

Esther Díaz Rodríguez

# Caracterización y efectos biológicos de un factor lipídico bioactivo aislado del vítreo bovino

Universidad de Santiago de Compostela

Laboratorio de Endocrinología Molecular

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología

Facultad de Medicina

Mayo de 2004



Felipe Casanueva Freijo, Catedrático de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y Jesús Pérez Camiña, Investigador del Instituto Carlos III-Complejo Hospitalario Universitario de Santiago.

Autorizamos:

A Dña. Esther Díaz Rodríguez, licenciada en Biología y alumna del programa de Tercer Ciclo de Endocrinología, a presentar el trabajo titulado "*Caracterización y efectos biológicos de un factor lipídico bioactivo aislado del vítreo bovino*", realizado y concluido bajo nuestra dirección, para optar al grado de Doctora en Biología.

Y para que así conste, firmamos la presente en Santiago de Compostela,

Prof. Felipe Casanueva Freijo

Dr. Jesús Pérez Camiña





*A mis padres Camilo y Pili  
A mi hermana Cris  
A Rubén*



Deseo expresar mi más sincero agradecimiento.

A los directores de la Tesis, el Profesor Felipe Casanueva Freijo, Catedrático de Medicina, al Dr. Jesús Pérez Camiña sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible.

I wish to thank Profesor Dirck L. Ypey from Department of Physiology, Leiden University Medical Center (LUMC, The Netherlands) for continuous helpful comments and for making posible to do part of this work in his group. I would like to thank Profesor Alexander P.R. Theuvenet and Dr. Eric G.A. Harck from Departament of Cellular Biology, University of Nijmegen (The Netherlands) for their helpful comments and valuable advices.

A mis compañeros del laboratorio de Endocrinología Molecular: Marco, Marta, Omar, María, Yola, Sisi, Sihara, Dolores, Olga. Así como la gente que pasó por el laboratorio: Xesús, Carmela, Merche, Roberto, María y Sonia, que me han dejado todos muy buenos recuerdos y una gran amistad.

A la gente que trabaja en el servicio de Espectrometría de Masas de la U.S.C, que me recibieron con mucho cariño.

A Antonio Piñeiro por su contribución en la obtención de las células hRPE.

A Viñuela, por su gran ayuda con los experimentos de apoptosis y necrosis celular.

A Mary Lage, por su compañía y sobre todo por su apoyo en los momentos más difíciles (que son muchos).

A todos mis amigos de Pontedeume y toda la gente que he conocido en Santiago durante todos estos años, por su amistad y por los buenos momentos que hemos pasado.

A Jesús, la verdad es que después de tantos años compartidos es muy difícil resumirlo en pocas palabras, pero sobre todo agradecer su inestimable ayuda en el laboratorio, pero sobre todo por su amistad. Que nervios!!

A Rubén, una de las personas más importante en mi vida .... por estar siempre ahí y hacerme reír , “ *é bo rapasss.....*”

A mi familia; a mi abuelo, a mis padres Camilo y Pili, a mi hermana Cris y Markos (Trashno), porque siempre están ahí para escucharme y animarme, aunque a veces sea un poco difícil.



## ÍNDICE

<b>PROPÓSITO</b> .....	3
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1. Cavidad vítrea y vítreo.....	7
1.1. Bioquímica del vítreo .....	8
Colágeno .....	9
Ácido Hialurónico.....	9
Proteínas y glucoproteínas .....	9
Lípidos.....	10
2. Fisiología y funciones del vítreo .....	10
3. Retinopatía diabética proliferativa.....	11
4. Papel de los factores de crecimiento en los trastornos proliferativos a nivel vítreo.....	12
5. Identificación y caracterización de factores lipídicos activadores de la vía del calcio en el vítreo .....	14
<b>MÉTODOS</b> .....	23
1. Procesado de las muestras de vítreo bovino .....	23
2. Proceso de purificación del factor bVLF del vítreo bovino .....	23
3. Ensayos para la diferenciación entre la estructura de un GPI y la estructura del bVLF .....	26
3.1. Ensayos enzimáticos.....	26
3.1.1. Fosfolipasa C .....	26
3.1.2. Fosfolipasa B .....	26
3.2. Ensayos químicos .....	26
3.2.1. Hidrólisis alcalina .....	26
3.2.2. Desaminación con ácido nitroso.....	27
4. Determinación de los grupos fosfatos.....	27
5. Revelantes específicos para cromatografía en capa fina.....	27
5.1. Ninhidrina .....	28
5.2. Reactivo de Dragendorf.....	28
5.3. Orcinol.....	28
5.4. Resorcinol .....	28
5.5. Reactivo azul de molibdeno.....	28
5.6. Hidroxilamina.....	29

5.7. Bencidina.....	29
6. Características del cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas .....	29
7. Análisis de monosacáridos por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC/MS) .....	29
8. Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC/MS) .....	30
9. Análisis de bases esfingoides por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC/MS).....	31
10. Cuantificación de los azúcares, ácidos grasos y bases esfingoides .....	32
11. Cultivos celulares.....	32
11.1. Línea celular, fibroblastos EGFR-T17 .....	32
11.2. Cultivo primario de células del epitelio pigmentario retiniano humano (hRPE).....	33
12. Mediciones de calcio intracelular .....	34
13. Mediciones de calcio extracelular .....	38
14. Medición de la generación de inositolfosfatos.....	38
15. Medición de la generación intracelular de ácido fosfatídico .....	39
16. Medición de la generación intracelular de diacilglicerol.....	40
17. Estimación de la activación de la fosfolipasa D intracelular.....	41
18. Medición de cAMP intracelular.....	42
19. Determinación de las variaciones del pHi .....	42
20. Medida del potencial de membrana con bis-oxonol .....	43
21. Ensayos de electrofisiología .....	44
22. Determinación de la comunicación intercelular a través de las uniones gap por medidas de capacitancia .....	45
23. Proliferación celular .....	45
23.1. Recuento celular.....	45
23.1.1. Células EGFR-T17 .....	46
23.1.2. Células hRPE .....	46
23.2. Incorporación de BrdU .....	46
24. Viabilidad celular.....	47
25. Apoptosis y necrosis celular .....	47
26. Análisis estadístico .....	48

**RESULTADOS..... 53***Caracterización de la estructura del bVLF*

1. Caracterización enzimática y química del bVLF, diferenciación de los GPI ..... 55
2. Análisis de la naturaleza del bVLF..... 57
3. Caracterización cualitativa y cuantitativa de la estructura del bVLF ..... 61
  - 3.1. Análisis de la composición de ácidos grasos ..... 61
  - 3.2. Análisis de la composición de azúcares/ácido siálico ..... 65
  - 3.3. Análisis de la composición de las bases esfingoides ..... 70

*Ensayos de bioquímica celular en EGFR-T17*

1. Caracterización de la movilización de calcio inducida por el bVLF en células EGFR-T17 ..... 75
2. Dosis respuesta de la movilización de calcio intracelular..... 77
3. Evaluación de la existencia de proteínas de membrana que median la acción del bVLF ..... 77
4. Implicación de la vía de los inosítoles ..... 79
  - 4.1. Implicación de la PI-PLC ..... 79
  - 4.2. Implicación de la PKC ..... 79
  - 4.3. Desensibilización cruzada con el LPA ..... 82
  - 4.4. Generación de inosítoles totales..... 82
  - 4.5. Generación de DAG ..... 85
5. Evaluación de la implicación de las proteínas G en la vía de señalización ..... 86
6. Implicación del bVLF en la generación del cAMP ..... 86
7. Entrada capacitativa de calcio ..... 86
8. Estudio de la ruta alternativa responsable de la movilización de calcio inducida por el bVLF ..... 90
  - 8.1. Implicación de la fosfolipasa D específica de fosfatidilcolina (PC-PLD)..... 90
  - 8.2. Implicación de la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) y la diacilglicerol quinasa (DAG-K) ..... 90
  - 8.3. Generación de ácido fosfatídico (PA) intracelular ..... 91

## Índice

9. Efecto del bVLF sobre el potencial de membrana (Vm) .....	95
9.1. Caracterización del efecto del bVLF sobre el Vm.....	95
9.2. Caracterización de las corrientes iónicas asociadas a la hiperpolarización.....	97
9.3. Efecto de los inhibidores de canales de K <sup>+</sup> sobre la hiperpolarización inducida por el bVLF .....	102
9.4. Implicación del calcio en la respuesta de hiperpolarización .....	104
10. Efecto del bVLF sobre las uniones gap.....	106
11. Efecto del bVLF sobre el pH intracelular .....	108
12. Viabilidad celular.....	110
13. Proliferación celular . Efecto mitogénico del bVLF .....	111
14. Apoptosis y necrosis celular .....	113
 <i>Ensayos de bioquímica celular en hRPE</i>	
1. Caracterización de la movilización de calcio inducida por el bVLF..	117
2. Entrada capacitativa de calcio .....	119
3. Estudio de la señal de transducción responsable de la movilización de calcio inducida por el bVLF .....	119
3.1. Implicación de la PKC.....	119
3.2. Desensibilización cruzada con el LPA .....	121
3.3. Generación de inosítoles totales .....	121
3.4. Generación de cAMP.....	121
3.5. Caracterización de la señal de transducción inducida por el bVLF .....	126
4. Efecto mitogénico del bVLF .....	126
5. Papel del bVLF como potenciador/inhibidor del efecto mitogénico activado por factores de crecimiento peptídicos .....	127
 <b>DISCUSIÓN</b> .....	 139
 <b>CONCLUSIONES</b> .....	 155
 <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	 159



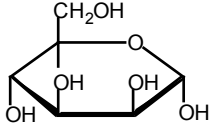
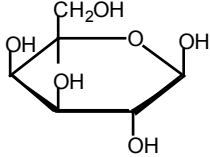
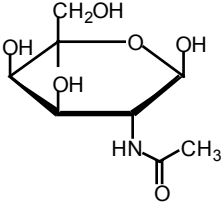
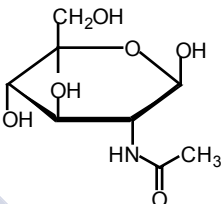
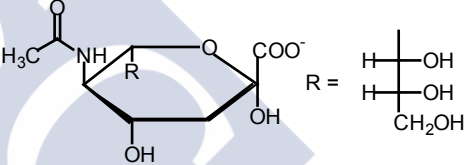
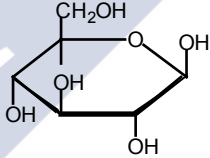
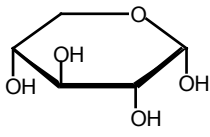
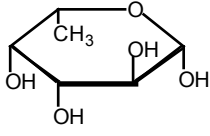
## **Abreviaturas**



bV	Vítreo bovino
bVLF	Factor lipídico del vítreo bovino
cAMP	Adenisínmonofosfato cíclico
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración intracelular de Ca <sup>2+</sup> libre
Cer	Ceramida
cpm	Cuentas por minuto
DAG	Diacilglicerol
DEAE-A25	Resina de intercambio aniónico DEAE (forma acetato)
DAGK	Diacilglicerol quinasa
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
EE	Error estandar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Acido etilenglicol-bis-(β-aminoetiléter)- <i>N,N'</i> -tetracético
F <sub>345</sub>	Fluorescencia a 345 nm
F <sub>380</sub>	Fluorescencia a 380 nm
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
F <sub>max</sub>	Fluorescencia máxima
F <sub>min</sub>	Fluorescencia mínima
Fura 2 A/M	Fura 2 pentaacetoximetiléster
GPI	Glicofosfatidilinositol
GM1	Gangliosido monosialico 1 [Galβ1,3GalNAc β1,4(Neu5Acα2,3)Gal β1,4Glc β1 Ceramide, NH <sub>4</sub> ]
GD1a	Gangliósido disialico 1a [ Cer-Glc-Gal(NeucAc)-GalNAc-Gal-NeuAc 2NH <sub>4</sub> ]
GD1b	Gangliósido disialico 1b [ Il <sup>3</sup> (Neu5Ac α2,3) <sub>2</sub> GgOse <sub>4</sub> Ceramide, 2 NH <sub>4</sub> ]
GT1b	Gangliósido trisialico [Neu5Acα2,3)Gal β1,4(Neu5Acα2,8 Neu5Acα2,3)Galβ1,4 (Neu5Acα2,8 Neu5Acα2,3) Gal β1,1 Ceramide, 3NH <sub>4</sub> ]
GC-MS	Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas
HEPES	Ácido <i>N</i> -2-hidroxietilpiperacino- <i>N'</i> -2-etanolulfónico
HONO	Desaminación con ácido nitroso
HGF	Factor de crecimiento hepático
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alta resolución
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico I
Ins(1,4,5)P <sub>3</sub>	<i>D-mio</i> -inositol-1,4,5-trifosfato
KRH	Medio Krebs-Ringer-HEPES

