiológica y metabólica del cuerpo ciliar y el importante papel de los lípidos en otras estructuras oculares, es de esperar la existencia de un mecanismo que le permita su captación a partir de la circulación. El objetivo del presente trabajo es el estudiar la posible presencia de la lipoproteína lipasa en los endotelios de los capilares constituyentes del estroma, musculatura lisa y de los procesos ciliares del cuerpo ciliar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio hemos utilizado 6 ojos normales obtenidos del Banco de Ojos del Centro de Oftalmología Barraquer de Barcelona, que habían sido donados para queratoplastia. La edad de los donantes ha variado entre 19 y 80 años siendo procesadas las muestras entre 12 y 36 horas post-mortem. Los especímenes fueron cuidadosamente disecados y examinados macroscópicamente, siendo excluidos del estudio aquellos que presentaron algún tipo de alteración intraocular. Muestras de 10 x 5 mm del cuerpo ciliar y esclera se fijaron en una solución de paraformaldehído (paraformaldehído 4% en tampón fosfato) o en alcohol 96% durante 30 minutos, siendo lavadas en solución tampón fosfato salino (PBS) y crioprotegidas en solución de sacarosa al 30%. Los especímenes fueron incluidos en OCT (Miles Lab. Ind., II, USA) para ser congelados en nitrógeno líquido y conservados a -35 °C. Se obtuvieron secciones de 8 µm - 10 µm por microtomía de congelación (Frigocut 2800 E, Reichert-Jung, W. Germany) que se recogieron sobre portaobjetos gelatinados.

Para la inmunolocalización de este enzima se ha utilizado un suero anti-LPL, aislado en conejo (Rabbit Halvart) a partir de LPL purificada de la leche humana, obtenido en el laboratorio del Dr. T. Olivecrona (Universidad de Umea, Suecia) a una dilución de 1:50 en una solución de PBS-Glicina 0.1M.-Triton X100 0,1%-BSA 1%. Como anticuerpos secundarios se han empleado anticuerpos de cabra contra IgG de conejo conjugados a fluoresceína-isotiocianato (FITC) (Nordic, Tilburg, Netherlands) a una dilución de 1:25, IgG de cabra anti conejo (Sternberger-Meller, MD, USA) a una dilución de 1:50, y el complejo de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) en conejo (Sternberger-Meyer, MD, USA), empleado en una dilución de 1:150.

El antisuero contra LPL humana utilizado en el presente trabajo ha sido empleado con anterioridad para la localización de este enzima en biopsias de tejido adiposo humano procedente de enfermos hipertriglicéridémicos (Olivecrona T., et al., en preparación). Además fue utilizado para la inmunoprecipitación de LPL sintetizada por fragmentos de tejido adiposo humano obtenido de biopsias, e incubado con metionina S³⁵.¹⁰

Inmunofluorescencia

Tras hidratación (10 min en solución Triton X100 0.1%-Glicina 0.1M. en PBS) y permeabilización (Triton X100 0.5%-Glicina 0.1M. en PBS) se procedió al bloqueo (30 min en solución Triton X100 0.1%-Glicina 0.1M.-BSA 1% en PBS) en cámara húmeda. La incubación con el primer anticuerpo fue de 2 horas, y con el secundario (IgG de cabra anti conejo conjugado con FITC) de 1 h en oscuridad. Los lavados tanto del primer anticuerpo como del segundo se realizaron con la solución de hidratación (3 x 5 min). Las muestras fueron montadas en medio de montaje para inmunofluorescencia con N-propil galeato como agente de mantenimiento de la fluorescencia. En cortes consecutivos a los procesados con el suero anti-LPL, se utilizó suero preimmune de conejo a la misma dilución (Sera-Lab, Sussex, England) con el objetivo de estimar la autofluorescencia del tejido así como el marcaje inespecífico. La observación de los especímenes ha sido realizada con un microscopio de epifluorescencia (Polyvar, Reichert-Jung, W. Germany).

