

# Estudio inmunocitoquímico del complejo-receptor de superficie celular del subgrupo de las integrinas $\beta_1$ en la proliferación intraocular<sup>+</sup>

*Estudo imunocitoquímico do complexo-receptor de superfície celular do subgrupo das integrinas  $\beta_1$  na proliferação intra-ocular*

Ricardo Pedro Casaroli Marano <sup>(1)</sup>  
Senén Vilaro <sup>(2)</sup>

## RESUMO

La interacción entre la matriz extracelular y los componentes celulares es la principal responsable de la diferenciación celular y del desarrollo tisular. Mediante técnicas inmunocitoquímicas para microscopía óptica y electrónica, hemos estudiado el receptor de membrana celular del subgrupo  $\beta_1$  de la familia de las integrinas, la laminina (LN) y la fibronectina (FN) en membranas epirretinianas (MER) de pacientes sometidos a vitrectomía portadores de una vitreorretinopatía proliferativa (VRP) como complicación de un desprendimiento de retina, y en membranas vítreorretinianas fibrovasculares de la retinopatía diabética proliferativa (RDP). Los resultados obtenidos indican que las MER presentan el complejo  $\beta_1$  en disposición pericelular, unido a la membrana plasmática. La LN y la FN se hallan en la matriz extracelular en estrecha relación con la integrina. El receptor parece ser observado más frecuentemente en las MER de hasta 2 meses de evolución cuando comparadas a las de mayor tiempo de evolución. Por otro lado, dicha integrina se encuentra localizada en los capilares de neoformación de las membranas fibrovasculares obtenidas de pacientes diabéticos. Estos hallazgos aportan nuevos datos para una mejor comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de la interacción célula-sustrato en el proceso proliferativo intraocular.

**Palavras-chave:** Vitreorretinopatía proliferativa, retinopatía diabética proliferativa, integrinas, matriz extracelular, inmunocitoquímica, desprendimiento de retina, enfermedad proliferativa intraocular.

## INTRODUCCION

La vitreorretinopatía proliferativa (VRP) se caracteriza por una proliferación celular intraocular con la formación de membranas epirretinianas (MER) e intravítreas que predisponen a los desprendimientos de retina (DR) traccionales <sup>1</sup>. Esta alteración puede ser observada en patologías tales como la retinopatía diabética proliferativa (RDP), los DR regmatógenos, los

traumatismos oculares con o sin perforación y las inflamaciones intraoculares; pero sin duda, constituye la complicación más frecuentemente observada tras las cirugías reparadoras del DR, y en gran medida es la causa más común de los fracasos post-operatorios <sup>1, 2</sup>.

Aunque su presentación histológica y ultraestructural es bien conocida, su fisiopatología es apenas comprendida y los medios terapéuticos para combatirla, limitados. Las "membranas"

<sup>(1)</sup> Master y Doctor, Profesor Ayd. de Biología Celular, Universidad de Barcelona.

<sup>(2)</sup> Doctor, Catedrático de Biología Celular, Universidad de Barcelona.

\* Unidad de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Universidad de Barcelona.  
Correspondencia para: R. P. CasaroliMarano-Unidad de Biología Celular (DBF) - Universidad de Barcelona - Avda. Diagonal 645, - Barcelona (08028) - ESPAÑA

constituyen la traducción anatomopatológica del proceso proliferativo intraocular y se presentan como uno de los escasos recursos de estudio para la comprensión de su patogénesis. Mediante técnicas convencionales de microscopía óptica y electrónica <sup>3-5</sup>, así como a través de técnicas inmunocitoquímicas <sup>6</sup>, los tipos celulares identificados fueron las células del epitelio pigmentario de la retina, las células de la glia retiniana, los fibroblastos y, en menor porcentaje, los macrófagos. Además, existe un grupo de células con morfología semejante a fibroblastos (*fibroblast-like cells*) cuyo origen es desconocido <sup>7</sup>.

Algunos autores <sup>8</sup> llamaron la atención sobre el posible papel de la matriz extracelular en el proceso proliferativo, habiendo determinado la presencia de diferentes tipos de colágeno y otras proteínas en el tejido proliferativo intraocular.

Actualmente, las investigaciones se centran en la búsqueda e identificación de los factores humorales que desencadenarían la migración, adhesión, proliferación y consecuente contracción de la masa celular involucrada en el proceso de proliferación intraocular <sup>9</sup>. De entre aquéllos destacan las glucoproteínas multifuncionales no colagénicas de la matriz extracelular, como la fibronectina (FN) <sup>10-12</sup>, la laminina (LN) <sup>10, 13</sup> y los factores de crecimiento. Hipótesis actuales, algunas demostradas en ensayos *in vitro* <sup>9</sup>, sugieren que los factores humorales podrían constituir la pieza clave del proceso proliferativo, ya que estas glucoproteínas tienen la capacidad de estimular la migración de ciertos tipos celulares, de promover la adhesión de las células entre sí y, a su vez, éstas con el sustrato. También pueden determinar señales para la proliferación celular, así como ser producidas por distintos tipos celulares, confirmando al proceso proliferativo un carácter cíclico <sup>11-13</sup>. Para que estos fenómenos sucedan, la célula

debería tener la facultad de reconocer e interactuar funcionalmente con el medio extracelular.

