

VLF: un nuevo activador no convencional de la vía del calcio aislado del humor vítreo

J.P. CAMIÑA^a, E. DÍAZ-RODRÍGUEZ^a, X. CASABIELL^b, M. LAGE^a y F.F. CASANUEVA^a

^aLaboratorio de Endocrinología Molecular y Celular. Departamento de Medicina. ^bDepartamento de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela y Complejo Hospitalario Universitario de Santiago. Santiago de Compostela.

Como parte del programa de investigación en retinopatía diabética, y utilizando el humor vítreo bovino como material de partida, nuestro grupo ha aislado y caracterizado un nuevo lípido complejo con potente actividad movilizadora de calcio intracelular, no relacionado con ninguno de los factores de crecimiento descritos hasta este momento en el humor vítreo. Este factor lipídico induce movilización de calcio de depósitos intracelulares sensibles a ácido fosfático pero no sensibles a D-mio-inositol-1,4,5-trifosfato. Se describe, por una parte, la implicación de factores intrínsecos bioactivos de naturaleza lipídica y, por otra, la activación de "nuevas" rutas de señalización intracelular. La identificación de este tipo de lípidos, con importantes propiedades a escala celular, podría abrir nuevas puertas en el entendimiento de la fisiopatología en el ojo.

VLF: A NEW, NON CONVENTIONAL ACTIVATOR OF THE CALCIUM PATHWAY ISOLATED FROM THE VITREOUS HUMOUR

We have characterized a lipid agent which is a potent intracellular calcium activator not related to other growth factors in vitreous humor. This agent mobilises intracellular calcium sensitive to fosfatidic acid but not sensitive to D-mio-inositol-1,4,5 triphosphate.

We describe lipid bioactive intrinsic factors as new activators of new pathways.

Key words: Diabetic retinopathy. Lipids. Growth factors.

Los procesos proliferativos en el humor vítreo constituyen un problema médico social de primer orden. Así, la retinopatía diabética es directamente responsable de alrededor de la mitad de los casos de ceguera en países desarrollados¹. A pesar de la activa investigación realizada sobre los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a los trastornos proliferativos en el vítreo, no se ha conseguido establecer con exactitud la secuencia de los sucesos bioquímicos implicados. Diferentes factores de crecimiento², entre ellos factor de crecimiento fibroblástico (bFGF)^{3,4}, factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)^{5,6}, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)⁷, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)⁸, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)⁹, factor de crecimiento hepático (HGF)¹⁰ y miembros de la familia de interleucinas^{11,12}, muestran concentraciones alteradas en el humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa, pero los datos de los que se dispone actualmente indican que no existe un único factor responsable de estos procesos. Podríamos pensar que concentraciones elevadas de uno o más factores de tipo proliferativo, o valores insuficientes de factores de tipo inhibitorio, podrían romper el delicado balance de un medio inhibitorio conduciendo a uno de tipo proliferativo. Todo parece indicar que los factores de crecimiento no tienen un papel clave en la iniciación de tales procesos, sino que posiblemente ejercen un papel tardío en la secuencia temporal del desarrollo de la retinopatía diabética como una respuesta a las alteraciones avanzadas en el ojo¹¹⁻¹⁵. Recientemente se ha propuesto como secuencia provisional de acontecimientos: hiperglucemia \rightarrow respuestas bioquímicas (seudohipoxia hiperglucémica, proteína cinasa C [PKC], etc.) \rightarrow pérdida de capilaridad \rightarrow hipoxia \rightarrow entrada de factores de crecimen-

Correspondencia: Dr. J.P. Camiña.
Laboratorio de Endocrinología Molecular y Celular.
Facultad de Medicina. Universidad de Santiago.
Apdo. de Correos 563. 15780 Santiago de Compostela.
Correo electrónico: mecamina@usc.es

Palabras clave: Retinopatía diabética. Lípidos. Factores de crecimiento.

Manuscrito recibido el 6-10-2000; aceptado para su publicación el 17-2-2001.

to/estimulación local de los factores de crecimiento (VEGF, IGF, TNF- α)/inactivación de la inhibición de crecimiento \rightarrow remodelado tisular/angiogénesis \rightarrow manifestación de complicaciones¹⁶.