## Abreviaturas

LPA	Acido lisofosfatídico
LPC	Lisofosfatidilcolona
MAH	Hidrólisis alcalina
NANA	<i>N</i> -acetil-neurámico (ácido siálico)
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
PBS	Solución salina tamponada de fosfatos
PC	Fosfatidilcolina
PC-PLC	Fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina
PC-PLD	Fosfolipasa D específica de fosfatidilcolina
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDR	Retinopatía diabética proliferativa
PEDF	Factor derivado del epitelio pigmentario
PI-PLC	Fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol
PKC	Proteína quinasa C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMA	Forbol 12-miristato-13-acetato
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PTX	Toxina pertúsica
R	Relación F <sub>345</sub> /F <sub>380</sub>
R <sub>max</sub>	R máxima para el complejo indicador-calcio
R <sub>min</sub>	R mínima para el complejo indicador-calcio
RPE	Células del epitelio pigmentario retiniano
S-1-P	Esfingosina-1-fosfato
SPC	Esfingosilfosforilcolina
SPE-C18	Extracción en fase sólida en matriz de fase reversa C18
TCA	Acido tricloroacético
TLC	Cromatografía en capa fina
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TGF $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
tr	Tiempo de retención
U73122	1-[6-((17 $\beta$ -Metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-il)amino)hexil]-1H-pirrol-2,5-diona
UF	Unidades de fluorescencia
VEGF	Factor de crecimiento endotelico vascular

Abreviaturas	Monosacárido	Estructura
Man	$\beta$ -Manosa	
Gal	$\beta$ -Galactosa	
GalNAc	$\beta$ -N-Acetil-galactosamina	
GlcNAc	$\beta$ -N-Acetil-glucosamina	
NANA	Ácido N-Acetil-neuramínico (Ácido siálico)	
Glc	$\beta$ -Glucosa	
Xil	$\beta$ -Xilosa	
Fuc	$\beta$ -Fucosa	





## **Propósito**



## **PROPÓSITO**

Los procesos proliferativos alterados en el ojo, entre ellos la retinopatía diabética proliferativa (PDR), son uno de las principales causas de ceguera en los países desarrollados. A pesar de la investigación realizada a la largo de estos años, se desconoce la secuencia de eventos bioquímicos implicados en el inicio, desarrollo y terminación de tales procesos proliferativos. Es importante resaltar que ninguno de los factores de crecimiento clásicos ha podido ser asociado de forma inequívoca con la fisiopatología de dichos procesos, planteándose así la idea de que la causa última sería la ruptura de un equilibrio entre factores de crecimiento de tipo proliferativo y factores de tipo inhibitorio. Por ello la identificación de factores intrínsecos en el vítreo constituye un punto de gran importancia.

Los objetivos planteados inicialmente han sido: 1.- Aislamiento y caracterización de un factor con capacidad movilizadora de calcio intracelular, denominado bVLF, en muestras control de vítreo bovino. 2.- Estudio de los mecanismos de acción tanto en fibroblastos (EGFR-T17) como en cultivos primarios de células de epitelio pigmentario retiniano humano (hRPE).





# **Introducción**



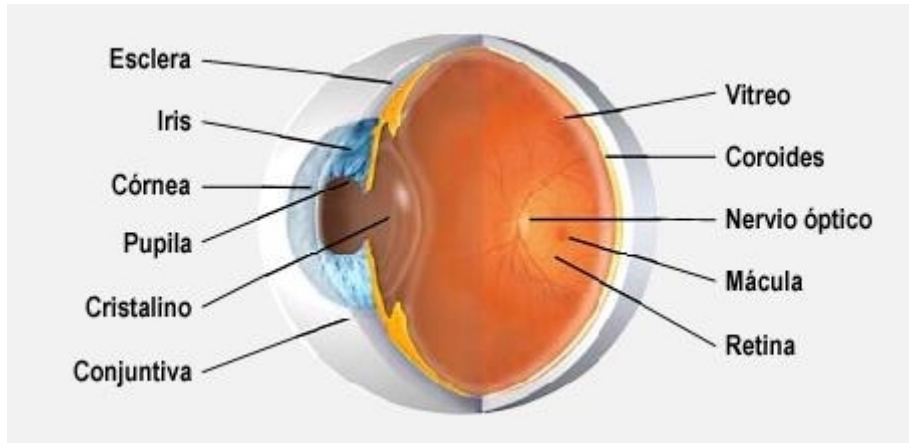
Desde que a mediados de los años 80 se descubrió que procesos aparentemente tan diferentes como la hidrólisis de determinados fosfolípidos de membrana en respuesta a determinados estímulos, los aumentos transitorios de los niveles de calcio intracelular, y la respuesta proliferativa no eran sino manifestaciones diferentes de un único proceso bioquímico. El progreso experimentado en el estudio de las diferentes vías de transducción de señales y su relación con el control de la multiplicación celular ha sido espectacular. Hoy, conceptos como los oncogenes, los receptores acoplados a proteínas G, el control de efectores intracelulares por fosfo/defosforilación y los avances experimentados en el estudio del control del ciclo celular nos están permitiendo sentar las bases fisiopatológicas de un número creciente de trastornos que cursan con alteraciones de la proliferación celular. Tras la caracterización de varios factores de crecimiento de naturaleza lipídica, resulta cada vez más patente que el control de la proliferación no es un coto exclusivo de proteínas y péptidos. La importancia de diferentes clases de lípidos, tanto actuando como señales extracelulares como por su participación como intermediarios en eventos intracelulares aumenta día a día, con aportaciones provenientes de muy diversos campos.

De entre los fenómenos proliferativos no tumorales, los que cursan con repercusión ocular presentan características propias que les confiere un interés muy especial. En este contexto, existe una entidad clínica de gran importancia en la que la desregulación de los mecanismos de control de la proliferación desempeña un papel esencial: la retinopatía diabética proliferativa.

## **1.- CAVIDAD VÍTREA Y VÍTREO**

La cavidad vítrea es el espacio interno del ojo limitado por delante por el cristalino y sus fibras zonulares, y más hacia atrás por el cuerpo ciliar, la retina y la papila óptica. Tiene un volumen de unos 4 ml y su interior está ocupado por completo por gel vítreo, un líquido viscoso con un contenido de agua del 99%. El 1% restante incluye básicamente dos componentes: ácido hialurónico y fibrillas de colágeno tipo 2, cuyas relaciones fisicoquímicas son responsables de sus propiedades viscoelásticas. El escaso contenido celular y molecular es esencial para el mantenimiento de la transparencia. En realidad, el vítreo no tiene una función bien caracterizada, aunque sí

sabemos que la relación física entre el gel vítreo y la retina es la base de diversas patologías graves que amenazan la visión.



Esquema 1.- Corte esquemático del ojo humano.

La corteza vítrea se puede definir como el caparazón periférico del vítreo. Se la puede considerar como el centro metabólico de este órgano debido a la presencia de hialocitos, células mononucleares ampliamente diseminadas en una capa simple. Estos son responsables de mantener la síntesis y metabolismo de las glucoproteínas en el interior del vítreo. La segunda población celular en la corteza vítrea son los fibroblastos. Estas células constituyen menos del 10% del total de la población celular del vítreo y están localizadas en la base del mismo. Aunque su función aún no se ha determinado, puede que estas células estén involucradas en la síntesis de colágeno vítreo, sobre todo en situaciones patológicas.

### 1.1.- Bioquímica del vítreo. Estructura

El vítreo está formado por mallas compenetradas de moléculas de ácido hialurónico y fibrillas de colágeno, lo que le proporciona una estructura sólida, aumentada por la contribución hidrofílica del ácido hialurónico.

### *Colágeno*

El colágeno es la principal proteína estructural presente en el vítreo. Bioquímicamente, está constituida por tres polipéptidos independientes organizados en una configuración fibrilar en triple hélice. El colágeno vítreo, fundamentalmente de tipo 2, presenta características únicas que lo diferencian de otros colágenos de su misma clase, y que parecen estar relacionadas con las propiedades fisiológicas que posee el vítreo, fundamentalmente en lo que respecta a sus funciones mecánicas. Estas características están en relación con la secuencia aminoacídica, el grado de hidroxilación de los mismos y la presencia de cadenas colaterales de carbohidratos.

### *Ácido Hialurónico*

El ácido hialurónico es el glucosaminoglicano predominante en el vítreo. Los glucosaminoglicanos son polisacáridos que se encuentran generalmente ligados de forma covalente a proteínas, dando lugar a estructuras que se conocen como proteoglicanos. Las interacciones electrostáticas que se producen en el ácido hialurónico constituyen la base de las diferentes propiedades del mismo, entre ellas su influencia sobre la presión osmótica, el transporte y distribución iónicos. Así, los cambios en el medio iónico a nivel vítreo pueden convertirse en energía mecánica con la extensión o contracción de la macromolécula de ácido hialurónico, lo que a su vez provocaría la tumefacción o reducción vítrea, respectivamente.

### *Proteínas y glucoproteínas*

Las diferencias entre la composición del plasma y el vítreo sugieren la existencia de una barrera hematorretinal o hematovítrea con propiedades selectivas similares a la hematoencefálica. La permeabilidad depende del tamaño de las moléculas así como de su solubilidad. Así, sólo una cantidad pequeña de proteínas plasmáticas es capaz de atravesar esta barrera. Quizás la diferencia más importante entre proteínas vítreas y séricas sea el alto contenido de glucoproteínas en el vítreo, ya que constituyen el 20% del total de proteínas no colágenas. Las glucoproteínas que contienen ácido siálico constituyen una fracción mucho mayor de las proteínas solubles en el vítreo que en el suero. Esto sugiere que los hialocitos sintetizan glucoproteínas que contienen ácido siálico. Sin embargo, todavía no se conoce con exactitud el papel de estas macromoléculas.

### Lípidos

El vítreo presenta una cantidad significativa de lípidos, fundamentalmente ácidos grasos, de los que un 55% son insaturados. La composición de fosfolípidos del vítreo es similar a la que presenta el cristalino. fosfatidilcolina (PC, phosphatidylcholine) y fosfatidiletanolamina (PE, phosphatidylethanolamine) aparecen como fosfolípidos mayoritarios, mientras que esfingomielina (SM, sphingomyelin), lisofosfatidilcolina (LPC, lysophosphatidylcholine), fosfatidilserina (PS, phosphatidylserine), fosfatidilinositol y ácido fosfatídico (PA, phosphatidic acid), aparecen como componentes minoritarios. La concentración de fosfolípidos es inferior a la sérica, lo que sugiere que la barrera hematóvítrea restringe el transporte de estas moléculas. Únicamente, la PE aparece en niveles superiores a los que presenta en el suero, lo que probablemente refleja una difusión directa desde la retina. Sin embargo, el papel de estas moléculas en el vítreo no ha sido descrito, únicamente se hace referencia a ellas como ejemplo de la funcionalidad de la barrera hematóvítrea (1).

## 2.- FISIOLÓGÍA Y FUNCIONES DEL VÍTREO

El vítreo desempeña un importante papel en la fisiología ocular. Así, participa en la oxigenación de los tejidos intraoculares, un aspecto especialmente importante en el metabolismo de la retina. Puede servir como almacén metabólico para la retina, en este aspecto el ácido hialurónico vítreo puede proporcionar un "blindaje aniónico" para la retina y cristalino. La prueba clínica que apoya este concepto viene dada por la existencia de muchas situaciones en las que alteraciones vítreas se asocian con opacidades del cristalino.

Aparte de su papel metabólico, el vítreo tiene como función primaria el permitir la libre transmisión de la luz a la retina por medio de un perfecto mantenimiento de la transparencia óptica. Para asegurar ésta, el vítreo debe servir también de barrera a la entrada de células y macromoléculas, como por medio del ácido hialurónico que puede actuar de barrera fisicoquímica. El fracaso en las funciones mencionadas puede dar lugar a la aparición de opacidades vítreas e invasión celular (2-4).

### 3.- RETINOPATÍA DIABÉTICA PROLIFERATIVA

Los procesos proliferativos a nivel del vítreo representan uno de los principales problemas clínicos de nuestros días. Así la retinopatía diabética proliferativa (PDR, proliferative diabetic retinopathy) es la principal causa de ceguera en los países desarrollados. Podemos definir la PDR como una alteración vascular y parenquimatosa secundaria que afecta al lecho vascular retiniano, constituyendo una de las cuatro causas más frecuentes de ceguera. La incidencia de la PDR se relaciona más con la duración de la diabetes que con ningún otro factor. Entre los diabéticos diagnosticados antes de los 30 años de edad, el 50% presentan PDR pasados 10 años, y el 90% pasados 30 años.

La retinopatía presenta características de oclusión microvascular y hemorragia realizada. Aunque la patogenia de la PDR es aún objeto de gran controversia su secuencia fisiopatológica puede resumirse como sigue:

- 1.- Engrosamiento de la membrana basal capilar.
- 2.- Lesión y proliferación de las células endoteliales capilares.
- 3.- Alteraciones de los hematíes que producen un transporte anómalo de oxígeno.
- 4.- Aumento de la adhesividad y agregación plaquetarias.

La consecuencia de estos cambios es la hipoxia retiniana, cuyas principales consecuencias van a ser la formación de comunicaciones arteriovenosas y la aparición de procesos de neovascularización.

Clínicamente, la PDR se puede clasificar en dos estadios:

- 1.- PDR de fondo o no proliferativa. Los cambios patológicos acontecen a nivel de los vasos sanguíneos retinianos.
- 2.- PDR proliferativa. Presencia de neovasos y/o tejido fibroso que, originándose desde la retina y el nervio óptico, se extienden en su superficie o hacia la cavidad vítrea (5). Las complicaciones más graves de la PDR se producen durante la fase proliferativa. Los nuevos vasos proliferan hacia la cara posterior del vítreo y se hacen prominentes cuando comienzan a retraerse alejándose de la retina. Estos lechos vasculares traccionan con fuerza la retina con contracción continua del vítreo, lo que induce al desprendimiento de la retina por tracción progresiva.