Peroxidasa anti-peroxidasa

La hidratación y permeabilización de las muestras fue tal como se ha descrito anteriormente. El primer antisue-

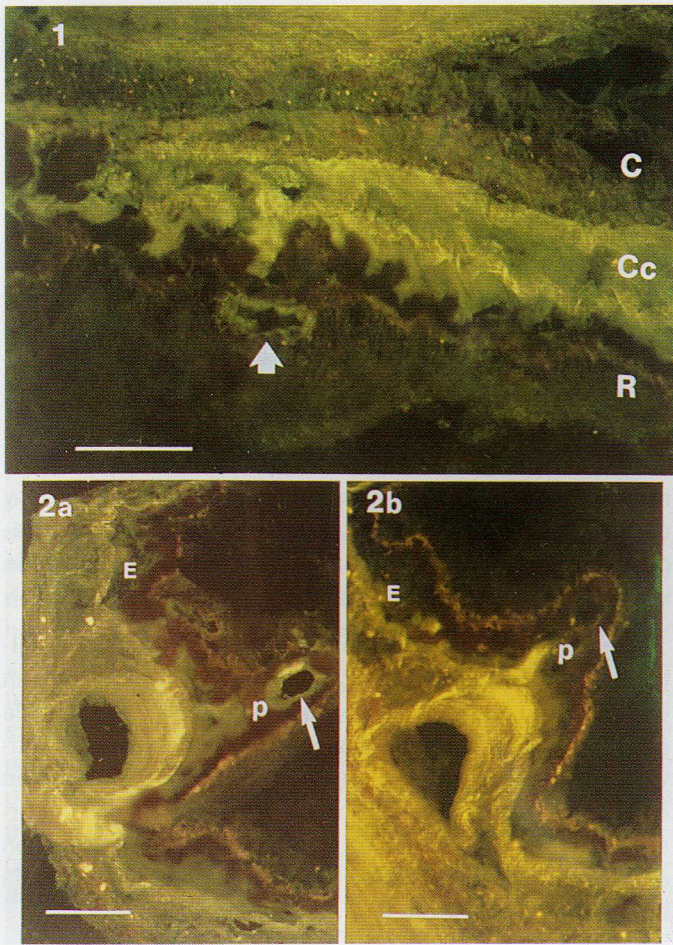


Fig. 1. Inmunofluorescencia indirecta con fluoresceína isotiocianato (FITC) en la zona de conexión entre la retina periférica y Ora Serrata en la Pars Plana. Presencia de la LPL en capilares de la Coriocapilar (Cc), vasos de la Coroides (C), y capilar (flecha) de la Retina (R). (X310). (Bar. =100 μm.)

Fig. 2. Inmunofluorescencia indirecta con fluoresceína isotiocianato (FITC) en el Cuerpo Ciliar. **2a:** Localización de la LPL en los capilares (flecha) de un Proceso Ciliar (p) y en el estroma (E) que se presenta difusamente marcado. **2b:** Control. (X225). (Bar. =100μm.)

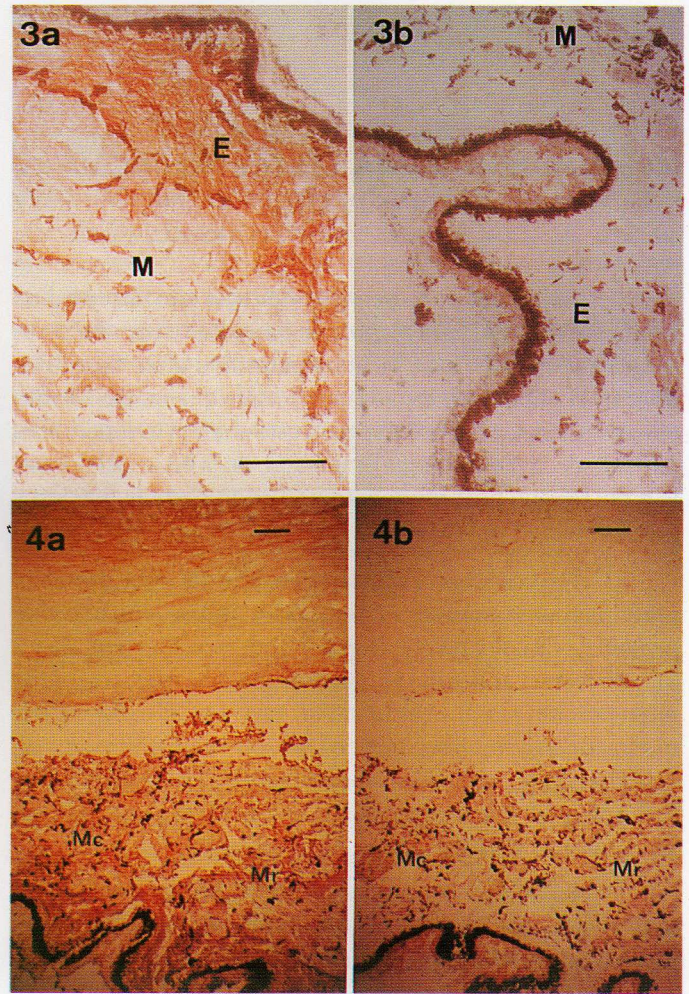


Fig. 3. Inmunolocalización mediante el sistema peroxidasa anti peroxidasa (PAP) en el Cuerpo Ciliar. **3a:** Inmunotinción para LPL en capilares y en el estroma (E), y en el tejido muscular liso (M). **3b:** Control. (X225). (Bar. =100μm.)