Recientemente, se han identificado con precisión los receptores celulares que mediatizan la interacción célula-célula y célula-sustrato. Estos receptores se clasifican en tres subgrupos principales de integrinas, las  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , que se combinan con ocho o más tipos diferentes de subunidades  $\alpha$ , resultando distintas moléculas heterodímeras con diferentes especificidades adhesivas. Las clases  $\beta_1$  y  $\beta_3$  regulan predominantemente la adhesión célula-sustrato, mientras que la clase  $\beta_2$  es receptor para la adhesión entre células <sup>14</sup>. Muchas de estas combinaciones tienen la habilidad de interactuar con glucoproteínas de la matriz extracelular, siendo capaces de reconocer una secuencia aminoacídica constituida por el tripéptido arginina-glicina-aspartato (RGD), que ya ha sido caracterizado en la molécula de la FN <sup>14-16</sup>. Otras integrinas adhieren componentes de la matriz, como la LN, utilizando o no la secuencia RGD <sup>14-16</sup>.

En el presente trabajo, hemos identificado y caracterizado el receptor de superficie celular del subgrupo de las integrinas  $\beta_1$  en el tejido intraocular neoformado, haciendo énfasis en su posible papel en los mecanismos de interacción célula-sustrato en las enfermedades proliferativas vitreoretinianas.

---

## MATERIALES Y METODOS

---

### *Clasificación de las membranas*

Las MER fueron clasificadas entre C1 - D3, según el estadio clínico oftalmoscópico de la VRP <sup>2</sup>. También se consideró la duración de la enfermedad proliferativa, clasificándolas de forma aleatoria en 2 grupos:

- 1- MER de hasta dos meses de evolución clínica oftalmoscópica;
- 2- MER de más de dos meses de evolución.

### *Obtención y preparación de las muestras*

Hemos estudiado 12 MER de VRP como complicación de un DR y 6 membranas fibrovasculares de RDP, obtenidas de pacientes sometidos a cirugía intraocular. Las muestras fueron fijadas en una solución de paraformaldehído al 3% y glutaraldehído al 0,1% en tampón fosfato salino 0,1 M pH 7,4 (PBS 0,1 M), lavados sucesivamente con PBS 0,1 M a 4°C y crioprottegidos en una solución de sacarosa 2,1 M. Los especímenes, montados sobre portamuestras metálicos para crioultramicrotomía, fueron rápidamente congelados en nitrógeno líquido y conservados a -196°C. Se obtuvieron secciones semifinas de 0,3  $\mu\text{m}$  a 0,4  $\mu\text{m}$  a -70°C y secciones ultrafinas de 90 nm a 100 nm a -105°C con un crioultramicrotomo (Ultracut FC4D, Reichert-Jung, Germany). Las secciones semifinas se recogieron en portaobjetos gelatinados, los cuales fueron mantenidos a 4°C en cámara húmeda. Las secciones ultrafinas se recogieron en rejillas de oro (200 mesh) para microscopía electrónica de transmisión (MET), mantenidas a 4°C en PBS 0,1 M pH 7,4 hasta el inicio del proceso inmunocitoquímico.

### *Anticuerpos*

Para este estudio se utilizaron anticuerpos, obtenidos en conejo, contra el receptor del subgrupo  $\beta_1$  de las integrinas (Dr. C. Enrich y cols., Universidad de Barcelona, España y Dr. S. Johansson y cols., Universidad de Uppsala, Suecia) a una dilución de 1:50. El aislamiento de la proteína antigénica, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, y su purificación, en columna de afinidad de WGA-Sefarosa, fueron descritos anteriormente <sup>17</sup>. Los anticuerpos contra la FN (Dakopatts, Denmark) y contra LN (Sigma, USA) fueron obtenidos en conejo. Como anticuerpo secundario, para la técnica de inmunofluorescencia, se empleó IgG de cabra contra

conejo conjugada a rodamina (RITC) o a fluoresceína isotiocianato (FITC) (Boheringuer, Germany), ambos a una dilución de 1:25. Para la inmunodetección al microscopio electrónico, hemos utilizado proteína A - oro coloidal (PtA-Au) de 16 nm, preparada en nuestro laboratorio, a una dilución de 1:50. Las diluciones fueron realizadas en una solución de PBS 0,1 M - glicina 0,1 M - ovoalbúmina 1%. Para los controles, los anticuerpos específicos fueron reemplazados por suero preinmune de conejo (Sera-Lab, England) a la misma dilución del anticuerpo primario.

#### Inmunofluorescencia indirecta, inmuno-electrocitoquímica y MET convencional

Las técnicas inmunocitoquímicas para microscopía óptica y electrónica, así como las de microscopía electrónica convencional, fueron realizadas según protocolos descritos<sup>10, 18</sup>.

Mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta, según el marcado fluorescente observado al microscopio óptico, los patrones de expresión de la FN, LN, e integrinas en el tejido proliferativo intraocular pudieron ser clasificados bajo 2 criterios<sup>10</sup>:

- 1- patrón de distribución netamente pericelular;
- 2- patrón de distribución fibrilar, difuso o localizado.

#### Análisis estadístico

Para la comparación de las proporciones observadas en los distintos grupos hemos utilizado tablas de contingencia basadas en la prueba de la chi cuadrado ( $\chi^2$ ).