En estos últimos años, la investigación en este campo se ha centrado en el estudio de los factores de crecimiento que podríamos clasificar como “clásicos”, no considerando la posible implicación de factores intrínsecos, moléculas de bajo peso molecular que podrían estar operando en la iniciación y/o desarrollo de tales alteraciones. Recientemente, se ha desechado el concepto de los lípidos como meras moléculas de tipo estructural, consolidándose el papel de éstos como moléculas que participan de forma activa en diferentes procesos. Los ejemplos más notables son el ácido lisofosfatídico (LPA)¹⁷⁻¹⁹, la esfingosina-1-fosfato (S1P)²⁰⁻²² y la esfingosilfosforilcolina (SPC)²³ como agentes movilizadores de calcio y proliferativos en diferentes sistemas biológicos.

Recientemente, hemos descrito la presencia de un factor que activa la vía del calcio en el humor vítreo humano, con propiedades bioquímicas inusuales²⁴. Trabajando con el humor vítreo bovino como material de partida, hemos descrito el aislamiento y caracterización de un factor de bajo peso molecular que activa la vía del calcio, provisionalmente denominado bVLF (*bovine vitreous lipid factor*), completamente diferente de los factores de crecimiento descritos hasta este momento en el humor vítreo²⁵. Además, se ha podido delimitar parte del mecanismo de señalización intracelular, que implica la liberación de calcio al citosol a partir de depósitos intracelulares no sensibles a D-mio-inositol-1,4,5-trifosfato (Ins [1,4,5] P₃)^{26,27}.

MOVILIZACIÓN DE CALCIO INDUCIDA POR EL HUMOR VÍTREO HUMANO Y BOVINO

El calcio es uno de los iones intracelulares que modula procesos biológicos esenciales como la proliferación, diferenciación, exocitosis, contracción y metabolismo. Teniendo en cuenta este concepto, suspensiones de células EGFR-T17 cargadas con el indicador fluorescente sensible al calcio fura-2 fueron estimuladas con una alícuota de humor vítreo humano (obtenido de vitrectomías realizadas a pacientes con retinopatía diabética proliferativa) induciendo un aumento pasajero de los valores de calcio intracelular ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i = 150 \pm 10 \text{ nM}$), que alcanza un máximo a los 5-6 s tras la estimulación, decayendo a los 50-60 s a valores infra-basales para volver al valor basal a los 100-200 s (fig. 1a). Esta señal de calcio fue debida de forma exclusiva a una redistribución de los depósitos internos sin participación de calcio extracelular.

Una de las principales limitaciones con la que nos hemos encontrado a lo largo del desarrollo de este proyecto ha sido la escasa disponibilidad de muestras humanas para abordar una caracterización completa de la sustancia responsable de la movilización de calcio, limitación que viene determinada por la utilización de material de tipo quirúrgico. Para solventar en lo posible la escasez de muestras se realizaron trabajos en otros sistemas biológicos con el fin de identificar fuentes alternativas, seleccionando así el humor vítreo bovino.

A diferencia de la señal de calcio inducida por el vítreo humano, la adición de vítreo bovino indujo un incremento bifásico de calcio intracelular caracterizado por un aumento rápido y pasajero de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que alcanza un máximo a los 4-10 s postestimulación (a) (fig. 1b), seguido por una segunda fase más lenta que alcanza su máximo a los 1,5-2 min (b) con posterior disminución sin retorno a los valores basales de calcio. Esta señal podía ser consecuencia de la acción de un único compuesto con acción bifásica (como serían los casos del factor de crecimiento epidérmico