#### 4.- PAPEL DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LOS TRASTORNOS PROLIFERATIVOS A NIVEL VITREO

Pese a la larga y extensa investigación realizada, la fisiopatología de la PDR sigue siendo en la actualidad objeto de controversia ya que no se ha conseguido establecer con exactitud la secuencia de procesos bioquímicos implicados. Recientemente se ha propuesto como secuencia de acontecimientos: hiperglucemia → respuestas bioquímicas [pseudohipoxia hiperglucemia, proteína quinasa C (PKC) etc.] → pérdida de la capilaridad/hipoxia → entrada de factores de crecimiento/inactivación de la inhibición del crecimiento → remodelado tisular/angiogénesis → manifestaciones de complicaciones (6).

Los resultados de experimentos *in vivo* e *in vitro*, así como diversos estudios clínicos, sugieren que los factores de crecimiento peptídicos (GF, growth factors) desempeñan un papel importante en cada una de las etapas a través de acciones directas o indirectas (7-9). Estos GF pueden estimular la migración, mitosis y diferenciación de células endoteliales y retinianas e inducir la neovascularización. Se ha descrito, que la neovascularización está íntimamente relacionada con la hipoxia, que se ve activada, como consecuencia de la oclusión de la capilaridad de la retina, como en otras patologías oculares, induciendo una isquemia retiniana (6). En la fase de isquemia retiniana se activa la regulación de los niveles de los GF presentes en el vítreo, regulando la expresión génica de dichos factores, así como el influjo de proteínas séricas. Esta regulación induce un aumento en los niveles de diversos GF que activan la angiogénesis así como la reducción en los niveles de factores antiangiogénicos y como consecuencia se ve activada la neovascularización característica de la PDR (6). Los GF más relacionados con la PDR son: el factor de crecimiento fibroblástico (bFGF, fibroblast growth factor) (10-12), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, vascular endothelial growth factor) (13), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I, insulin-like growth factor), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF, platelet derived growth factor) (14), factor de crecimiento epidérmico (EGF, epidermal growth factor), factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ , tumour necrosis factor- $\alpha$ ) (15-17), factor de crecimiento hepático (HGF, hepatocyte growth factor) (18), y miembros de las familias de las interleuquinas. Sin embargo se observó una disminución de los niveles de los factores antiangiogénicos como es el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ) (19). En los últimos

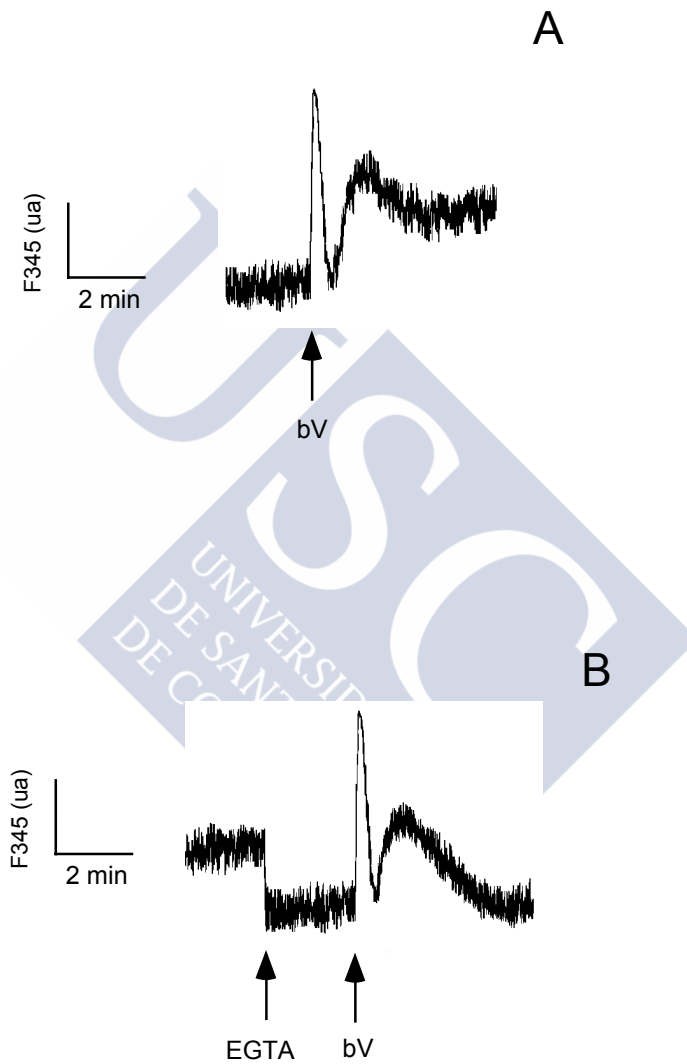
años se ha descrito la presencia de un factor denominado factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, pigment epithelium-derived factor), que se ha descrito que es un potente y efectivo inhibidor de la angiogénesis en modelos animales, cultivos celulares y en humanos (20). Se desconoce que relación existe entre los niveles de los GF y el desarrollo y progresión de la PDR, aunque en los últimos años se ha postulado que no existe un único factor responsable de estos procesos sino que es la presencia de concentraciones elevadas de uno o más factores de tipo proliferativo, o valores insuficientes de factores tipo inhibitorio, los que podrían romper el delicado balance de un medio inhibitorio conduciendolo a uno de tipo proliferativo, induciendo la neovascularización la cual no parece depender de la presencia o ausencia de un factor determinado sino del balance global de factores estimulatorios o inhibitorios (21). Todo parece indicar que los factores de crecimiento no tienen un papel clave en la iniciación de tales procesos, sino que posiblemente ejerzan un papel tardío en la secuencia temporal del desarrollo de la retinopatía diabética como una respuesta a las alteraciones avanzadas en el ojo.

En general la investigación en este campo, se ha centrado en el estudio de los factores de crecimiento que podríamos clasificar como “clásicos” sin considerar la posible implicación de factores intrínsecos, moléculas de bajo peso molecular que podrían estar operando en la iniciación y/o desarrollo de tales alteraciones. Es interesante señalar que estudios realizados acerca de las variaciones del contenido proteico en muestras de vítreos con desórdenes vitreoretinianos, muestran un aumento de las proteínas solubles respecto a muestras control, observando que la concentración de albúmina es tres veces mayor lo que supone también un aumento de los lípidos transportados (permeables a la barrera hematorretiniana) por esta proteína. En este sentido, se ha demostrado que el ácido lisofosfatídico (LPA) lípido mayoritario transportado por la albúmina del suero, ejerce un potente efecto mitogénico en células del epitelio pigmentario retiniano (RPE, retinal pigment epithelial) (22,23). Sin embargo, el papel que desempeñan los compuestos de bajo peso molecular, entre ellos los lípidos, en el vítreo y su relación con estas patologías aún no ha sido caracterizado en detalle.

## **5.- IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FACTORES LIPÍDICOS ACTIVADORES DE LA VÍA DEL CALCIO EN EL VÍTREO.**

En trabajos preliminares realizados por nuestro grupo de investigación, se detectó la presencia de un factor con potente actividad movilizadora de calcio intracelular en muestras de vítreo humano patológico obtenidas de vitrectomias realizadas en pacientes con PDR. En una primera aproximación se descartó que esta actividad fuese producida por alguno de los factores de crecimiento ya descritos en el vítreo. Se partió de la hipótesis inicial de que este factor fuese de naturaleza proteica, como ocurre para la mayoría de los factores de crecimiento; sin embargo, se pudo constatar que esta hipótesis inicial no era cierta. El comportamiento de este factor se aproximaba más al de un compuesto lipídico. Se describió la presencia de un lípido ligado a la albúmina con potente actividad movilizadora de calcio intracelular (24). Sin embargo, una de las principales limitaciones encontradas en el desarrollo de ese trabajo fue la escasa disponibilidad de muestras patológicas, limitación que viene determinada fundamentalmente por el uso de material quirúrgico. Ello obligó a iniciar simultáneamente trabajos con otros sistemas biológicos con objeto de identificar fuentes alternativas no sujetas a las limitaciones de cantidad de muestra. A partir de vítreo bovino (bV, bovine vitreous) disponible en grandes cantidades, se identificó un compuesto aparentemente similar al aislado a partir del vítreo humano patológico. Básicamente este abordaje se realizó con la finalidad de identificar compuestos similares y en cantidades suficientes para la caracterización química. En una primera aproximación se observó que la adición de homogeneizado de vítreo bovino (bV) a fibroblastos EGFR-T17, cargados con la sonda calcio selectiva fura-2, indujo un incremento bifásico de calcio intracelular caracterizado por un aumento rápido ( $< 1s$ ) y pasajero, que alcanzaba el máximo a los 1.5-2 min post-estimulación, con una posterior disminución suave sin retorno inmediato a los niveles basales de calcio (Figura 1A). En ausencia de calcio extracelular la muestra inducía un incremento bifásico en el que la primera fase no se vio afectada, seguida de una segunda fase que acabó retornando a los niveles basales del calcio (Figura 1B). Esto sugirió que la primera señal era debida exclusivamente a una redistribución de calcio a partir de depósitos intracelulares, mientras que la segunda señal era debida a redistribución intracelular y entrada de calcio del medio extracelular. Esta señal podía ser consecuencia de la acción de un sólo compuesto con acción bifásica en las que hay participación de los

depósitos intracelulares de calcio así como de calcio extracelular, como ocurre para factores como el EGF (25) o TRH (26), o bien debido a la presencia de dos o más sustancias que activen vías diferentes de señalización.



**Figura 1.- Registro de la movilización de calcio intracelular en células EGFRT-17.** A) La adición de un pequeño volumen (20  $\mu$ l) de bV indujo un pico inicial transitorio seguido de una segunda señal lenta con posterior disminución sin retorno al nivel basal. B) Cuando la estimulación se realizó en ausencia de calcio extracelular (por adición previa de EGTA, 4 mM final) se mantuvo el pico inicial mientras que la segunda señal retornó al nivel basal.

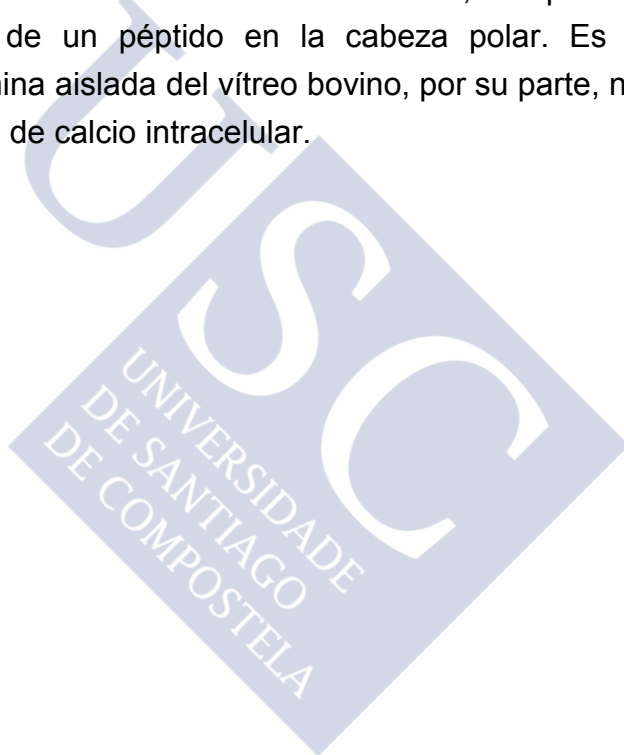
En una primera aproximación se analizó el papel de la PKC, enzima que desempeña un papel central en la regulación de muchas señales de transducción de diversos factores de crecimiento (27). La estimulación de PKC mediante pretratamiento de las células con éster de forbol (PMA, phorbol ester) (1  $\mu$ M, 5 min), abolió completamente la primera fase, mientras que la segunda permaneció prácticamente inalterada (Figura 2A). Se estudiaron también el tiempo de respuesta y la desensibilización cruzada con factores de crecimiento ya descritos en el vítreo (7,8,28) de los que únicamente el bFGF (bFGF, basic fibroblast growth factor), tras la administración sucesiva y consiguiente desensibilización de su receptor, fue capaz de abolir la segunda fase de respuesta de movimiento de calcio, permaneciendo inalterada la primera fase (Figura 2B). Además ni la señal inducida por el propio bFGF ni la segunda inducida por el vítreo fueron abolidas por la activación de la PKC (resultado no mostrado). Por otra parte tras la diálisis del bV, se pudo comprobar que sólo se recuperaba la segunda fase de la señal inicialmente inducida por el bV (Figura 2C). Cuando el homogeneizado de vítreo bovino fue fraccionado por precipitación con sulfato amónico (80% de saturación) la sustancia responsable de la primera fase de la señal de movilización de calcio fue recuperada en el sobrenadante, mientras que el factor responsable de la segunda fase de la señal se recuperó tras resuspender el precipitado en un tampón de Tris. Esto confirmó la hipótesis de que la señal bifásica de movilización de calcio, era inducida por dos sustancias de naturaleza bioquímica diferente. Tras la precipitación con disolventes orgánicos (metanol, etanol o cloroformo:metanol 1:2) sólo se recuperó la sustancia responsable de la primera señal en el sobrenadante. En general, estos datos indican que las dos señales inducidas por el vítreo bovino son independientes y causadas por sustancias de naturaleza diferente. La primera señal está mediada por una molécula de pequeño tamaño, de naturaleza aparentemente no proteica que se ha denominado bVLF (bovine vitreous lipid factor), mientras que la segunda señal está causada por una molécula perteneciente a la familia de los FGF (29).