### RESULTADOS

En la primera fase de este estudio y con el objeto de caracterizar el tejido proliferativo intraocular, se realizó un examen histopatológico con tinciones convencionales (hematoxilina-eosina y azul de metileno). Los resultados

revelaron la presencia de una cantidad variable de tejido fibroso, conteniendo numerosas células aisladas o agrupadas en nidos. Las 6 membranas fibrovasculares, obtenidas de pacientes afectados de RDP, estaban rícamente vascularizadas, exhibiendo una matriz extracelular moderada o abundante con determinados tipos celulares fusiformes, algunas células plasmáticas y otras células pigmentadas. Las 12 MER de pacientes portadores de DR complicado con VRP presentaron una matriz extracelular que variaba de escasa a moderada, con una abundante población celular de marcado pleo-

morfismo (resultados no presentados).

Con las técnicas de inmunofluorescencia indirecta, se ha detectado la presencia del receptor  $\beta_1$  en la mayoría de los capilares constituyentes de las membranas fibrovasculares de la RDP (Fig. 1a). Esta identificación ha resultado marcadamente evidente en las paredes vasculares, sobretodo en su cara luminal, coincidiendo con la identificación de la FN (Fig. 1c y d). La LN se detectó mayoritariamente en las paredes vasculares externas, correspondientes a la cara basal de las células endoteliales (Fig. 1b). El estudio ultraestructural de las membranas

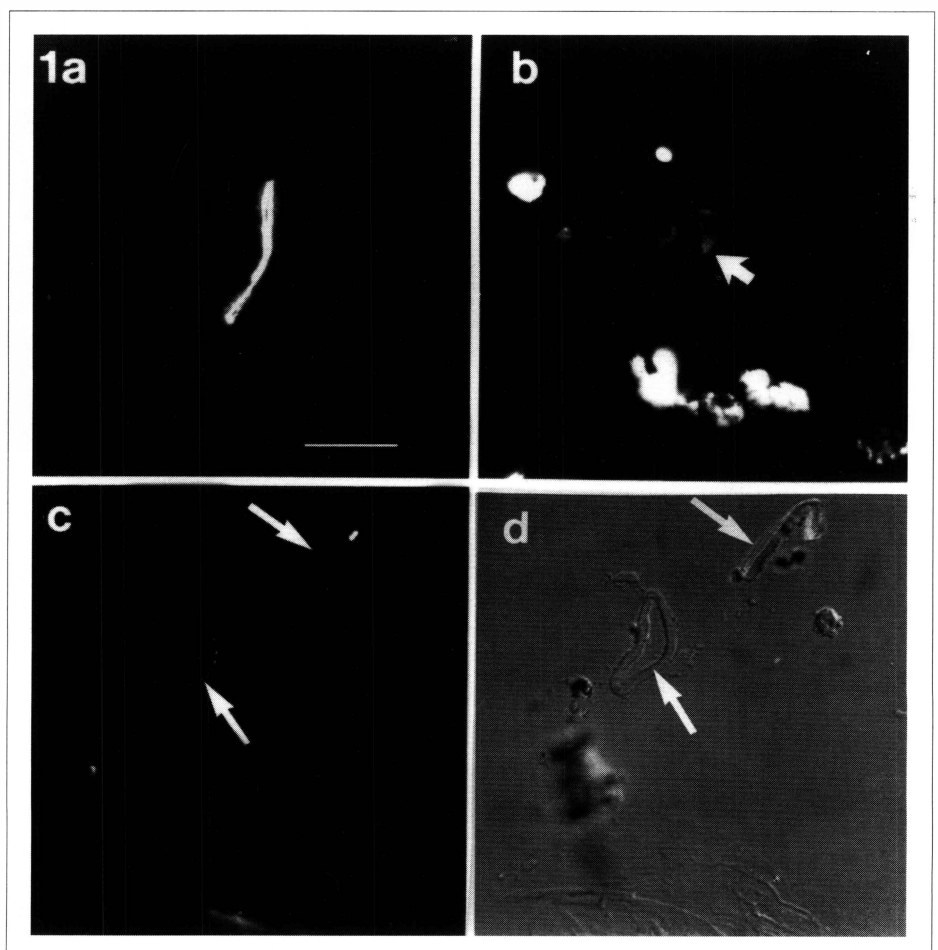


Figura 1 - Inmunofluorescencia indirecta con RITC (Fig. 1a) y FITC (Fig. 1b, 1c), en secciones semifinas por crioultramicrotomía, para el complejo  $\beta_1$  (Fig. 1a), la LN (Fig. 1b) y la FN (Fig. 1c) en capilares neoformados de membranas fibrovasculares en la RDP. Los receptores  $\beta_1$  (Fig. 1a) y la FN (Fig. 1c, flechas) tienen localización luminal en el endotelio, como se puede observar al compararse con la microfotografía de los capilares con contraste interferencial (Fig. 1d, flechas). La LN se encuentra en disposición basal (Fig. 1b, flecha). (Fig. 1a, 1b, 1c, 1d: X840), (bar= 20  $\mu$ m.).

fibrovasculares evidenció que las células endoteliales se hallan asociadas por su cara basal a la lámina basal y matriz extracelular que las adhiere al tejido (Fig. 2a), y las separa de los pericitos y células adyacentes (Fig. 2b). Mediante el inmunomarcado para microscopía electrónica, se detectó la presencia del receptor  $\beta_1$  asociado a la cara luminal del endotelio vascular de los capilares de neoformación (Fig. 2c).