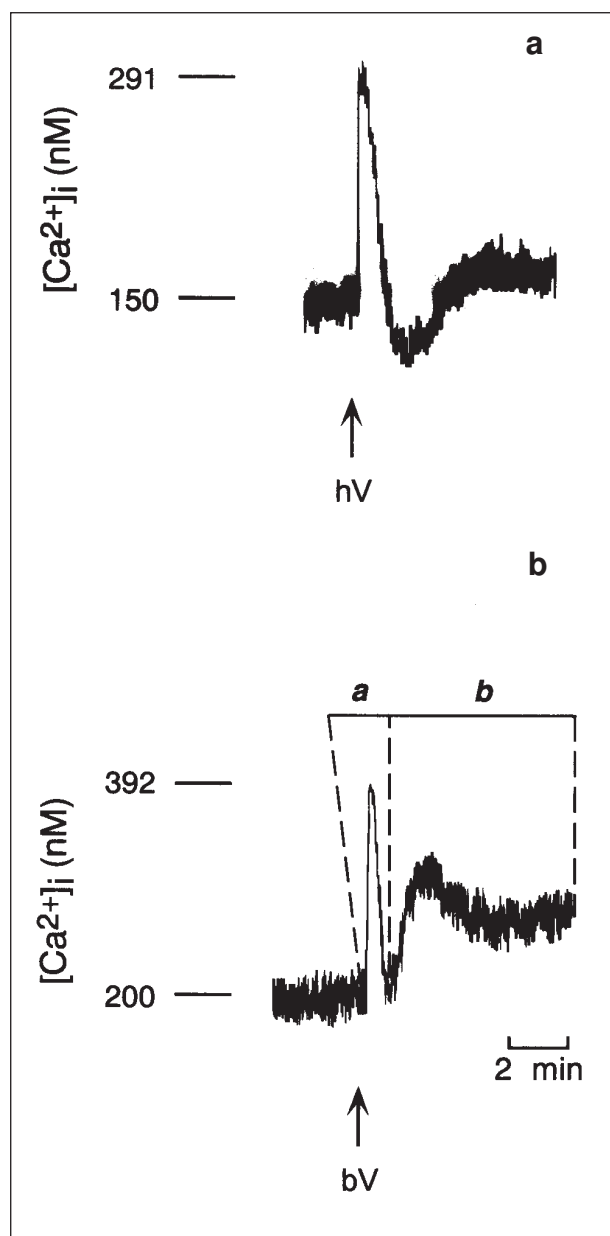


Fig. 1. a) Registro de la movilización de calcio intracelular inducida por el vítreo humano (hV) en la línea celular EGFR-T17. Las células fueron estimuladas con vítreo obtenido a partir de vitrectomías de pacientes con retinopatía diabética. b) Movilización de calcio intracelular inducida por el vítreo bovino (bV) en células EGFR-T17. Esta señal de calcio fue dividida en dos fases: un pico inicial transitorio (a) seguido de una señal lenta con posterior disminución sin retorno al valor basal (b). Los valores de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fueron determinados en suspensiones celulares marcadas con la sonda fluorescente calioselectiva fura-2.

co [EGF] o de la hormona liberadora de tirotropina [TRH], por ejemplo) en los que hay participación de los depósitos intracelulares de calcio así como canales de membrana de calcio, o bien debido a la presencia de dos o más sustancias que activen vías diferentes de señalamiento. A pesar de que esta diferencia cuestionó al principio la validez del modelo, el análisis detallado de esta doble respuesta, de su diferente regulación (PKC, desensibilización cruzada con