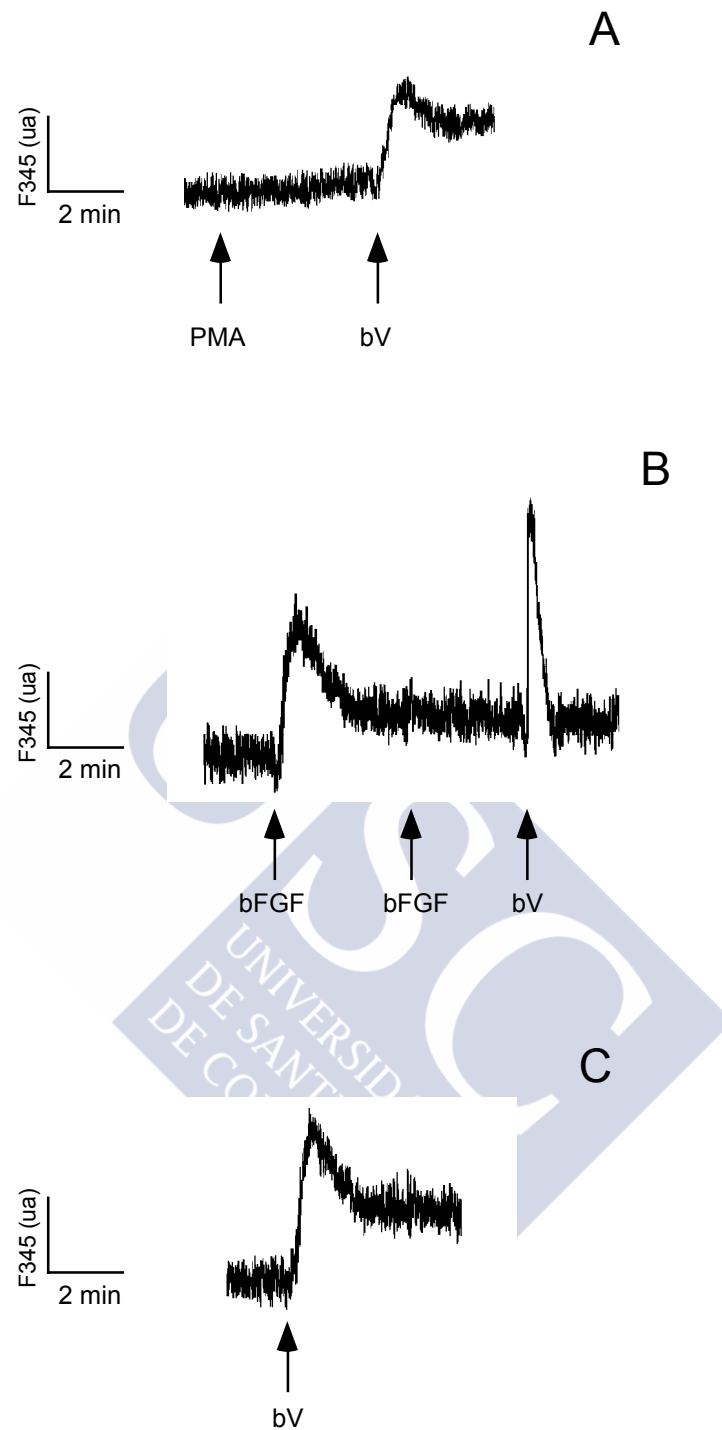
Se desarrollaron dos procesos de purificación independientes para el aislamiento y la caracterización de los factores responsables del incremento bifásico de calcio (24). El factor responsable de la segunda señal fue purificado por medio de dos pasos cromatográficos secuenciales: una cromatografía de intercambio catiónico (Sepharose Fast Flow S, FFS), seguido de una cromatografía de afinidad (Heparin-sepharose). Las fracciones bioactivas obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE, mostrando dos bandas de peso molecular entre 15 y 20 KDa que fueron reconocidas específicamente por anticuerpos anti-aFGF, pero no por anticuerpos anti-bFGF (Figura 3 columna derecha). Para el aislamiento del compuesto responsable de la primera señal de calcio inducida por el vítreo bovino, se partió del extracto lipídico obtenido tras la extracción con cloroformo: metanol (1:2, v/v), acondicionado mediante extracción en fase sólida (SPE-C18). El material obtenido fue fraccionado en una columna de adsorción de sílica, seguida de una cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-A25). La bioactividad recuperada en la fracción de los lípidos ácidos (LAc) fue acondicionada mediante una segunda SPE-C18 y finalmente purificada por HPLC en columna de gel de sílice en fase normal. El compuesto así obtenido corresponde al denominado como bVLF. En todos estos pasos la actividad fue seguida por la medición en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ . (Figura 3, columna izquierda).

En una primera aproximación, la naturaleza bioquímica del bVLF, se evaluó por digestión con un grupo de enzimas específicos. Se observó que ni la DNAsa ni la RNAsa afectaban apreciablemente a la bioactividad, lo que indicó que el compuesto no era un ácido nucleico. El tratamiento con fosfolipasa B provocaba una pérdida de un 85% de la bioactividad, mientras que la fosfolipasa C resultó en una pérdida del 95% de la bioactividad. Esto parecía sugerir que la sustancia era de naturaleza fosfolipídica, presentando cadenas acilo y una cabeza polar, ambas requeridas para su bioactividad. El tratamiento con fosfatasa alcalina eliminó la bioactividad, lo que mostraba una dependencia 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 parecía indicar la existencia de enlaces peptídicos en el compuesto. Esto sugería que el producto obtenido era un fosfolípido bioactivo con dos cadenas acilo, una cabeza polar con uniones peptídicas, y un grupo fosfato terminal como estructura mínima requerida para su actividad. Ante los datos obtenidos, todo parecía indicar una gran similitud

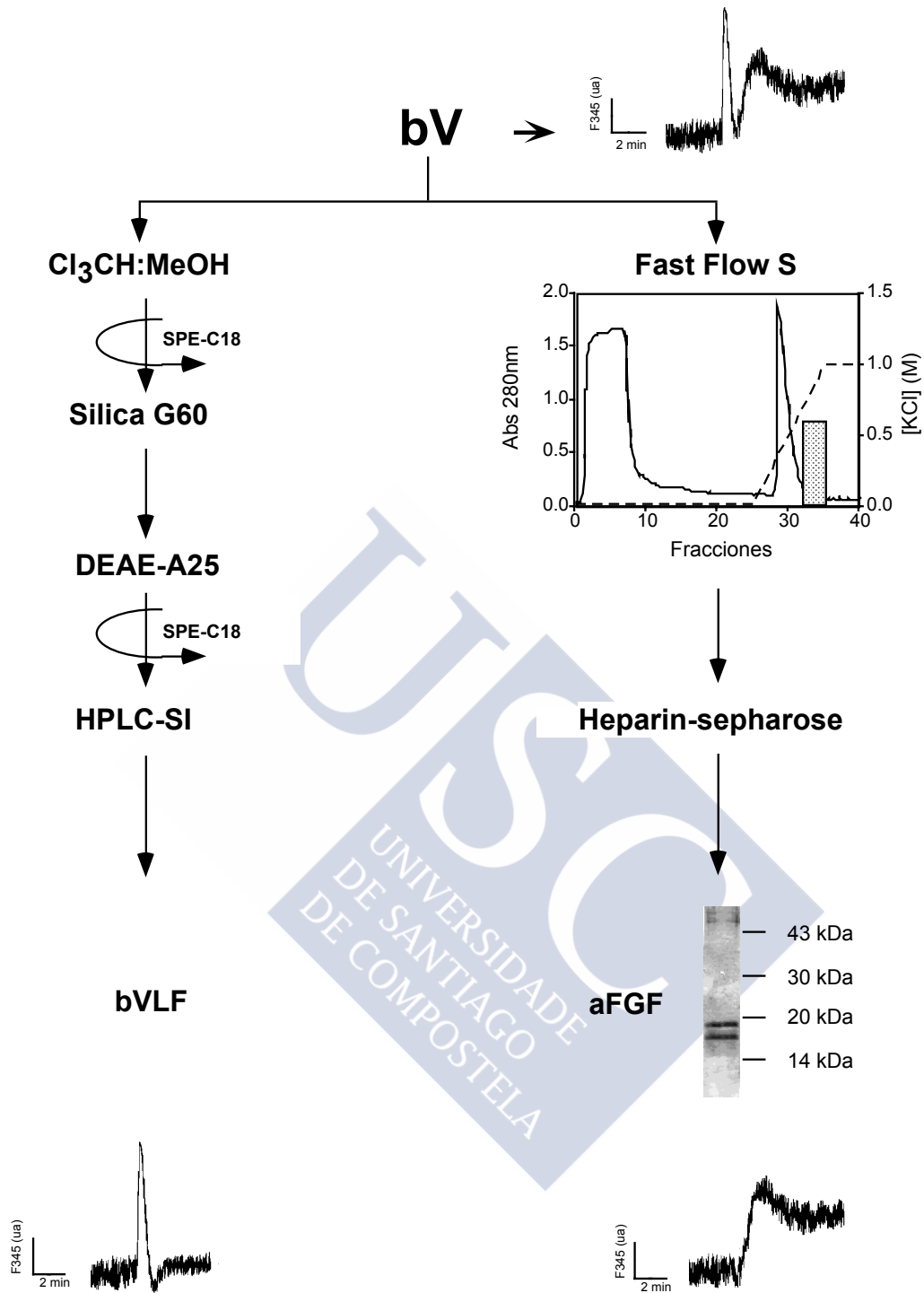
con los glicofosfatidilinositoles de anclaje de proteínas (GPI, glycosyl-phosphatidilinositol membrane anchors), compuestos que presentan en su estructura una cadena proteica o polipeptídica unida a etanolamina, que se liga a la proteína con su grupo carboxilo terminal y mediante un enlace fosfodiéster a la secuencia de azúcares, unida a su vez a un anillo de inositol que conecta mediante un enlace fosfodiéster a la secuencia de azúcares, unida a su vez a un anillo de inositol que conecta mediante un enlace fosfodiéster a la porción de diacilglicerol (30,31).

Los compuestos aislados del vítreo humano y del vítreo bovino mostraron cierta similitud estructural. La diferencia fundamental entre ambos era que el compuesto humano se presenta siempre ligado a la albúmina, mientras que el compuesto bovino está en forma libre, aunque todo parecía indicar la presencia de un péptido en la cabeza polar. Es importante destacar que la albúmina aislada del vítreo bovino, por su parte, no presentó actividad movilizadora de calcio intracelular.





**Figura 2.-** A) Respuesta de  $[Ca^{2+}]_i$  inducida por el bV después de la activación de la PKC por el tratamiento con PMA ( $1 \mu M$ , 5 min). B) La desensibilización homóloga de la señal de calcio del bFGF (10 nM) produjo desensibilización cruzada de la segunda señal inducida por bV, sin afectar de modo alguno a la primera señal de calcio. C) Tras la diálisis del bV sólo se recuperó la segunda señal de calcio.



**Figura 3.- Esquema completo de purificación de las sustancias responsables de las dos señales de calcio inducidas por el bV.** En la columna izquierda del esquema, se describe la purificación del factor lipídico bVLF, responsable de la primera señal de calcio: partiendo del extracto lipídico del bV, las etapas desarrolladas comprenden extracción en fase sólida (SPE-C18), cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice, cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-A25) y finalmente cromatografía en columna de gel de sílice por HPLC. En la columna derecha se detalla la purificación del factor proteico responsable de la segunda señal de calcio: tras el acondicionamiento del bV, las etapas de purificación desarrolladas comprenden una cromatografía de intercambio catiónico (Fast Flow S) seguido de una cromatografía de afinidad (Heparin Sepharose) y SDS-PAGE con tinción de plata.



## **Métodos**



## 1.- PROCESADO DE LAS MUESTRAS DE VÍTREO BOVINO.

Los ojos bovinos se obtuvieron de un matadero local, siendo inmediatamente transportados al laboratorio sobre hielo. Durante su procesamiento se mantuvieron a 4 °C. El humor vítreo se extrajo a través de una pequeña incisión lateral del globo ocular, por medio de una presión moderada. Los vítreos extraídos fueron homogeneizados haciéndolos pasar repetidas veces por una jeringuilla de 10 ml. El homogeneizado resultante fue centrifugado a 2000xg durante 30 min a 4 °C y a continuación fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

## 2.- PROCESO DE PURIFICACIÓN DEL FACTOR bVLF DEL VÍTREO BOVINO.

Para la purificación se diseñó un protocolo teniendo en cuenta la naturaleza aparentemente lipídica del factor bVLF. La Figura 4 muestra el esquema de purificación desarrollado. Así se partió de un volumen inicial de 1L de homogeneizado de vítreo bovino, del cual fueron extraídos los lípidos totales con cuatro volúmenes de cloroformo: metanol (1:2, v/v) a temperatura ambiente (24). El extracto se filtró con el fin de eliminar la mayor parte del material proteico desnaturalizado. Tras la filtración se concentró a sequedad, y seguidamente el extracto seco se redisolvió en metanol y se centrifugó. El precipitado proteico resultante se lavó dos veces con un volumen equivalente de metanol, con el fin de arrastrar todo material lipídico que pudiese quedar retenido.