En las MER, el receptor  $\beta_1$  se detectó de forma netamente pericelular (Fig. 3a). Frecuentemente, las células positivas para el marcado presentaron

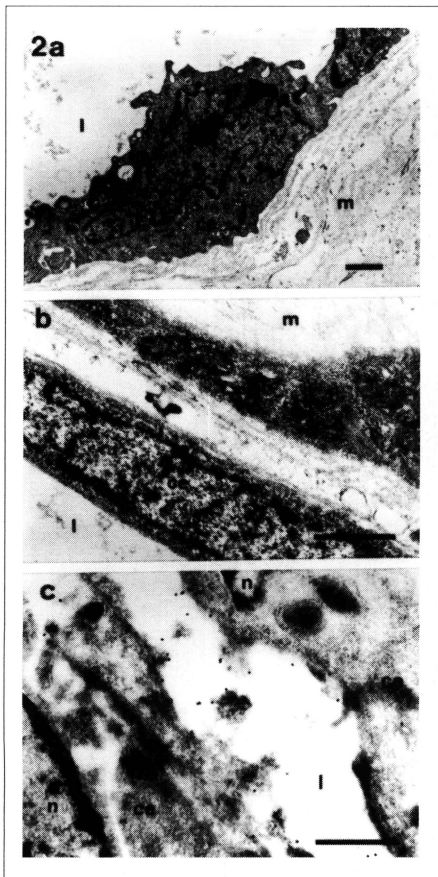


Figura 2 - Membrana fibrovascular de la RDP (MET). La ultraestructura de la pared capilar exhibe las células endoteliales (ce) en estrecho contacto con la matriz extracelular (m)(Fig. 2a) y con el sistema pericitico (p)(Fig. 2b; l, luz vascular). La inmunoelectrodetección, mediante técnica de la Pt-Au en secciones ultrafinas obtenidas por crioultramicrotomía (Fig. 2c), ha puesto en evidencia el complejo  $\beta_1$ , en la cara luminal de las células endoteliales (n, núcleo). (Fig. 2a: X11.400), (Fig. 2b: X24.700), (Fig. 2c: X44.800), (bar= 1  $\mu$ m.).