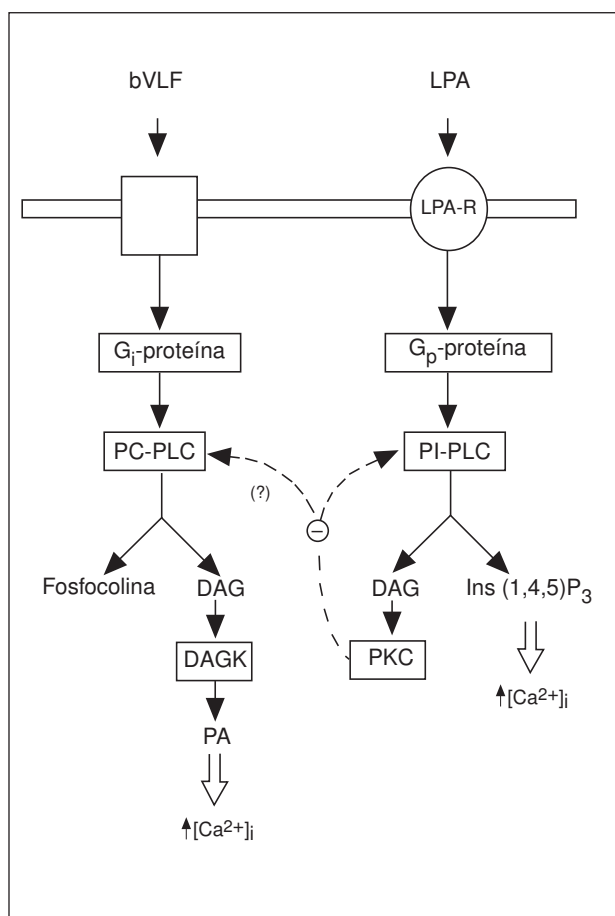


Fig. 2. La administración de factor lipídico del vítreo bovino (bVLF) a fibroblastos EGFR-T17 induce la activación de la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) de la membrana plasmática dando lugar a fosfocolina y diacilglicerol (DAG) (panel izquierdo). El DAG generado es transformado en ácido fosfatídico (PA) por medio de una diacilglicerol cinasa (DAG-K) acoplada al sistema. El PA es el responsable directo de la liberación de calcio de los depósitos intracelulares no sensibles a $Ins(1,4,5)P_3$. No existe activación de la proteína cinasa C por DAG generado tras la estimulación con bVLF. La línea de puntos indica regulación negativa, así como el supuesto entrecruzamiento con el mecanismo de señalamiento de ácido lisofosfatídico (LPA) (panel derecho).

bFGF) y de diferencias en el comportamiento fisicoquímico (precipitación con sulfato amónico y disolventes orgánicos) se pudo comprobar que esta respuesta se debía a la acción de, al menos, dos sustancias de naturaleza química diferente: una primera señal de calcio producida por una sustancia de naturaleza lipídica, seguida de una segunda señal, inducida por un factor de naturaleza peptídica e identificado como aFGF²⁵.

ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS FACTORES ACTIVOS DEL VÍTREO BOVINO

La purificación de la sustancia responsable de la segunda señal se desarrolló en dos etapas: una primera cromatografía de intercambio catiónico (*S. sepharosa fast flow* [FFS]) seguida de una cromatografía de afinidad en columna de heparin sepharosa. El material bioactivo así aislado fue identificado como dos isoformas de aFGF, uno de los factores de crecimiento descritos clásicamente en el vítreo^{28,29}.

Nuestra atención se centró en el aislamiento de la sustancia responsable de la primera señal, dada su similitud con el factor descrito en el vítreo humano. Se desarrollaron cinco etapas cromatográficas partiendo de la extracción monofásica del homogeneizado del vítreo bovino, extracción en fase sólida, cromatografía sobre sílica, cromatografía de intercambio aniónico, nueva extracción en fase sólida y, finalmente, HPLC con columna de ciano desarrollada en fase normal. El rendimiento que se obtuvo era de 1 mg de compuesto bioactivo por litro de vítreo bovino.

Los ensayos de caracterización bioquímica se realizaron mediante tratamiento con diferentes enzimas específicas bajo condiciones controladas, lo que permitió establecer las características mínimas estructurales para la bioactividad. Ni la DNasa ni la RNasa afectaron apreciablemente la bioactividad, descartando que el compuesto fuese un ácido nucleico. El tratamiento con fosfolipasa B resultó en una pérdida de 82,5% de bioactividad, mientras la digestión con fosfolipasa C resultó en una pérdida superior al 95%. Esto sugirió que el compuesto era de naturaleza fosfolipídica, presentando cadenas acilo y una cabeza polar. El tratamiento con fosfatasa alcalina eliminó la bioactividad, lo que indicó que ésta depende de la existencia de grupos fosfatos terminales en la molécula. El hecho de que la bioactividad se perdiese tras el tratamiento con pronasa y proteinasa K sugirió la existencia de enlaces peptídicos en el compuesto. Este nuevo lípido complejo aislado del vítreo bovino podría ser un nuevo miembro de la creciente familia de lípidos bioactivos²⁵.