La mezcla cruda de lípidos se disolvió en metanol:agua (1:1, v/v) y se aplicó a una columna de extracción en fase sólida Sep Pak-C18 (Waters) con la finalidad de eliminar las sales (24). La columna se prelavó con 10 volúmenes de cloroformo:metanol (1:1, v/v) tras lo que se equilibró con 10 volúmenes de agua. Tras el cargado de la muestra, la columna se lavó con 20 volúmenes de agua, eluyéndose finalmente la bioactividad con 10 volúmenes de cloroformo:metanol (1:1, v/v). El eluido de cloroformo:metanol fue fraccionado según su polaridad en una columna de gel de sílice (Sílica G-60, 230-400 mesh, Merck) equilibrada con 10 volúmenes de cloroformo. La muestra fue disuelta en cloroformo:metanol (7:3, v/v) y aplicada a la columna, que se desarrolló mediante un gradiente escalonado de polaridad:

- 1.- Cloroformo (5 volúmenes de columna)
- 2.- Cloroformo:metanol (4:1, v/v; 8 volúmenes de columna)
- 3.- Cloroformo:metanol (2:3, v/v; 8 volúmenes de columna)
- 4.- Metanol (10 volúmenes de columna).

La bioactividad fue recuperada en la fracción eluida con metanol, correspondiente a la fracción de lípidos de mayor polaridad.

El material eluido con metanol fue aplicado a una columna de intercambio aniónico DEAE-Sephadex A25 (14x1 cm, Sigma; forma acetato). La columna fue equilibrada con 10 volúmenes de columna de cloroformo:metanol:agua (30:60:8, v/v/v) y la muestra fue separada en dos fracciones:

- 1.- Lípidos neutros (LN), eluidos con 10 volúmenes de columna de la mezcla de equilibrado.
- 2.- Lípidos ácidos (LAc), eluidos con 10 volúmenes de columna de acetato sódico 100 mM en metanol.

La bioactividad, eluida en la fracción de lípidos ácidos, se cargó en una segunda columna Sep Pak-C18 (Waters) con la finalidad de eliminar el acetato sódico, siguiendo el mismo protocolo descrito para la primera Sep Pak-C18.

La última etapa de la purificación se realizó mediante HPLC en una columna de gel de sílice (3.9x300 mm  $\mu$ Porasil, Waters) que se desarrolló bajo condiciones de fase normal (24). Los eluyentes utilizados fueron:

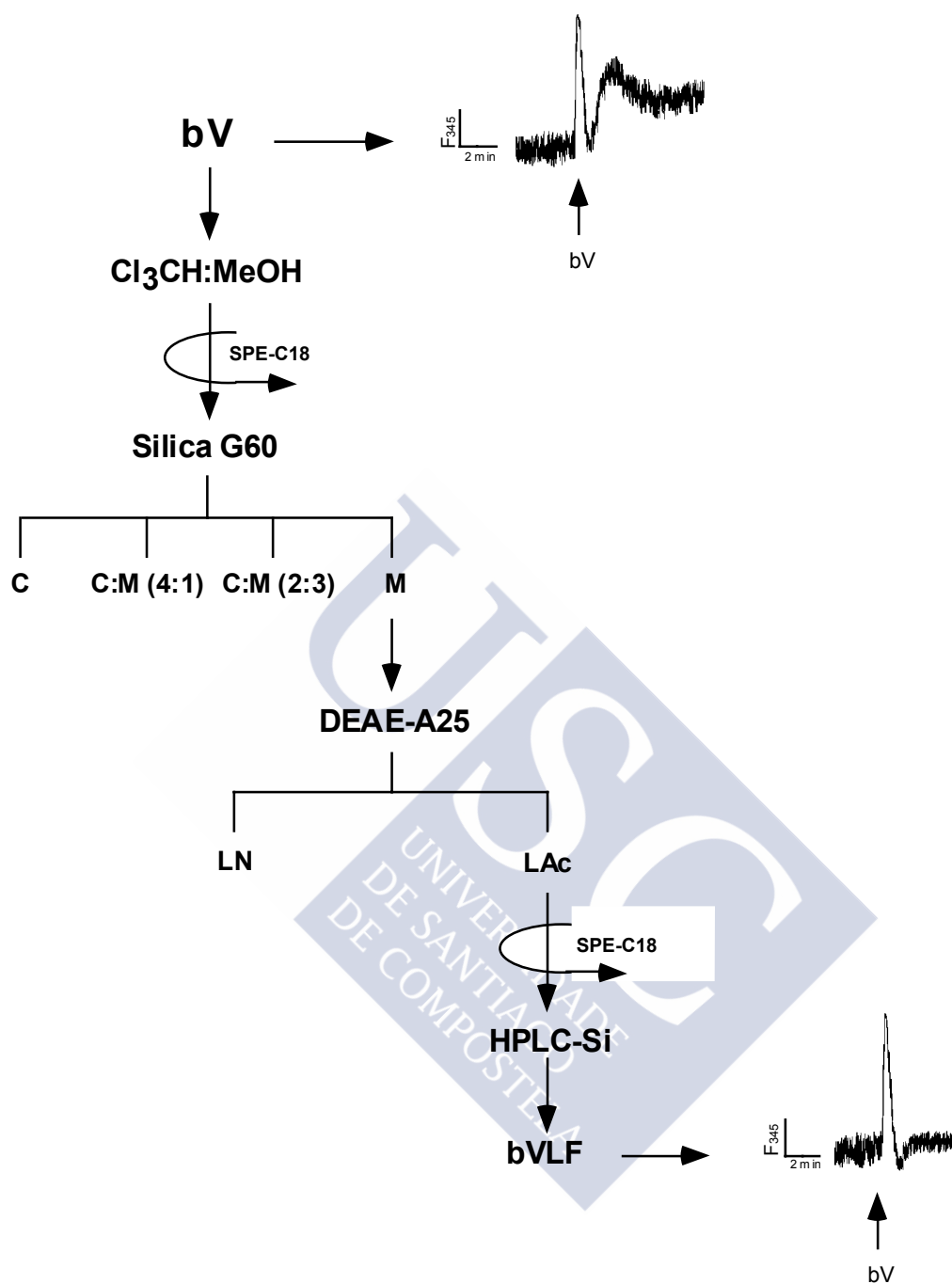
Mezcla A: isopropanol:hexano: H<sub>2</sub>O (11:8:1, v/v/v)

Mezcla B: isopropanol:hexano: H<sub>2</sub>O (11:5:4, v/v/v)

Mezcla C: isopropanol:hexano: H<sub>2</sub>O (12:0.1:7, v/v/v)

La muestra fue cargada y fraccionada bajo las siguientes condiciones: se comenzó con 100% de la mezcla A durante 5 min, seguido de un gradiente lineal de 0 a 100% de B durante 115 min pasando a un segundo régimen isocrático con 100% de C durante 10 min. El flujo utilizado durante todo el proceso cromatográfico fue de 0.5 ml/min con detección a 205 nm.

Para la evaluación de la capacidad movilizadora de calcio en las células EGFR-T17 se tomaron alícuotas de cada fracción y se evaporaron a sequedad, tras lo que se redisolvió el residuo en metanol.



**Figura 4.- Esquema de purificación del bVLF.** Para el aislamiento del bVLF responsable de la primera señal de calcio inducida por el vítreo bovino (bV), se partió del extracto lipídico obtenido tras la extracción con cloroformo:metanol (1:1,v/v), y posterior acondicionado mediante extracción en fase sólida (SPE-C18). El material obtenido fue fraccionado en una columna de adsorción de gel de sílice, seguida de una cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-A25). La bioactividad recuperada en la fracción de lípidos ácidos (LAc) fue acondicionada mediante una segunda SPE-C18 y finalmente purificada por HPLC en columna de gel de sílice. C: cloroformo; M: metanol; LN: lípidos neutros.

### **3.- ENSAYOS PARA LA DIFERENCIACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA DE UN GPI Y LA ESTRUCTURA DEL bVLF.**

#### **3.1.- Ensayos enzimáticos:**

Los diferentes ensayos se realizaron con el factor puro, según las condiciones óptimas de trabajo para cada enzima.

3.1.1.- Fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), (*Bacillus thuringiensis*, Oxford Glycosciences). Se utilizó 1 U/reacción en una disolución tampón de TRIS/HCL 100 mM (pH 7.4). El tiempo de reacción fue de 12 h a 37 °C con agitación constante.

3.1.2.- Fosfolipasa B (PLB), (*Vibrio especies*, EC 3.1.1.5, Sigma). Se utilizó 1 U/reacción en TRIS/HCL 25 mM (pH 8.0) suplementado con CaCl<sub>2</sub> 2 mM. El tiempo de reacción fue de 18 h a 37 °C con agitación constante.

Se realizaron ensayos control para cada enzima en las mismas condiciones pero con el enzima desnaturalizado por calor o bien trabajando con un pH opuesto al óptimo. La bioactividad de las muestras digeridas y las muestras control fueron evaluadas por su capacidad movilizadora de calcio intracelular.

#### **3.2.- Ensayos químicos:**

##### **3.2.1.- Hidrólisis alcalina (MAH)**

Las muestras fueron llevadas a sequedad y se redisolviéron en un volumen de una disolución de NaOH 0.6 N en MeOH. El tiempo de reacción fue 12 h a 37 °C, tras lo cual la muestra se llevó de nuevo a sequedad y el producto se redisolvió en metanol para evaluar la bioactividad mediante la capacidad de movilización de calcio intracelular. Se realizaron ensayos control bajo las mismas condiciones pero en ausencia de NaOH (32).

### 3.2.2.- Desaminación con ácido nitroso (HONO).

El bVLF puro fue llevado a sequedad y redisolto en 30  $\mu$ l de una disolución de acetato sódico 0.1 mM (pH 4.0) (NaCl 0.5 M como control negativo de la reacción), posteriormente se añadieron 30  $\mu$ l de una disolución de  $\text{NaNO}_2$  0.5 M recién preparado. El tiempo de reacción fue de 12 h a temperatura ambiente. La bioactividad de las muestras así como del control se evaluó en los ensayos de movilización de calcio intracelular (33).

## 4.- DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS FOSFATOS.

La determinación de los grupos fosfatos en el bVLF se realizó en base al método de Bartlett (34,35), al cual se le introdujeron una serie de modificaciones. Las muestras a análisis, el bVLF y los seis patrones, se llevaron a sequedad tras lo cual se les añadió 450  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (98%, v/v) dejándolos a 200-215  $^\circ\text{C}$  durante 25 min. Transcurrido este tiempo, los tubos se dejaron enfriar durante 5 min, tras lo que se añadieron 150  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para este caso el tiempo de reacción fue de 30 min a 200  $^\circ\text{C}$ , si transcurrido este tiempo no se observa una digestión completa de la muestra (fosfato orgánico a fosfato inorgánico) se puede prolongar esta etapa añadiendo 50  $\mu$ l adicionales de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Finalizada la digestión de cada muestra, se añadieron 3.9 ml de agua desionizada, 0.5 ml de molibdato amónico tetrahidratado 2.5% (p/v) y 0.5 ml de ácido ascórbico (10%, p/v). Las diferentes muestras fueron selladas y dejadas a 100  $^\circ\text{C}$  durante 7 min, tras lo que se realizó la medida espectrofotométrica a 820 nm. Los patrones de fósforo ( $\mu$ moles) o (blanco), 0.0325, 0.065, 0.114, 0.163 y 0.228, se prepararon a partir de una disolución de 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  disuelta en HCl 0.05 N.

## 5.- REVELANTES ESPECÍFICOS PARA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

El bVLF puro se fraccionó mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC gel de sílice, Merck) para lo cual se utilizó como eluyente una mezcla ternaria de cloroformo:metanol:cloruro cálcico acuoso

al 0.02% (5:4:1, v/v/v), y posteriormente se realizaron tinciones específicas con diferentes reactivos:

**5.1.- Ninhidrina: tinción de grupos aminos libres.**

Ninhidrina 0.2% en *n*-butanol/ácido acético (97:3, v/v) (36). El revelado se realizó por tratamiento de las HPTLC con la disolución indicada y posterior calentamiento.

**5.2.- Reactivo de Dragendorf: tinción de grupos colina.**

Condiciones: 5 ml de la disolución A + 20 ml de la disolución B + 75 ml de H<sub>2</sub>O.

Disolución A: yoduro potásico (KI) 40% (p/v). Disolución B: nitrato de bismuto 1.7% (p/v) en una disolución acuosa de ácido acético acético al 20% (v/v) (36). El revelado se realizó por tratamiento de la HPTLC con la disolución y posterior calentamiento (37).

**5.3.- Orcinol: tinción de azúcares.**

Orcinol 0.2% (p/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% (v/v) en etanol (37). El revelado se realizó por tratamiento de la HPTLC con la disolución y posterior calentamiento.

**5.4.- Resorcinol: tinción de gangliósidos.**

80 ml de la disolución C + 10 ml de disolución A llevando a un volumen final de 100ml con agua.

Disolución A: resorcinol 2% (p/v) en agua.

Disolución B: CuSO<sub>4</sub> 0.1 M en agua.