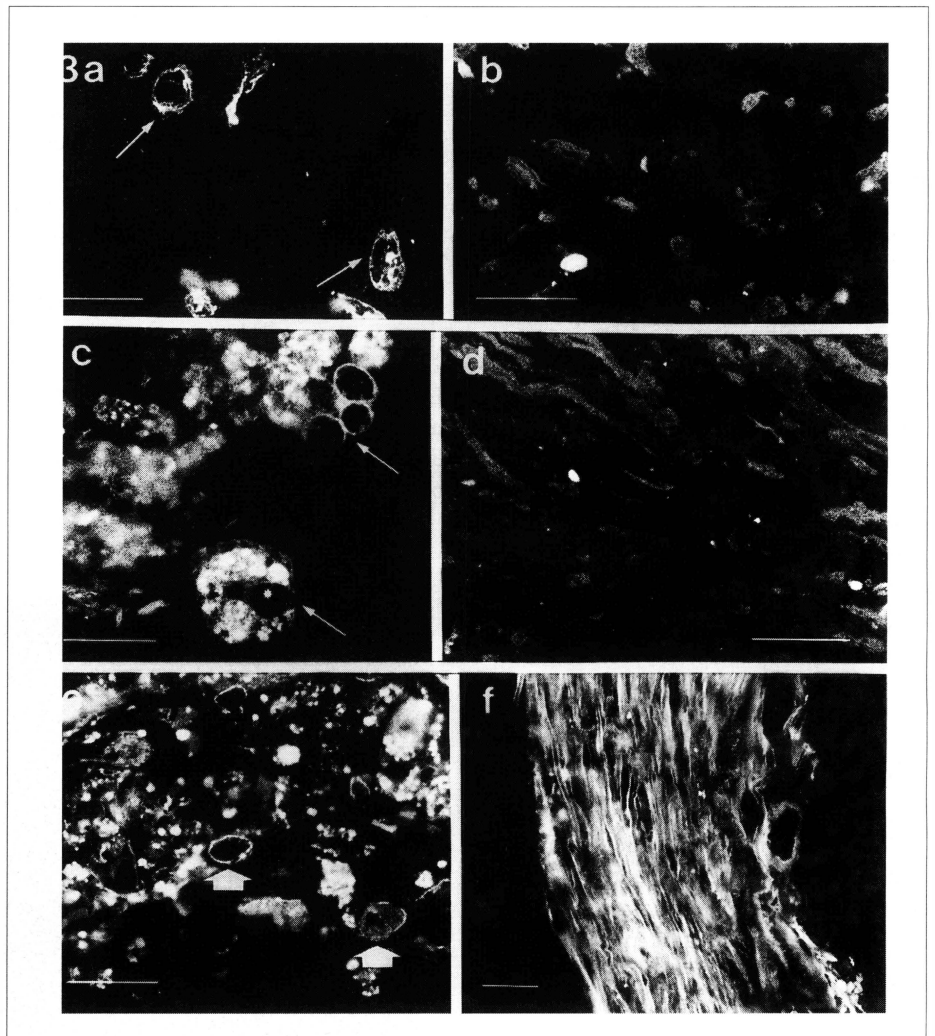


Figura 3 - Inmunofluorescencia indirecta con FITC, en secciones semifinas por crioultramicrotomía, para los receptores  $\beta_1$  (Fig 3a, 3b), LN (Fig. 3c, 3d) y FN (Fig. 3e, 3f) en MER de VRP. Las MER de hasta 2 meses de evolución (Fig. 3a, 3c, 3e) presentan un patrón de distribución netamente pericelular (flechas) para el complejo  $\beta_1$  (Fig. 3a), para la LN (Fig. 3c; asterisco, núcleo), y para la FN (Fig. 3c). En MER con más de 2 meses de evolución (Fig. 3b, 3d, 3f) se observó la disposición pericelular para el complejo  $\beta_1$  (Fig. 3b) y para la LN (Fig. 3d), además del pleomorfismo celular marcado (Fig. 3b, 3d). En esta fase la FN (Fig. 3f) se deposita difusamente bajo forma fibrilar. (Fig. 3a: X840), (Fig. 3b y 3d: X730), (Fig. 3c, 3e: X980), (Fig. 3f: X400). (Fig. 3a, 3c y 3e, bar= 20  $\mu$ m.), (Fig. 3b, 3d y 3f, bar= 30  $\mu$ m.).

una morfología variada y se hallaron en MER de todos los estadios oftalmoscópicos de evolución clínica de la VRP. Aunque no hubo diferencias estadísticas significativas ( $p= 0,1$ ) en la proporción de células que expresaron la subunidad  $\beta_1$  en los diferentes grupos de "edad" de MER, hemos encontrado una tendencia de expresión positiva en el grupo de MER de hasta 2 meses de evolución clínica ( $n= 8$ ),

donde un 75% de los especímenes presentó el receptor. En las MER con más de 2 meses de evolución ( $n= 4$ )(Fig. 3b), el receptor  $\beta_1$  es también pericelular, pero el pleomorfismo celular presente dificultó la interpretación de los resultados. El patrón detectado para la LN también fue pericelular, tanto en el grupo de membranas "jóvenes" (Fig. 3c) como en el de mayor tiempo de evolución, donde se

evidenció el marcado pleomorfismo celular (Fig. 3d). La FN presentó un cambio significativo ( $p < 0,01$ ) en su patrón de expresión con relación al tiempo de evolución de la enfermedad proliferativa. En las membranas más "jóvenes" su presencia es netamente pericelular (Fig. 3e), mientras que en las de más tiempo de evolución su patrón de distribución es mayoritariamente fibrilar (Fig. 3f).

El estudio ultraestructural de las MER evidenció la presencia de distintos tipos celulares en asociación con la matriz extracelular (Fig. 4a). Se detectó la estrecha unión de ciertas regiones engrosadas de la membrana plasmática con elementos de la matriz (Fig. 4b). La inmunolocalización del receptor  $\beta_1$  al microscopio electrónico, evidenció su presencia en asociación con la membrana plasmática de distintos tipos celulares (Fig. 4c).

#### DISCUSION

Actualmente se conocen bastante bien las presentaciones clínicas y las graves consecuencias de la enfermedad proliferativa intraocular para la integridad estructural retiniana y su funcionalidad. Aunque la identificación de los componentes celulares de las MER se ha realizado en diversos trabajos<sup>3-7</sup>, los fenómenos que desencadenan el proceso proliferativo son esencialmente hipotéticos y la contribución del medio extracelular en estos fenómenos es apenas conocida<sup>6-8</sup>. Atendiendo a estos antecedentes, es importante estudiar cuáles son los posibles mecanismos celulares que podrían desencadenar la formación del tejido proliferativo intraocular, ya que una vez conocidos se podrán estudiar estrategias terapéuticas para evitar su aparición.