MOVILIZACIÓN DE CALCIO INDUCIDA POR EL FACTOR LIPÍDICO DEL VÍTREO BOVINO

La movilización de calcio inducida por bVLF se caracteriza por un aumento intracelular rápido y pasajero $[Ca^{2+}]_i$ ($\Delta[Ca^{2+}]_i = 210 \pm 10$ nM) descendido a valores infrabasales para retornar finalmente a valores preestimulatorios. Esta señal de calcio se debe de forma exclusiva a una redistribución de los depósitos intracelulares, sin participación del calcio extracelular. ¿Por qué mecanismo este factor induce dicha movilización de calcio? En la mayoría de los sistemas celulares, la movilización de calcio de los depósitos intracelulares es inducida por activación de la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC). Esta enzima actúa sobre el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ($PtdIns[4,5]P_2$) dando lugar a $Ins(1,4,5)P_3$, que es responsable de la secreción de calcio de los depósitos intracelulares^{30,31}. Sin embargo, la movilización de calcio inducida por bVLF está mediada por una proteína de membrana ligada a una fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) a través de una proteína G sensible a la toxina pertúsica (PTX), cuya activación da lugar a la formación de fosfocolina y diacilglicerol (DAG). El DAG es convertido rápidamente a ácido fosfatídico (PA) por medio de una diacilglicerol cinasa (DAG-K) asociada al complejo receptor-proteína G, sin activación de PKC (fig. 2, panel izquierdo). El PA actúa sobre los depósitos intracelulares no sensibles a $Ins(1,4,5)P_3$, y da lugar a la movilización de calcio. En nuestro sistema experimental la señal de calcio fue debida a una acción directa de PA y no a una acción indirecta mediada por una conversión del PA a ácido lisofosfatídico (LPA) mediada por una fosfolipasa A2²⁶.

En principio nuestros datos mostraban puntos en común con la vía de señalamiento descrita para el LPA (fig. 2, panel derecho)^{32,33}. Sin embargo, un análisis completo evidenció grandes diferencias; por ejemplo, el LPA induce movilización de calcio de depósitos sensibles a $Ins(1,4,5)P_3$ e implica la activación de una proteína G de tipo Gq (no

sensible a PTX) acoplada a una PI-PLC. El LPA induce desensibilización homóloga y heteróloga con la respuesta de bVLF; por contra, bVLF no evidencia signos de desensibilización homóloga ni heteróloga con la señal de LPA. Este punto puso de manifiesto la existencia de un entrecruzamiento de las vías de señalamiento de bVLF y LPA, pero no con otros lípidos, como la esfingosina 1-fosfato u otros factores de crecimiento polipeptídicos, como EGF o FGF. La explicación a este punto es la siguiente: la unión de LPA a su receptor activaría una PI-PLC, lo cual induciría a la generación de Ins (1,4,5) P₃ y DAG a partir de Pt-Ins (4,5) P₂, con la consiguiente liberación de calcio de los depósitos intracelulares sensibles a Ins (1,4,5) P₃ y activación de PKC, que podría inducir a una regulación negativa sobre la vía de señalamiento descrita para bVLF (fig. 2, línea de puntos).

El papel biológico de este lípido bioactivo en la fisiología y patofisiología del vítreo aún no se ha podido determinar. Varias cuestiones quedan aún sin responder pero, en este momento, hemos incorporado la posibilidad que sustancias no clásicas con actividad aparente de factor de crecimiento podrían tener un papel importante en la regulación de los procesos proliferativos en el ojo. La identificación de esta nueva clase de lípidos bioactivos, con características “nuevas” de activación celular podría tener importantes e inesperadas implicaciones en el entendimiento de la fisiopatología en el cuerpo vítreo y/o la retina.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ministerio de Sanidad) y por la Xunta de Galicia.