Disolución C: 80 ml HCl (37.5%) + 0.5 ml de la disolución B (37). Para este revelante fue necesario trabajar con cromatoplasmas de alta redispersión de gel de sílice sobre soporte de vidrio. Tras el tratamiento con la disolución, la capa fina fue cubierta con un vidrio y ambas fueron sujetas con pinzas. El revelado se consiguió tras el calentamiento de las placas a 200 °C durante 5-10 min.

**5.5.- Reactivo azul de molibdeno: tinción de los grupos fosfatos.**

Reactivo comercial: azul de molibdeno (Sigma). Para el revelado se sumergió la cromatoplasma en la disolución correspondiente dejándola a temperatura ambiente para su identificación.

**5.6.- Hidroxilamina: tinción de grupos éster.**

Se mezclan 100 ml de una disolución de hidrocloreuro de hidroxilamina al 10% (p/v) preparada en etanol al (75%, v/v) y 200 ml con una disolución de hidróxido sódico al 12% preparado en etanol (37).

**5.7.- Bencidina (*N,N,N',N'*-tetrametildibencidina): tinción de esfingolípidos.**

Disolución A: 50 ml de benceno + 5 ml de hipoclorito sódico + 5 ml de acético glacial. Disolución B: 0.2 g de *N,N,N',N'*-tetrametildibencidina + 1 cristal KI + 50 ml de  $\text{Cl}_3\text{CH}$ . Para el revelado se sumergió la cromatopla en la disolución A tras lo que se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 min y posterior calentamiento a 80 °C durante 15 min. Transcurrido este tiempo, la capa fina fue sumergida en la disolución B (37,38).

**6.- CARACTERÍSTICAS DEL CROMATOGRAFO DE GASES ACOPLADO A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS (GC/MS).**

Todos los análisis de GC/MS se realizaron utilizando un equipo Hewlett-Packard 5890-5972 con detector MSD (mass selective detector). El espectrómetro de masas utiliza una fuente de ionización por impacto electrónico (70 eV) con una fuente de temperatura de 150 °C y a una presión de  $2-4 \times 10^{-5}$  Torr. El Equipo del GC/MS dispone de un inyector *split/splitless*. En todos los casos la mayor presión alcanzada fue de 6 psi para conseguir un flujo del gas (helio) de aproximadamente 0.9 ml/min a través de una columna SGL-5 (5% difenilmetilsilicona) de 30 m x 0.25 mm.

**7.- ANÁLISIS DE MONOSACÁRIDOS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS (GC/MS).**

Las reacciones se realizaron en capilares de vidrio (capilares SMI tamaño J con banda amarilla) sellados en uno de sus extremos y previamente lavados, bien por tratamiento con ácidos o bien por tratamiento a altas temperaturas (3 h a 500 °C). Los patrones de azúcares utilizados fueron: L-fucosa (Sigma), D,L-xilosa (Sigma), L-manosa (Sigma), D-galactosa (Sigma), D-glucosa (Sigma), *N*-acetil-d-glucosamina (Sigma), *N*-acetil-d-galactosamina (Sigma) y NANA (Sigma). En cada ensayo se

analizaron: a) mezcla de patrones (80 nmoles totales); y, b) bVLF (200 µg/ml). En todos los ensayos se utilizó el *scillo*-inositol (80 nmoles) como control interno. Las muestras se llevaron a sequedad realizando sucesivos lavados/secados con 50 µl de metanol para eliminar el agua presente. Tras el último lavado, se añadieron 50 µl de una disolución de HCL 0.5 M en MeOH (Supelco) y los tubos de reacción fueron cerrados a vacío y calentados durante 16 h a 85 °C. Transcurrido este tiempo, los tubos fueron abiertos practicando un pequeño corte en uno de sus extremos, añadiéndoles 10 µl de piridina para neutralizar el HCl. Posteriormente se añadieron 10 µl de anhídrido acético para *N*-acetilar cualquier amina primaria libre (30 min a temperatura ambiente) y, finalmente las muestras fueron concentradas en el Speed-Vac, tras lo cual se realizaron sucesivos lavados/secados con 20 µl de metanol

Los derivados trimetilsililo (TMS) se obtuvieron tras la adición de 30 µl de una mezcla de piridina: hexametildisilazano: trimetilclorosilano (10:3:1, v/v/v). Las condiciones de reacción fueron 30 min a 80 °C, previamente los tubos habían sido sellados a vacío.

Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (iones característicos *m/z* 204 y 217 para azúcares neutros; *m/z* 173 para *N*-acetil hexosaminas; *m/z* 198 para el ácido siálico y *m/z* 305 y 318 para el *scillo*-inositol) utilizando el programa de azúcares. Las inyecciones fueron de 1 µl de la muestra ya derivatizada.

*Programa para azúcares:* la temperatura inicial 160 °C se mantuvo durante 3 min. Posteriormente se aplicó una rampa de temperaturas de 2 °C/min, hasta alcanzar una temperatura de 200 °C tras lo cual se continuó con una segunda rampa de 10 °C/min hasta alcanzar 260 °C. La temperatura final se mantuvo durante 20 min (39).

## 8.- ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR GC/MS.

El análisis de los ácidos grasos se realizó en base a la formación de los correspondientes ésteres metílicos (FAMEs, fatty acid methyl ester). Los patrones utilizados fueron ésteres metílicos de: decanoico (C10:0); dodecanoico (C12:0), tetradecanoico (C14:0), hexadecanoico (C16:0) (C16:9), octadecanoico (C18:0), (C18:10,13), (C18:9), (C18:7); ecosanoico (C20:0), docosanoico (C22:0) (C22:13), tetracosanoico (C24:0), (Supelco).

En cada ensayo se analizaron; a) mezcla de patrones; y, b) bVLF (200 µg/ml). En todos los ensayos se utilizó el ácido heptadecanoico como

patrón interno (6 nmoles). Se utilizaron tubos capilares para las reacciones previas al análisis por cromatografía (ver análisis de azúcares para su preparación). Las muestras fueron llevadas a sequedad realizando sucesivos lavados con 50  $\mu$ l de MeOH para eliminar completamente el agua presente. A cada tubo de reacción se añadieron 50  $\mu$ l de HCL 0.5 M en MeOH (Supelco), tras lo cual los tubos fueron sellados a vacío y mantenidos a 80 °C durante 16 h. Para la extracción de los componentes FAMES, se añadió 1 volumen de hexano a cada tubo a analizar. Tras agitación y posterior separación de las fases, la fase se concentra a sequedad y se redissuelve 30  $\mu$ l de hexano.

Las muestras fueron analizadas en GC/MS, (iones característicos para los ácidos grasos en el espectrómetro de masas m/z 74 y 87) utilizando el programa de ácidos grasos. Las inyecciones fueron de 1  $\mu$ l de la muestra.

*Programa para ácidos grasos:* el programa comenzó con una temperatura inicial de 40 °C que se mantuvo durante 2 min, seguido de una rampa de temperaturas de 2 °C/min, hasta una temperatura de 250 °C manteniéndose esta durante 15 min (40).

## 9.- ANÁLISIS DE BASES ESFINGOIDES POR GC/MS.

El análisis de las bases esfingoides se realizó en base a la formación de los derivados trimetilsililo. Para ello las reacciones se realizaron en tubos de ensayo. Los patrones utilizados fueron: fitoesfingosina (Sigma), D-esfingosina (Sigma), dihidroesfingosina (Sigma). En cada ensayo se analizaron: a) mezcla de patrones (80 nmoles); y, b) bVLF (200  $\mu$ g/ml). En todos los ensayos se utilizó el 1-palmitoil-glicerol (80 nmoles) como control interno. Las muestras se llevaron a sequedad y mediante sucesivos lavados (4-5) con 50  $\mu$ l de MeOH se eliminó completamente el agua presente y tras el último lavado se añadieron 50  $\mu$ l de HCL 0.5 M en MeOH (Supelco). Cada tubo de reacción fue sellado a vacío y posteriormente mantenido a 80 °C durante 18 h. Transcurrido este tiempo el pH de cada tubo fue ajustado a 11 con una disolución de NaOH 1 M. Las bases esfingoides fueron extraídas con dietil éter (2 vol). Tras la concentración a sequedad se añadieron 100  $\mu$ l de MeOH, 10  $\mu$ l de piridina y 10  $\mu$ l de anhídrido acético. Los tubos se mantuvieron durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron llevadas a sequedad y derivatizadas añadiendo 5  $\mu$ l de

una mezcla de piridina: hexametildisilazano: trimetilclorosilano, 10:3:1, v/v/v) (41). Las muestras fueron analizadas por GC/MS utilizando el programa de bases esfingoides, con un volumen de inyección de muestra de 1 µl. *Programa para bases esfingoides*: se aplicó una temperatura inicial de 140 °C tras lo cual se aplicó una rampa de temperatura de 4 °C/min, hasta alcanzar una temperatura de 320 °C que se mantuvo durante 10 min (39).

## 10.- CUANTIFICACIÓN DE LOS AZÚCARES, ÁCIDOS GRASOS Y BASES ESFINGOIDES.

El procedimiento permite la detección simultánea de los azúcares, ácidos grasos y bases esfingoides, presentes en la muestra teniendo en cuenta que la cuantificación se realiza en relación a los patrones internos utilizados: *scillo*-inositol (80 nmoles) para los azúcares, ácido heptadecanoico (6 nmoles) para los ácidos grasos y palmitoil glicerol (80 nmoles) para las bases esfingoides. Primeramente se realiza una integración de los picos de los patrones con respecto al área del pico del patrón interno, correspondiente, para obteniendo así el factor de respuesta molar relativa (MRRF). Se obtiene así los nmoles para cada componente a analizar (42).

$$MRRF_{\text{azúcar, ácido graso y base esfingoide (patrones)}} = \frac{\text{área del pico de interés (patrón)}}{\text{área del pico del patrón interno}}$$

$$M = \frac{\text{área del pico de interés (muestra a estudio)}}{\text{área del pico del patrón interno}} \times \frac{\text{nmol}}{MRRF}$$

## 11.- CULTIVOS CELULARES

### 11.1.- Fibroblastos EGFR-T17

La mayoría de los experimentos de identificación y seguimiento de la bioactividad durante los procesos de purificación fueron realizados en células EGFR-T17 (43,44). Esta línea celular fue obtenida mediante transfección del cDNA para el receptor de EGF humano a fibroblastos de

ratón de la línea NIH 3T3FR. El clon obtenido presenta unos 400.000 receptores/célula frente a unos 10.000 receptores/célula para la línea parental. Los fibroblastos EGFR-T17 se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 4.5 g/l de glucosa, suplementado con bicarbonato sódico (3.7 g/l), L-glutamina (2 mM), piruvato sódico (1 mM), penicilina (100 U/ml), estreptomocina (100 µg/ml) y suero fetal de ternera (10%, v/v), sobre placas de petri desechables de 100 mm de diámetro, hasta alcanzar una confluencia en torno al 90%, momento en el cual se subcultivaron. Para ello, las monocapas se lavaron dos veces con 2 ml de una disolución salina libre de calcio y magnesio (disolución I de Ham sin glucosa, conteniendo en mM: KCl, 3; NaCl, 122; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; HEPES, 30; pH 7.6, ajustado con NaOH 1M) (45), con objeto de eliminar los iones divalentes y las proteínas séricas que puedan inhibir la acción de la tripsina. A continuación, se añadieron a cada placa 2 ml de la misma disolución suplementada con EDTA (0.9 mM) y tripsina (0.05%, p/v), que son retirados tras un breve tiempo de contacto con las células. Al cabo de 5 minutos se aprecia el despegamiento de la monocapa, recogándose las células en medio de cultivo completo, tras los que se sembraron en una relación 1:5 a 1:20, dependiendo del experimento.

Los cultivos fueron mantenidos en condiciones estériles a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> con autocalibrado periódico (HERAEUS), bajo una atmósfera humidificada (95% de saturación) de 5% de CO<sub>2</sub> / 95% aire.

### **11.2.- Cultivo primario de células del epitelio pigmentario retiniano humano (hRPE, human retinal pigment epithelial).**

Los cultivos celulares de hRPE se realizaron a partir de globos oculares de donantes del banco de ojos y de autopsias del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. No se aceptaron aquellos casos en los que se demostró una serología positiva para el virus de la hepatitis o inmunodeficiencia humana, así como los casos con patología o cirugía previa. El tiempo transcurrido entre la muerte del paciente y la realización del cultivo celular nunca fue superior a 6 h. El cultivo celular se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar vertical bajo condiciones estériles. La técnica general de cultivo se llevó a cabo según el protocolo desarrollado por López et al (46), con pequeñas modificaciones. Se realizó un lavado de los globos enucleados, que seguidamente fueron fijados practicándoseles una incisión que permitió la extracción del segmento

anterior del ojo, extrayendo el vítreo con la ayuda de pinzas y tijeras. La retina se desprendió mecánicamente y se seccionó a nivel de la papila, realizando la extracción de las células del epitelio pigmentario mediante un método enzimático, utilizando una disolución de tripsina-EDTA. Así obtuvimos el despegamiento de las células y finalmente la suspensión celular fue recogida añadiendosele un volumen equivalente de medio de cultivo (47). Las hRPE se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 4.5 g/l de glucosa, suplementado con bicarbonato sódico (3.7 g/l), L-glutamina (2 mM), piruvato sódico (1 mM) penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y suero fetal de ternera (10% v/v), sobre placas de petri desechables de 100 mm de diámetro, hasta alcanzar una confluencia en torno al 90%, momento en el cual se subcultivaron. Para ello, las monocapas se lavaron dos veces con 2 ml de una disolución salina libre de calcio y magnesio [disolución I de Ham sin glucosa, conteniendo en mM: KCl, 3; NaCl, 122; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; HEPES, 30; pH 7.6, ajustado con NaOH 1M (45)], con objeto de eliminar los iones divalentes y las proteínas séricas que puedan inhibir la acción de la tripsina. A continuación, se añadieron a cada placa 2 ml de la misma disolución suplementada con EDTA (0.9 mM) y tripsina (0.05%, p/v), que fueron retirados tras un breve tiempo de contacto con las células. Al cabo de 5 min se apreció el despegamiento de la monocapa, recogiendo las células en medio de cultivo completo, tras el que se sembraron en una relación 1:5 a 1:20, dependiendo del experimento. Se realizaron ensayos para garantizar la pureza de los cultivos e identificación de las células hRPE, para ello se utilizaron dos metodologías:

- identificación morfológica: presencia de morfología epitelioide y la presencia de gránulos de pigmento en el citoplasma.
- identificación inmunocitoquímica (48).