Fig. 4. Inmunolocalización mediante la técnica peroxidasa anti peroxidasa (PAP) en el Cuerpo Ciliar y Esclera. **4a:** Inmunotinción para LPL en el tejido muscular liso, principalmente en su porción radial (Mr) y circular (Mc). **4b:** Control. (X90). (Bar. =100μm.)

diaminobenzidina (DAB) (Dab 0.03%-H₂O₂ 0.01% en una solución Tris-HCl 0.01M. pH 7,6) controlando el desarrollo de la reacción al microscopio. Tras deshidratar las muestras se montaron en medio DPX. Los especímenes control se trataron con suero preinmune de conejo (Sera-Lab, Sussex, England). Se han obtenido imágenes por microscopía óptica de campo claro.

ro se incubó en solución de bloqueo toda la noche en cámara húmeda a 4 °C, a una dilución 1:50. El segundo anticuerpo (IgG de cabra anti conejo) se incubó durante 3 h en cámara húmeda y temperatura ambiente, a una dilución 1:50. El complejo PAP (peroxidasa anti peroxidasa en conejo) a una dilución 1:150 se incubó durante 2 h. Los lavados se realizaron con la solución de hidratación (3 x 5 min). La detección del marcado se ha realizado por medio de una solución de

RESULTADOS

La inmunofluorescencia indirecta con fluoresceína isotiocianato (FITC) y la técnica de inmunotinción con peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) han permitido identificar la Lipoproteína lipasa en todas las muestras analizadas. Todas ellas presentan señal positiva para este enzima independientemente de la metodología empleada, de la edad del donante o del tiempo post-mortem transcurrido hasta la fijación y procesamiento del material.

Hemos observado la presencia de esta proteína, principalmente en los capilares y vasos de pequeño y medio calibre situados en el estroma del cuerpo ciliar (Fig. 2 a y 3 a), y en la red capilar del tejido muscular liso marcadamente en su porción radial y circular (Fig. 4 a y 4 b). El estroma, formado por un conjuntivo de tipo laxo, presentó una marca difusa cuando se empleó la inmunolocalización con FITC (Fig. 2 a), mientras que la técnica del PAP evidenció un marcaje vascular más diferenciado.

La inmunofluorescencia (FITC) puso de manifiesto la presencia del enzima en los capilares de los procesos ciliares (Fig. 2 a). Estas estructuras poseen escaso tejido estromal que envuelve los capilares situados en posición proximal con relación al epitelio ciliar (Fig. 2 a). En este último y en comparación con las secciones procesadas con suero control (Fig. 3 a y 3 b) no se han encontrado evidencias de la presencia de la LPL.

La membrana de Bruch, que separa el estroma ciliar de su epitelio, presenta una autofluorescencia característica al ser excitada por luz ultravioleta que dificulta la interpretación de los resultados de la inmunofluorescencia. A pesar de ello las muestras incubadas con anti-LPL presentaron mayor intensidad de fluorescencia que las muestras incubadas con el anticuerpo control (Fig. 2 a comparada con 2 b), por lo que parece que la LPL podría estar localizada también en esta estructura. Con la técnica del PAP, la identificación ha sido menos evidente dado que la tinción normalmente observada se confunde con acúmulos de gránulos de melanina del epitelio ciliar externo pigmentario (Fig. 3 a comparada con 3 b). Además, este último no se mantuvo adecuadamente preservado en los cortes por congelación, dificultando por lo tanto la interpretación de los resultados.

En la región de la Pars plana, situada en la porción posterior del cuerpo ciliar, hemos observado la presencia de

la LPL en los capilares retinianos de la zona de conexión entre la retina periférica y la ora serrata (Fig. 1). En esta misma región la coriocapilar y los vasos coroideos de mayor calibre también presentaban una clara señal positiva (Fig. 1).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demuestra la presencia de la lipoproteína lipasa en diversas zonas de los tejidos oculares. Su localización mayoritaria en asociación a los vasos y capilares sanguíneos del cuerpo ciliar sugiere un posible papel en la captación de lípidos circulantes para su utilización estructural y/o metabólica por este tejido.