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

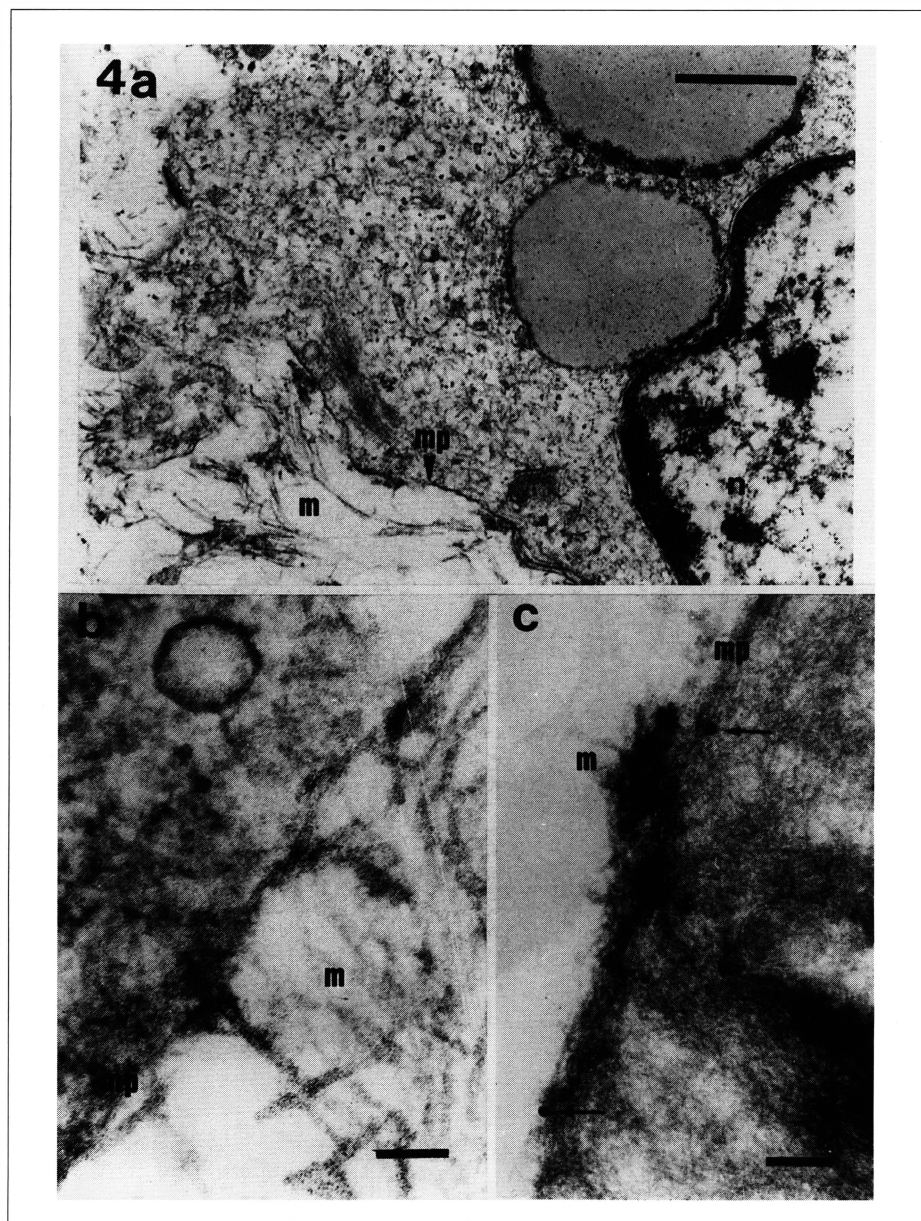


Figura 4 - MER obtenida de un DR complicado de VRP (MET). Se observa el estrecho contacto de la membrana plasmática (mp) con las fibras de colágeno de la matriz extracelular (m) (Fig. 4a, 4b; n, núcleo). Engrosamientos del plasmalema (mp) son evidentes en las regiones de contacto con el colágeno (m) (Fig. 4b). La inmunoelectrodetección, mediante la técnica de la PtA-Au en secciones ultrafinas obtenidas por crioultramicrotomía, confirma la presencia del receptor  $\beta_1$  (Fig. 4c) en la membrana plasmática (mp) y en varias ocasiones en aquellas regiones donde se observa el contacto con fibras colagénicas. (Fig. 4a: X21.700;  $bar = 1 \mu m$ .), (Fig. 4b: X119.000;  $bar = 0,1 \mu m$ .), (Fig. 4c: X54.700;  $bar = 0,5 \mu m$ .).

movimientos morfogénicos, la migración y diferenciación celular, y los mecanismos que caracterizan las metástasis en determinados cánceres<sup>19</sup>. Los sitios de adhesión célula-matriz han sido identificados ultraestructuralmen-

te como regiones de engrosamiento en la superficie celular, adyacentes a los componentes del medio extracelular<sup>16</sup>. Un gran número de proteínas intracelulares han sido caracterizadas como componentes de estas estructuras alta-

mente organizadas. De entre aquellas se incluyen, la actina, talina, vinculina, y otras moléculas asociadas al citoesqueleto celular que son capaces de anclar los filamentos de actina a la membrana plasmática<sup>20, 21</sup>. Los elementos extracelulares que intervienen en esta adhesión todavía no han sido completamente caracterizados, pero incluyen la FN, la LN y diversos tipos de proteoglicanos<sup>21</sup>. Para que se produzca la interacción célula-sustrato es necesaria la existencia de un elemento que relacione ambos compartimentos. En la actualidad, se conoce un conjunto de glucoproteínas, agrupadas bajo el nombre de integrinas, que mediatizan esta unión<sup>14</sup>.

En el presente estudio, mediante diferentes técnicas inmunocitoquímicas, hemos identificado el receptor de membrana celular del subgrupo de las integrinas  $\beta_1$  en el tejido proliferativo intraocular, obtenido de pacientes portadores de una RDP o de una VRP como complicación de un DR, sometidos a cirugía intraocular. La presencia del subgrupo  $\beta_1$  podría explicar cómo dos de las principales glucoproteínas de la matriz extracelular, la FN y la LN, interaccionarían con los elementos celulares del tejido conjuntivo intraocular neoformado. Ambas proteínas y varios tipos de colágeno, ya han sido identificados como elementos participantes en el proceso proliferativo intraocular<sup>8, 10, 17</sup>.