Los cultivos fueron mantenidos en condiciones estériles a 37 °C en un incubador de CO<sub>2</sub> con autocalibrado periódico (HERAEUS), bajo una atmósfera humidificada (95% de saturación) de 5% de CO<sub>2</sub> / 95% aire.

## 12.- MEDICIONES DE CALCIO INTRACELULAR

Las mediciones de calcio intracelular en tiempo real se realizaron sobre suspensiones celulares mediante la sonda calcio selectiva fura 2 (47). Estas suspensiones fueron preparadas en tampón Krebs-Ringer-HEPES

(KRH, 0.5 ml por placa resuspendida), con la siguiente composición en mM: NaCl, 125; KCl, 5; MgSO<sub>4</sub> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; CaCl<sub>2</sub>, 2; glucosa, 6; HEPES, 25; pH 7.4, ajustado con NaOH 1M, obteniendo una concentración aproximada de 5x10<sup>6</sup> células/ml. Una vez obtenida la suspensión celular, se procedió al cargado con fura 2, para lo que se incubaron las células durante 30 min a temperatura ambiente con fura 2 penta-acetoximetiléster (fura 2 A/M) con una concentración final de 3 µM. El fura 2 A/M se añadió a partir de una disolución 1 mM en DMSO. Tras el cargado con la sonda, la suspensión celular se diluyó 1:4 con KRH y se mantuvo a temperatura ambiente. Para cada medición de calcio intracelular, se centrifugó 1 ml de la suspensión a 15000xg durante 5 segundos, el pellet resultante se lavó dos veces con KRH, tras lo que se resuspendió en un volumen final de 2 ml que fueron transferidos a una cubeta termostatizada (37±1 °C), dotada de un sistema de agitación magnética. Las mediciones se realizaron en presencia de un inhibidor de transporte iónico, sulfpirazona 100 µM, que permite minimizar la pérdida de fura 2 por las células. Las mediciones fluorimétricas se realizaron en un espectrómetrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B. Las longitudes de onda utilizadas fueron 345 nm (excitación) y 490 nm (emisión).

Al final de cada medición se realizó la calibración de la señal fluorescente (49). En cualquier muestra, la intensidad de la fluorescencia depende de las concentraciones del indicador y del calcio, así como de la constante de disociación del complejo fura 2-calcio. En la cubeta del fluorímetro la concentración del indicador puede ser calculada midiendo directamente la fluorescencia mínima ( $F_{\min}$ ) y la fluorescencia máxima ( $F_{\max}$ ), que se corresponden, respectivamente, a la fluorescencia del fura 2 en medio sin calcio, y en presencia de concentraciones saturantes de calcio. La  $K_d$  ha sido medida experimentalmente en un medio que imita al intracelular de los linfocitos y su valor es de 225 nM a 37 °C. Inicialmente se añadió EGTA a la cubeta (20 µl de una disolución 3 M, 30 mM final) de forma que el pH subiese hasta aproximadamente 8.0, con el fin de incrementar la afinidad del EGTA por el calcio. De esta forma, al eliminar el calcio extracelular, es posible valorar para su posterior sustracción la fluorescencia debida a la pequeña cantidad de fura 2 que habitualmente se halla presente fuera de las células. Para calcular la fluorescencia mínima se añadió a continuación Triton X-100 (20 µl de una disolución al 10% (v/v), 0.1% final) para provocar la lisis celular y la consiguiente liberación del fura 2 presente en el citoplasma. El exceso de EGTA presente en el medio desplaza al calcio unido al fura 2, con lo que la señal fluorescente decae rápidamente hasta su

valor mínimo. La adición de  $\text{CaCl}_2$  (20  $\mu\text{l}$  de una disolución 0.4 M, 4 mM final) produce la saturación del indicador, obteniéndose la lectura de la fluorescencia máxima.

El cálculo de la concentración intracelular de calcio se realizó en base a la siguiente ecuación:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (F_{345} - F_{\min} / F_{\max} - F_{345})$$

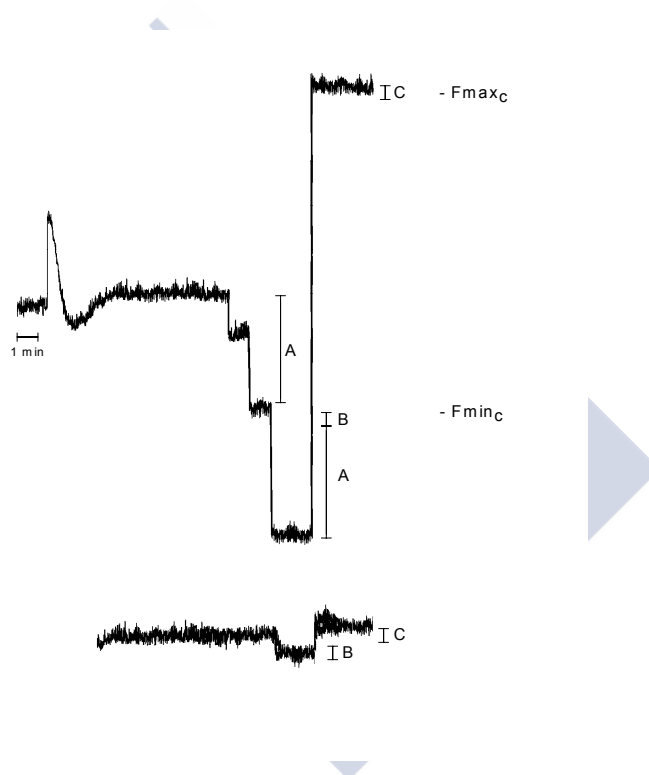
En la que  $F_{345}$  es la fluorescencia a 345 nm en un momento dado,  $F_{\min}$  es la fluorescencia del fura 2 libre,  $F_{\max}$  es la fluorescencia del indicador saturado con calcio y  $K_d$  es la constante de disociación para la interacción fura 2-calcio.

En algunos experimentos, los valores de calcio se obtuvieron mediante el cálculo de la relación  $F_{345}/F_{380}$ , método que no requiere la destrucción de la muestra para la calibración de la señal, y lo que es más importante, método en el cual las fluorescencias inespecíficas a 345 y 380 nm tienden a anularse entre sí, por lo que se obtienen mediciones muy fiables. Se utilizaron para ello dos tipos de programas, uno de ellos que controla los monocromadores del espectrómetrofluorímetro, alternando la longitud de onda de excitación entre 345 y 380 nm; el otro utiliza una rueda de dos filtros uno de 345 y otro de 380 nm (Fast Filter, Perkin Elmer) situado a la salida del haz del monocromador de excitación, girando a una velocidad constante durante el experimento. En cualquiera de los dos sistemas, los datos son recogidos en un ordenador que calcula la relación  $F_{345}/F_{380}$  y se obtiene a partir de este cociente una representación gráfica de las variaciones de calcio, en base a la siguiente ecuación:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (R - R_{\min} / R_{\max} - R) S_{f380} / S_{b380}$$

En la que  $R$  es la relación  $F_{345}/F_{380}$  en un momento dado;  $R_{\min}$  es la relación cuando el fura está desprovisto de calcio,  $R_{\max}$  es el valor de  $F_{345}/F_{380}$  cuando el fura 2 está saturado de calcio,  $K_d$  es la constante de disociación para la interacción fura 2-calcio (225 nM), y  $S_{f380}/S_{b380}$  es un parámetro que relaciona las fluorescencias a 380 nm del fura 2 en ausencia y en presencia de calcio. Los valores de  $R_{\max}$ ,  $R_{\min}$  y  $S_{f380}/S_{b380}$  deben ser determinados experimentalmente, para lo cual el programa incorpora una rutina de calibración previa al experimento. En esta rutina, se introducen en primer lugar en la cubeta una alícuota de células que no habían sido

cargadas con fura 2, de modo que se registrasen valores de autofluorescencia a 345 y 380 nm. Esta alícuota se sustituye por otra igual cargada con el indicador fluorescente, y a la que se añadió, secuencialmente, EGTA (4 mM final), TRIS (30 mM final), Triton X-100 (0.1% v/v final), y  $\text{CaCl}_2$  (4 mM final). Una vez recogidos los valores de fluorescencia tras la adición, se calcularon  $R_{\min}$  ( $F_{345}/F_{380}$  tras EGTA, TRIS y Triton),  $R_{\max}$  ( $F_{345}/F_{380}$  tras  $\text{CaCl}_2$ ) y  $Sf_{380}/Sb_{380}$  ( $F_{380}$  tras EGTA, TRIS y Triton, dividido por  $F_{380}$  tras  $\text{CaCl}_2$ ).



**Figura 5.-** Calibración de los registros de calcio intracelular. Al terminar el experimento, se añaden secuencialmente a la cubeta EGTA (4 mM final) y TRIS (30 mM), con el fin de eliminar la fluorescencia debida al fura 2 presente en el exterior celular (A). Seguidamente se añade Triton X-100 (0.1% final, v/v) con el fin de lisar las células y obtener la lectura de la fluorescencia mínima. Por último, se añade  $\text{CaCl}_2$  (4 mM final) para saturar el indicador y obtener la lectura de la fluorescencia máxima. La autofluorescencia se corrige utilizando una alícuota de células que no ha sido cargada con el indicador, y a la que se añaden las mismas disoluciones de calibración (trazado inferior). El Triton X-100 causa una pequeña disminución en la autofluorescencia (B), en tanto que el  $\text{CaCl}_2$  causa un aumento (C). La fluorescencia mínima corregida ( $F_{\min c}$ ) será entonces igual a  $F_{\min} + A + B$ , y la fluorescencia máxima corregida ( $F_{\max c}$ ) igual a  $F_{\max} - C$ .

### 13.- MEDICIONES DE CALCIO EXTRACELULAR

Para la medición fluorimétrica de calcio extracelular, se centrifugó la suspensión celular en KRH (1 ml/placa cultivo) a 15000xg durante 5 segundos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado tres veces con una disolución tampón de efflux, compuesta (en mM) por: NaCl, 145; KCl, 5; glucosa, 10; HEPES, 10 (pH 7.4), ajustado con NaOH 1M. Tras el último lavado, el pellet fue resuspendido en 2 ml de la disolución tampón de efflux y el Fura 2 (sal penta potásica) fue añadido a una concentración final de 0.25-0.5  $\mu$ M. La suspensión final fue transferida a una cubeta termostatzada ( $37\pm 1$  °C), dotada con sistema de agitación magnética. Con el fin de prevenir la lisis celular se añadió  $MgCl_2$  (0.1 mM final), y finalmente, EGTA (7.5  $\mu$ M final). Las mediciones se realizaron en un espectrómetrofluorímetro Perkin-Elmer LS 5B con longitud de onda de excitación 345 nm de emisión 490 nm. La calibración de las señales obtenidas se realizó en base a la estimación de la fluorescencia mínima ( $F_{min}$ ) y la fluorescencia máxima ( $F_{max}$ ), que se corresponden, respectivamente, a la fluorescencia del Fura 2 en medio sin calcio, y en presencia de concentraciones saturantes de calcio, tomando como valor de  $K_d$  225 nM. Inicialmente se añadió  $CaCl_2$  (20  $\mu$ l de una disolución 0.4 M, 4 mM final) produciendo la saturación del indicador, obteniéndose la lectura de la fluorescencia máxima ( $F_{max}$ ). Para la estimación de la fluorescencia mínima ( $F_{min}$ ) se añadió EGTA (20  $\mu$ l de una disolución 3 M, 30 mM final ) de forma que el pH subiese hasta aproximadamente 8.0, con el fin de incrementar la afinidad del EGTA por el calcio. El exceso de EGTA presente en el medio desplaza el calcio unido al Fura 2, con lo que la señal fluorescente decayó rápidamente hasta su valor mínimo. El cálculo de la concentración extracelular de calcio se realizó en base a la misma ecuación utilizada para la estimación de calcio intracelular.