El cuerpo ciliar es una estructura del tracto uveal altamente especializada. Su actuación en la producción y en el drenaje del humor acuoso es bien conocida. Una serie de estudios evidenciaron su importancia en el transporte activo¹¹ y su papel mayor en lo que se refiere a la ultrafiltración en la formación del humor acuoso.¹² No son menos importantes su función en la acomodación visual, en la secreción del ácido hialurónico hacia el vítreo o su participación en la barrera hemato-acuosa.¹³

Las vías metabólicas relacionadas al metabolismo de los ácidos grasos y fosfolípidos del cuerpo ciliar son similares a las de los otros tejidos. Así un cierto número de precursores lipídicos radioactivos, son rápidamente incorporados por fosfolípidos en el tejido.⁸ Este alto "turnover" se puede explicar por el hecho de que el tejido ocular no posee reservas de lípidos, efectuando su inmediata captación a partir de la circulación cuando sea necesario.⁹ Existen ciertos lípidos auto-ácidos que constituyen un grupo especial con relación a sus actividades biológicas específicas: las prostaglandinas. Debido a su probable papel en la patofisiología del tejido ocular han recibido importante consideración por parte de la investigación en oftalmología.

La lipoproteína lipasa es el enzima necesario para la captación de los ácidos grasos presentes en las lipoproteínas circulantes.² Su detección en la microvasculatura ocular mediante técnicas de inmunocitoquímica en el presente trabajo indican que la lipoproteína lipasa podría aportar a los tejidos oculares un mecanismo de captación de los lípidos circulantes. Su presencia en el conjunto de vasos sanguíneos que irrigan el cuerpo ciliar indica que los ácidos grasos presentes en las lipoproteínas circulantes podrían constituir

el principal sustrato para las reacciones de metabolización lipídica del cuerpo ciliar.

Los ácidos grasos poliinsaturados son uno de los constituyentes mayoritarios de las membranas celulares de la retina. Se postulan dos posibles mecanismos para el suministro de ácidos grasos poliinsaturados a los tejidos oculares:¹⁴ 1. síntesis directa de ácidos grasos poliinsaturados en las células oculares, a partir de precursores de ácidos grasos esenciales captados directamente por las células; 2. captación de ácidos grasos poliinsaturados sintetizados en otros tejidos. Recientemente se ha demostrado que el desarrollo ocular es altamente dependiente de ácidos grasos poliinsaturados sintetizados a partir de ácidos grasos esenciales en el hígado,¹⁴ lo cual implica la existencia de un mecanismo de captación ocular de los ácidos grasos sintetizados a nivel hepático. Como es conocido, los ácidos grasos liberados por el hígado, circulan en la sangre bajo la forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las cuales son un sustrato excelente para la lipoproteína lipasa.² En consecuencia, los resultados obtenidos en el presente trabajo, en relación a la presencia de la lipoproteína lipasa en la microvasculatura ocular, sugieren que este enzima podría permitir la captación de estos ácidos grasos para su incorporación en los lípidos celulares.

Palabras clave: Lipoproteína lipasa, ácidos grasos, metabolismo lipídico, cuerpo ciliar, inmunocitoquímica.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a la ayuda del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (F.I.S. 90/0391).

RESUMEN

Localización de la lipoproteína lipasa en el cuerpo ciliar de ojos humanos: Un estudio inmunocitoquímico

La Lipoproteína lipasa (LPL, E.C. 3.1.1.34) es un enzima clave del metabolismo lipoproteico. En su forma funcional se localiza en el endotelio vascular donde ejerce su acción hidrolizando los ácidos triglicéridos de las lipoproteínas circulantes y liberando ácidos grasos para su utilización en procesos metabólicos. En el presente trabajo se estudia su localización en los tejidos que forman el cuerpo ciliar del ojo humano mediante técnicas inmunocitoquímicas. Los resultados obtenidos indican que la lipoproteína

lipasa se halla principalmente asociada a la red de capilares y vasos sanguíneos del estroma del cuerpo ciliar, en los capilares de los procesos ciliares y en los capilares retinianos de la zona de conexión entre la retina periférica y la Ora Serrata. Esta marcada asociación de la lipoproteína lipasa con la microvascularización ocular sugiere que la captación de los ácidos grasos circulantes unidos a lipoproteínas podría ser uno de los mecanismos mayoritarios para el suministro de ácidos grasos esenciales o de sus derivados a los tejidos oculares.