El hecho que en las membranas fibrovasculares de la RDP, la integrina  $\beta_1$  y la FN se inmunolocalizan de forma coincidente en la cara luminal de las células endoteliales, y no colocalizada con la LN, sugiere que dicho receptor podría mediatizar la unión de la FN plasmática en las células endoteliales de los capilares de neoformación. En este sentido, recientemente se ha descrito que la FN puede actuar como un potente activador proliferativo de células endoteliales en cultivo, potenciando los fenómenos desencadenantes de angiogénesis<sup>22</sup>.

Así, la evidencia del receptor en los microcapilares y en capilares ya constituidos podría representar su participación en los procesos angiogénicos observados en la retinopatía diabética.

En el presente trabajo, el estudio puntualizado de determinados patrones de distribución y expresión evidencia la presencia preferente del receptor  $\beta_1$  en células de MER de hasta 2 meses de evolución. Su distribución pericelular coincide totalmente con los hallazgos observados tanto para la FN como para la LN. Por contra, en MER con más tiempo de evolución clínica se detecta un cambio evidente en el patrón de distribución de la FN, que pasa de pericelular a fibrilar. Además, la expresión de la integrina  $\beta_1$  en las MER parece disminuir con su evolución clínica, al aumentar el pleomorfismo celular que ha sido evidente en este grupo de membranas. A diferencia de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta, los estudios de inmunolocalización para microscopía electrónica evidenciaron la presencia del receptor en casi todas las muestras analizadas. Así, su posible presencia y participación en todas las fases del proceso proliferativo no puede ser excluida, ya que en MER con más de 6 meses de evolución hemos podido también identificarlos. Es lógico suponer que la interacción célula-matriz constituye un factor fundamental en los fenómenos que caracterizan y determinan los estadios precoces de formación de las MER, y contribuye para que los mecanismos consiguientes modulen la función y la estabilidad del proceso proliferativo intraocular. El conjunto de nuestros resultados parecen indicar que el receptor  $\beta_1$  participa en las primeras fases de la migración y establecimiento celular en el fenómeno de membranogénesis. En las fases evolutivas tardías, dicho receptor podrían tener un papel en el mantenimiento del anclaje de los componentes celulares sobre el conjunto de la matriz extracelular que se encuentra mucho más desarrollada.

La variabilidad morfológica de las células que se presentaron positivas para la identificación, nos lleva a creer que los diferentes tipos celulares involucrados en el proceso proliferativo intraocular, sea el diabético, sea como complicación de un DR<sup>3-7</sup>, poseen receptores de membranas celulares de la familia  $\beta_1$ ; admitiendo por consiguiente la posibilidad de un anclaje a macromoléculas como la FN, la LN, y los diferentes tipos de colágeno. Estudios ulteriores, mediante inmunodetección electrónica con técnicas apropiadas para el mantenimiento de la ultraestructura celular, serían esenciales para evidenciar cuales son los tipos celulares que utilizan el receptor  $\beta_1$  como elementos de unión al sustrato.

Actualmente se especula con modelos e hipótesis sobre la especificidad de los sitios de anclaje integrina-ligando y sus consecuencias en los fenómenos de la adhesividad celular. Diversos resultados experimentales sugieren que una determinada integrina tendría la propiedad de reconocer y anclar múltiples ligandos en la matriz extracelular, mediante una interacción entre pares de regiones peptídicas estructuralmente homólogas. Otra posibilidad sería una situación semejante, con varias integrinas reconociendo un determinado ligando con bases moleculares idénticas<sup>14-16</sup>. Presumiblemente, el fenómeno de interacción célula-matriz sea bastante más complejo, involucrando la expresión de múltiples integrinas y, probablemente, siendo la consecuencia de un flujo de reacciones competitivas de anclajes cruzadas con diferentes grados de afinidad.

El conjunto de resultados obtenidos en nuestro estudio abren nuevas perspectivas, tanto en el conocimiento de los fenómenos celulares implicados en la formación del tejido proliferativo intraocular, como también en el posible estudio y posterior aplicación de nuevas estrategias terapéuticas. En este sentido, una hipotética aproxima-

ción podría consistir en la utilización de anticuerpos bloqueantes contra el tripéptido ligando, RGD, el cual resulta esencial para el fenómeno de reconocimiento entre el receptor  $\beta_1$ , la FN y la LN extracelulares<sup>11-14</sup>.

---

#### AGRADECIMIENTOS

---

Agradecemos al Dr. Carlos Nebreda (Instituto Barraquer), a los Drs. Juan Montes y Carles Enrich, y Sra. Ana Rivera (Universidad de Barcelona) su colaboración. Este trabajo no podría haber sido realizado sin la participación de los "Serveis Científico-Tècnics de la Universitat de Barcelona" y la subvención del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, FISS/90-0391 (Dr. Vilaró), y de una beca personal al autor (RPCM-89) del Instituto Barraquer.