BIBLIOGRAFÍA

- Barry P. The management of diabetic disease. En: Pickup J, Williams G, editores. Textbook of diabetes (2.ª ed.). Vol 2. Oxford: Blackwell Science, Ltd., 1997; 47.1-47.18.
- Wiedemann P. Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. *Surv Ophthalmol* 1992; 36: 373-384.
- Baird A, Culler F, Jones K. Angiogenic factor in human ocular fluid. *Lancet* 1985; 2: 563.
- Silvalingham A, Kenney J, Brown G, Benson W, Donoso L. Basic fibroblast growth factor levels in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 869-872.
- Adamis A, Miller J, Bernal M, D'Amico D, Folkman J, Yeo T et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994; 118: 445-450.
- Aiello L, Avery R, Arrigg P, Keyt B, Jampel H, Shah S et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-1487.
- Meyer Schwickerath R, Pfeiffer A, Blum W, Freyberger H, Klein M, Losche C et al. Vitreous levels of the insulin-like growth factors I and II, and the insulin-like growth factor binding proteins 2 and 3, increase in neovascular eye disease. Studies in nondiabetic and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1993; 92: 2620-2625.
- Hardwick C, Feist R, Morris R, White M, Witherspoon D, Angus R et al. Tractional force generation by porcine Muller cells: stimulation by growth factors in human vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 2053-2063.
- Luna J, Chan C, Derevjani N, Mahlow J, Chiu C, Peng B et al. Blood-retinal barrier (BRB) breakdown in experimental autoimmune uveoretinitis: comparison with vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1beta-mediated breakdown. *J Neurosci Res* 1997; 49: 268-280.
- Canton A, Burgos R, Hernandez C, Mateo C, Segura R, Mesa J et al. Hepatocyte growth factor in vitreous and serum from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2000; 84: 732-735.
- Tang S, Scheiffarth O, Thureau S, Wildner G. Cells of immune system and their cytokines in epiretinal membranes and in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res* 1993; 25: 177-185.
- Asrar A, Maimone D, Morse P, Gregory S, Reder A. Cytokines in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1992; 114: 731-736.
- Boulton M, Gregor Z, McLeod D, Charteris D, Jarvis Evans J, Moriarty P et al. Intravitreal growth factors in proliferative diabetic retinopathy: correlation with neovascular activity and glycaemic management. *Br J Ophthalmol* 1997; 81: 228-233.
- Boulton M. A role for hepatocyte growth factor in diabetic retinopathy? *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 763-764.
- Schultz GS, Grant MB. Neovascular growth factors. *Eye* 1991; 5: 170-180.
- Pfeiffer A, Spranger J, Meyer-Schwickerath R, Schatz H. Growth factor alterations in advanced diabetic retinopathy. A possible role of blood retina barrier breakdown. *Diabetes* 1997; 46: S26-S30.
- Moolenaar W. Development of our current understanding of bioactive lysophospholipids. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 905: 1-10.
- Moolenaar W. Lysophosphatidic acid signalling. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 203-210.
- Moolenaar W, Kranenburg O, Postma F, Zondag C. LPA: G-protein signalling and cellular responses. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 168-173.
- Merrill A, Schmelz E, Dillehay D, Spiegel S, Shayman J, Schroeder J et al. Sphingolipids. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 142: 208-225.
- Spigel S. Sphingosine-1-phosphate: a ligand for the EDG-1 family of G-protein-coupled receptors. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 905: 54-60.
- Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: signaling inside and out. *FEBS Lett* 2000; 476: 55-57.
- Orlani S, Porcelli A, Hrelia S, Lorenzini A, Rugolo M. Intracellular calcium mobilization and phospholipid degradation in sphingomyelinase-stimulated human airway epithelial cells. *Biochem J* 1998; 334: 641-649.
- Pombo C, Bokser L, Casabiell X, Zugaza J, Capeans M, Salorio M et al. Partial characterization of a putative new growth factor present in pathological human vitreous. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234: 155-163.
- Camiña J, Casabiell X, Pérez F, Lage M, Casanueva F. Isolation of a bioactive Ca²⁺-mobilizing complex lipid from bovine vitreous body. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 696-700.
- Camiña J, Casabiell X, Casanueva F. Ins(1,4,5)P₃-independent Ca²⁺ mobilization triggered by a lipid factor isolated from vitreous body. *J Biol Chem* 1999; 274: 28134-28141.
- Camiña J, Casanueva F. Vitreous-derived lipid factor: a new eye related growth factor? *Recent Res Devel Endocrinol* 2000; 1: 145-154.
- Caruelle D, Groux Muscatelli B, Gaudric A, Sestier C, Coscas G, Caruelle J et al. Immunological study of acidic fibroblast growth factor (aFGF) distribution in the eye. *J Cell Biochem* 1989; 39: 117-128.
- Neufeld G, Gospodarowicz D. Basic and acidic fibroblast growth factors interact with the same cell surface receptors. *J Biol Chem* 1986; 261: 5631-5635.
- Berridge M. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 159-193.
- Berridge M. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Londres: Nature*, 1993; 361: 315-326.
- Moolenaar W. Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp Cell Res* 1999; 253: 230-238.
- Van Corven E, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar W. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G protein. *Cell* 1989; 59: 45-54.