RÉSUMÉ

Localisation de la lipoprotéine lipase dans le corps ciliaire humain: Etude immunocytochimique

La Lipoprotéine-lipase (LPL, E.C. 3.1.1.34), est une enzyme clé dans le métabolisme lipoprotéique. Sous la forme fonctionnelle on trouve cette enzyme sur l'endothélium vasculaire où elle exerce une action hydrolysante sur les triglycérides des lipoprotéines circulantes, en libérant des acides gras pour leur utilisation dans les processus métaboliques. La localisation de la LPL dans les tissus du corps ciliaire a été étudiée dans les yeux humains grâce à des techniques immunohistochimiques. Les résultats obtenus confirment que la LPL est principalement associée avec le réseau capillaire et les vaisseaux sanguins du stroma du corps ciliaire, sur les capillaires des procès ciliaires et sur les capillaires rétinien de la zone de connexion entre la rétine périphérique et l'ora serrata. Cette association de la LPL avec le système oculo-vasculaire nous mène à considérer, que la captation des acides gras unis aux lipoprotéines pourrait être un mécanisme très important pour faire arriver des acides gras essentiels ou ses dérivés aux tissus oculaires.

SUMMARY

Localization of lipoprotein lipase in the human ciliary body: An immunocytochemical study

Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme in lipoprotein metabolism. In its functional form, it is located at the luminal surface of capillary endothelium, where it acts on tria-

cylglycerols from serum lipoproteins, releasing fatty acids which can be taken up by adjacent tissues for metabolic utilization. Using immunocytochemistry we have studied LPL localization on ciliary body tissue. The results obtained showed that LPL is mainly associated with capillary network and stromal vessels of the ciliary body, capillaries of ciliary processes, and retinal capillaries in the area of connection between the peripheral retina and the ora serrata. This close association of LPL with the vascular network of the eye tissues suggests that the uptake of fatty acids from lipoproteins could be an important mechanism for supply of essential fatty acids or its compounds to the ocular tissues.

BIBLIOGRAFÍA

1. CRYER A.: Comparative biochemistry and physiology of lipoprotein lipase. In: Borensztajn J. (ed.) Lipoprotein Lipase, Evener Publ., Chicago, USA, 1987; 277-327.
2. OLIVECRONA T., BENGTTSSON-OLIVECRONA G.: Lipoprotein lipase from milk the model enzyme in lipoprotein lipase research. In: Borensztajn J. (ed.) Lipoprotein Lipase, Evener Publ., Chicago, USA, 1987; 15-58.
3. CAMPS L., REINA M., LLOBERA M., OLIVECRONA T., VILARO S.: "Lipoprotein lipase. Cellular origin and functional deposition". Am. J. Physiol., 1990. In press.
4. BRUNZELL J.D., IVERIUS P.H., SCHEIBEL M.S., FUJIMOTO W.Y., HAYDEN M.R., McLEOD R., FROLICH J.: Primary Lipoprotein Lipase Deficiency. In: Angel A., Frolich J. (ed.) Advances In Experimental Biology and Medicine, Lipoprotein Deficiency Syndromes, Plenum Press, New York, 1986; 227-239.
5. FELDMAN A.L.: Human ocular lipids: Their analysis and distribution. Surv. Ophthalmol., 1967; 12: 207-243.
6. BROEKHUYSE R.M., DAEMEN F.J.M.: The Eye. In: Snyder F. (ed.) Lipid Metabolism in Mammals, Plenum Press, New York, 1977; 145-188.
7. ANDERSON R.E., MAUBE M.B., FELDMAN G.L.: Lipids in ocular tissues. III. The phospholipids of mature bovine iris. Exp. Eye Res., 1970; 9: 281-284.
8. ABDEL-LATIF A.A., SMITH J.P.: Distribution of arachidonic acid and other fatty acids in glycerolipids of the rabbit iris. Exp. Eye Res., 1979; 29: 131-140.
9. ABDEL-LATIF A.A.: The Iris-Ciliary Body. In: Anderson R.E. (ed.) Biochemistry of the eye, A.A.O. Manuals Program, San Francisco, 1983; chap. 3, 48-78.
10. BENGTTSSON-OLIVECRONA G., HERNELL O., OLIVECRONA T., REINA M., SEMB H., VILARO S.: Defective release of lipoprotein lipase by heparin in three siblings with relatively normal lipoprotein lipase in adipose tissue. En preparation.
11. BILL A.: Blood circulation and fluid dynamics in the eye. Physiol. Rev., 1975; 55: 383-417.
12. GREEN K., PEDERSON J.E.: Aqueous humor formation. Exp. Eye Res., 1973; 16: 273-286.
13. SEARS M.L.: The aqueous. In: Moses R.A. (ed.) Adler's Physiology of the Eye, 7th. Edition, C.V. Mosby Co., St. Louis, 1981; chap. 7, 204-226.
14. BAZAN N.G.: The supply of omega 3-polyunsaturated fatty acids to photoreceptors and synapses. In: Biological Effects and Nutritional Essentiality. In press.