---

#### SUMMARY

---

*Cell to extracellular matrix interaction is the main event in cellular differentiation and tissue development. By immunoelectron microscopy and fluorescence immunocytochemistry, we have identified the  $\beta_1$  integrin-related receptor membrane complex, laminin (LN) and fibronectin (FN) in epiretinal membranes (ERM) from patients with proliferative vitreoretinopathy (PVR) after retinal detachment and in fibrovascular membranes from proliferative diabetic retinopathy. The results showed  $\beta_1$ -receptor complex in a pericellular pattern joined with cell membrane in ERM. LN and FN were found in extracellular matrix correlated with this integrin. Recep-*

*tor seems to be more frequently observed in ERM just up to two months evolution than others with more time evolution. Moreover we have also detected the integrin receptor in vessels of diabetic fibrovascular membranes. These data provide more accurate physiopathological knowledge about cell-matrix interaction mechanisms in proliferative intraocular processes.*

**Key words:** *Proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, integrins, extracellular matrix, immunocytochemistry, retinal detachment, proliferative intraocular disease.*

---

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- 1 RYAN, S. J. - The pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy in its management. *Am. J. Ophthalmol.*, **100**: 188-193, 1985.
- 2 The Retina Society Terminology Committee. - The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology* **90**: 121-125, 1983.
- 3 CLARKSON, J. G.; GREEN, W. R.; MASSOF, D. - A histopathologic review of 168 cases of preretinal membrane. *Am. J. Ophthalmol.*, **84**: 1-17, 1977.
- 4 KAMPIK, A.; KENYON, K. R.; MICHELS, R. G.; GREEN, W. R.; de la CRUZ, Z. - Epiretinal and vitreous membranes: a comparative study of 56 cases. *Arch. Ophthalmol.*, **99**: 1445-1454, 1981.
- 5 WILKES, S. R.; MANSOUR, A. M.; GREEN, W. R. - Proliferative Vitreoretinopathy. Histopathology of retinal membranes. *Retina*, **7**: 94-101, 1987.
- 6 HISCOTT, P. S.; GRIERSON, I.; McLEOD, D. - Natural history of fibrocellular epiretinal membranes: a quantitative, autoradiographic, and immunohistochemical study. *Br. J. Ophthalmol.*, **69**: 810-823, 1985.
- 7 GRIERSON, I.; HISCOTT, P. S.; HITCHINS, C. A.; McKECHNIE, N. M.; WHITE, V. A.; McLEOD D. - Which cells are involved in the formation of epiretinal membranes? *Sem. Ophthalmol.*, **2**: 99-109, 1987.
- 8 SCHEIFFARTH, O. F.; KAMPIK, A.; GUNTHER, H.; MARK, K. - Proteins of the extracellular matrix in vitreoretinal membranes.

- Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **226**: 357-361, 1988.
- 9 CAMPOCHIARO, P. A.; JERDAN, J. A.; GLASER, B. M. - Serum contains chemoattractants for human retinal pigment epithelial cells. *Arch. Ophthalmol.*, **102**: 1830-1833, 1984.
- 10 CASAROLI MARANO, R. P.; VILARO, S. - The role of fibronectin, laminin, vitronectin and their receptors on cellular adhesion in proliferative vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **35**: 2791-2803, 1994.
- 11 RUOSLAHTI, E.; ENGVALL, E.; HAYMAN, E. G. - Fibronectin: current concepts of its structure and function. *Coll. Relat. Res.*, **1**: 95-128, 1981.
- 12 YAMADA, K. M. - Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. In: Hay E. D. ed., *Cell Biology of Extracellular Matrix*, 2nd. Ed. Plenum Press, New York, 1991, pp. 111-146.
- 13 TERRANOVA, V. P.; ROHRBACH, D. H.; MARTIN, G. R. - Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell*, **22**: 719-726, 1980.
- 14 HUMPHRIES, M. J. - The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. *J. Cell Sci.*, **97**: 585-592, 1990.
- 15 HYNES, R. O. - Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**: 11-25, 1992.
- 16 BUCK, C. A.; HORWITZ, A. F. - Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **3**: 179-205, 1987.
- 17 FORSBERG, E.; PAULSON, M.; TIMPL, R.; JOHANSSON, S. - Characterization of laminin receptor on rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **265**: 6376-6381, 1990.
- 18 CASAROLI MARANO, R. P.; PREISSNER, K. T.; VILARO, S. - Fibronectin, laminin, vitronectin and their receptors in newly-formed capillaries in proliferative diabetic retinopathy. *Exp. Eye Res.*, **60**: 5-17, 1995.
- 19 ABERCROMBIE, M.; HEAYSMAN, J. E. M.; PEGRUM, S. M. - The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Exp. Cell Res.*, **67**: 359-367, 1971.
- 20 WEHLAND, J.; OSBORN, M.; WEBER, K. - Cell-to-substratum contacts in living cells: A direct correlation between interference reflection and direct immunofluorescence microscopy using antibodies against  $\alpha$ -actin. *J. Cell Sci.*, **37**: 257-273, 1979.
- 21 SINGER, I. I.; PARADISO, P. R. - A transmembrane relationship between fibronectin and vinculin (130 kD protein) serum modulation in normal and transformed hamster fibroblast. *Cell*, **24**: 481-492, 1981.
- 22 INGBER, D. E.; PRUSTY, D.; FRANGIONI, J. V.; CRAGOE, E. J.; LECHENE, C.; SCHWARTZ, M. A. - Control of intracellular pH and growth by fibronectin in capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.*, **110**: 1803-1811, 1990.