### 14.- MEDICIÓN DE LA GENERACIÓN INTRACELULAR DE INOSITOLFOSFATOS

Para la medición de los inositolfosfatos generados, se sembraron las células en placas de 6 pocillos, y se cultivaron hasta obtener una confluencia de aproximadamente un 70% en DMEM completo. El marcaje con *mio*-[2- $^3$ H]-inositol se realizó incubando las monocapas durante 48 h en un medio

compuesto de DMEM (1 vol) y de medio basal Eagle (BME) sin inositol (3 vol), suplementado con un 10% de suero fetal de ternera dializado (utilizando membrana de diálisis con un punto de corte 12-14 KDa) contra PBS y 2-5  $\mu\text{Ci/ml}$  de *mio*-[2- $^3\text{H}$ ] inositol. Este medio presenta una baja concentración final de inositol frío (10 mM).

Tras 24 h de marcaje, el medio de incubación se retiró y las células fueron preincubadas durante 5 minutos a 37 °C con KRH suplementado con LiCl 10 mM (50). Tras aspirar el medio de marcaje de las placas de cultivo, las células se incubaron durante 20 minutos a 37 °C con KRH + LiCl (control) o KRH + LiCl + estímulo. Tras decantar el medio de incubación, se añadieron 2 ml/pocillo de TCA al 10% frío (4 °C), manteniendo las placas sobre hielo durante 30 min. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos y se lavaron cinco veces con 2 ml de éter dietílico, descartando en cada lavado la fase orgánica. Tras el último lavado, las muestras se llevaron a pH alcalino mediante la adición de 50  $\mu\text{l}$  de TRIS 3 M (26,51).

Las muestras fueron cargadas en columnas de 1 ml de resina de intercambio aniónico (Dowex 1-X8, 200-400 mesh, formiato como contraión) preequilibrada con agua. Tras el cargado de las muestras, se realizó un primer lavado con agua (10 vol) seguido de un segundo lavado con ocho volúmenes de tetraborato disódico 5 mM / formiato sódico 60 mM para eluir el glicerofosfoinositol. Los inositolfosfatos se eluyeron con 3 volúmenes de ácido fórmico 0.1 M / formiato amónico 1M. De cada fracción obtenida se transfirieron 2.5 ml a tubos de centelleo de 20 ml, se diluyó cada muestra con 1 ml de agua y se añadieron 15 ml de líquido de centelleo (HiSafe 3, LKB). Las muestras fueron cuantificadas mediante contador  $\beta$ .

## 15.- MEDICIÓN DE LA GENERACION INTRACELULAR DE ÁCIDO FOSFATÍDICO

Para la estimación del ácido fosfatídico (PA, phosphatidic acid) generado, se sembraron las células EGFR-T17 en placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta obtener una confluencia del 100% en DMEM completo. El marcaje con ácido [ $^3\text{H}$ ]-mirístico se llevó a cabo incubando las monocapas durante 48 h en medio DMEM suplementado con 0.25% de suero fetal de ternera y 2  $\mu\text{Ci/ml}$  de ácido [ $^3\text{H}$ ]-mirístico. Tras el tiempo de marcaje, el medio de incubación se retiró y las células fueron lavadas tres veces con KRH e incubadas en dicho medio durante 1 h a 37 °C con KRH. Tras aspirar

el medio las células fueron incubadas con KRH + vehículo (MeOH) o KRH + bVLF durante los tiempos de estudio. Después de aspirar los medios de incubación, se añadieron 2 ml de MeOH frío (4 °C), manteniendo las placas sobre hielo durante 30 min. Los extractos de metanol fueron transferidos a tubos de vidrio, a los que se añadieron 30 µg de los siguientes patrones: DAG, PA y fosfatidilcolina (PC) (patrones internos). A cada tubo se añadió 2 volúmenes de Cl<sub>3</sub>CH y 0.2 volúmenes de HCl 0.1 N (52). Tras la agitación y posterior separación de las fases, la fase acuosa fue descartada y la fase orgánica fue concentrada a sequedad. Los extractos fueron disueltos en 20-40 µl de MeOH. El material extraído se fraccionó mediante cromatografía en capa fina (TLC) de gel de sílice (200x200x0.5 mm, Merck) para lo que se utilizó como eluyente la fase inferior de una mezcla cuaternaria de acetato de etilo: isooctano: ácido acético: agua (13:2:3:10, v/v/v/v) (53,54). Tras el desarrollo cromatográfico e identificación de las bandas por tinción con yodo, los R<sub>f</sub> para PA, PC y DAG fueron 0.27, 0.00 y 1.0 respectivamente. Las zonas correspondientes al PA fueron rascadas de las placas y transferidas a tubos de centelleo y a los que se añadieron 2 ml de líquido de centelleo (Hisafe 3, LKB). Las muestras fueron cuantificadas mediante contador β

## **16.- MEDICIÓN DE LA GENERACION INTRACELULAR DE DIACILGLICEROL.**

Para estimar la generación de diacilglicerol (DAG), se sembraron las células EGFR-T17 en placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta obtener una confluencia del 100% en DMEM completo. Posteriormente se marcaron las células con 2 µCi/ml de ácido [<sup>3</sup>H]-mirístico en DMEM suplementado con FBS 0.25% (v/v). Transcurridas 48 h de marcaje, el medio fue retirado, lavándose las monocapas tres veces con KRH e incubadas en dicho medio durante 1 h a 37 °C con KRH. Los medios de las placas de cultivo fueron aspirados y las células se incubaron con KRH + vehículo (MeOH) o KRH + bVLF durante 10, 20, 40 y 60 segundos. Tras aspirar los medios de incubación, se añadieron 2 ml de MeOH frío (4 °C), manteniendo las placas sobre hielo durante 30 min. Los extractos de metanol fueron transferidos a tubos de vidrio, a los que se añadieron 30 µg de los siguientes patrones: DAG, y ácido oleico. A cada tubo se le añadieron dos volúmenes de Cl<sub>3</sub>CH y 0.2 volúmenes de HCl 0.1 N (52). Tras la agitación y posterior separación de

las fases, la fase acuosa fue descartada y la fase orgánica fue concentrada a sequedad. Los extractos fueron redisueltos en 20-40  $\mu\text{l}$  de MeOH. El material extraído se fraccionó mediante cromatografía en capa fina (TLC) de gel de sílice (200x200x0.5 mm, Merck) para lo que se utilizó como eluyente la fase inferior de una mezcla ternaria de hexano: dietileter: ácido fórmico (70:30:1.5, v/v/v) (54). Tras el desarrollo cromatográfico e identificación de las bandas por tinción con yodo, los  $R_f$  para el ácido oleico y el dioleilglicerol fueron 0.5 y 0.225 respectivamente. Las zonas correspondientes al DAG fueron rascadas de las placas y transferidas a tubos de centelleo y a los que se añadieron 2 ml de líquido de centelleo (Hisafe 3, LKB). Las muestras fueron cuantificadas mediante contador  $\beta$ .

#### **17.- ESTIMACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA FOSFOLIPASA D INTRACELULAR.**

Para estimar la activación de la fosfolipasa D (PLD), se sembraron las células EGFR-T17 en placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta obtener una confluencia del 100% en DMEM completo. Posteriormente se marcaron las células con 2  $\mu\text{Ci/ml}$  de ácido [ $^3\text{H}$ ]-mirístico en DMEM suplementado con FBS 0.25% (v/v). Después de 48 h de incubación, el medio de incubación fue retirado y las células fueron lavadas, tres veces, con KRH e incubadas en dicho medio durante 20 min a 37 °C con KRH + butanol 0.3% (v/v). El medio de las placas de cultivo fue aspirado y la monocapa de células fue incubada con KRH + butanol 0.3% (v/v) (control) o KRH + butanol 0.3% (v/v) + estímulos (bVLF o LPA) durante 1 h a 37 °C. Tras aspirar los medios de incubación, se añadieron 2 ml de MeOH frío (4 °C), manteniendo las placas sobre hielo durante 30 min. Los extractos de metanol fueron transferidos a tubos de vidrio y se añadieron 2 ml  $\text{Cl}_3\text{CH}$  + 600  $\mu\text{l}$  de HCl 0.1 N. Tras la agitación y centrifugación de las muestras se descartó la fase acuosa y la fase orgánica fue llevada a sequedad. Una vez concentradas los extractos fueron redisueltos en 30  $\mu\text{l}$   $\text{Cl}_3\text{CH}:\text{MeOH}$  (1:1, v/v). El material extraído se fraccionó mediante cromatografía en capa fina (TLC) de gel de sílice (200x200x0.5 mm, Merck) para lo que se utilizó como eluyente la fase superior de una mezcla cuaternaria de acetato de etilo: *isooctano*: acético: agua (13:2:3:10, v/v/v/v). Como patrones se añadieron fosfatidilbutanol (PBuOH, phosphatidylbutanol) y el PA. Tras el desarrollo cromatográfico e identificación de las bandas por tinción con yodo, las zonas de interés,

correspondientes al fosfatidilbutanol ( $R_f = 0.45-0.50$ ) fueron rascadas de las placas y transferidas a tubos de centelleo a los que se añadieron 2 ml de líquido de centelleo (Hisafe 3, LKB). Las muestras fueron cuantificadas mediante contador  $\beta$

## 18.- MEDICIONES DE cAMP INTRACELULAR

Para determinar el contenido del cAMP intracelular se utilizó el bioensayo comercial de Amersham Pharmacia Biotech, el cual se basa en la competición entre el cAMP y  $[8-^3\text{H}]$  cAMP. Las células fueron cultivadas en placas petri de 60 mm durante 2-3 días, tras lo cual se resuspendieron en DMEM sin suero (1.5 ml/placa;  $5-6 \times 10^5$  células por alícuota) y posteriormente se incubaron durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$  con 3-isobutil-1-metilxantina 1 mM (IBMX; Sigma) para prevenir la degradación enzimática del cAMP. Transcurrido este tiempo las células fueron estimuladas en DMEM libre de suero en presencia de IBMX (1 mM) con los siguientes estímulos: bVLF, LPA y forskolina. Después de 30 min de incubación a  $37^\circ\text{C}$  se retiró el medio y las células fueron lisadas con una disolución tampón de EDTA 4 mM / TRIS 50 mM, (pH 7.5) a una temperatura de  $100^\circ\text{C}$ . Los diferentes lisados fueron centrifugados recogiendo los sobrenadantes para su posterior análisis siguiendo las instrucciones del bioensayo comercial.

## 19.- DETERMINACIÓN DE LAS VARIACIONES DEL pH intracelular (pHi).

Las mediciones del pH intracelular en tiempo real se realizaron sobre suspensiones celulares, mediante la sonda denominada 2',7'-bis(carboxietil)-5(6')-carboxifluoresceína-acetoximetil-éster (BCECF/AM). Esta sonda atraviesa fácilmente la membrana celular de forma que en el interior celular es hidrolizada por esterasas inespecíficas pasando a la forma ácido, BCECF, el cual es fluorescente y sensible a los cambios de pH intracelular (55,56). Para cada ensayo se utilizaron 7-10 placas petri de 100 mm de diámetro, de cultivos de EGFR-T17 con una confluencia aproximada del 80%. El medio de cultivo fue aspirado, las células fueron lavadas con Ham-I y se tripsinizaron en presencia de EDTA. Tras retirar la disolución de tripsina, las células se resuspendieron en KRH obteniendo una concentración aproximada de  $5 \times 10^6$  células/ml. Una vez obtenida la

suspensión celular, se procedió al cargado con BCECF/AM 2  $\mu\text{M}$ , para lo cual se incubaron las células durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para determinar las variaciones de pH intracelular, inducidas por los diferentes estímulos, las células con la sonda BCECF fueron resuspendidas en tampón umbreit (en mM:  $\text{MgSO}_4$ , 1.2;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.2;  $\text{NaHCO}_3$ , 22.85;  $\text{KCl}$ , 5.94;  $\text{CaCl}_2$ , 1;  $\text{NaCl}$ , 119). Para cada medición se centrifugó 1 ml de la suspensión a 15000xg durante 5 seg. El pellet resultante se resuspendió en un volumen final de 2 ml que fueron transferidos a una cubeta termostatizada (57).

Previo a cada experimento se realizaron una serie de ensayos con el fin de obtener la recta de calibrado que permitirá la transformación de los datos de fluorescencia en valores de pH (58). Para ello se separaron cuatro muestras resuspendiendo las células cargadas con el marcador en un medio carente de  $\text{Na}^+$  y rico en  $\text{K}^+$  que se denomina tampón de calibrado [en mM  $\text{KCl}$ , 143;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.8;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2;  $\text{CaCl}_2$ , 1;  $\text{MgCl}_2$ , 1; HEPES 10, (59)], de forma que obtengamos cinco valores de pH conocidos (6.5, 7.0, 7.5, 8.0) dentro de un rango fisiológico. Para igualar el pH intracelular con el extracelular utilizamos nigericina (25  $\mu\text{M}$  final), un ionóforo que induce intercambios de  $\text{K}^+$  e  $\text{H}^+$ , de tal forma que se igualan las concentraciones intra y extracelular de  $\text{H}^+$  (la disolución rica en  $\text{K}^+$  evita las oscilaciones del pH).

La lectura de fluorescencia se realizó en un espectrómetrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B. Las longitudes de onda de excitación utilizadas fueron 490 nm y 440 nm y la longitud de onda de emisión de 530 nm.

## 20.- MEDIDA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA CON BIS-OXONOL

La medida del potencial de membrana ( $V_m$ ) con el indicador fluorescente bis-oxonol se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita previamente por Pandiella et al (60,61). Para la realización de estos experimentos se prepararon las suspensiones celulares de la misma forma que en el caso de las mediciones de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Las células se lavaron con KRH y se resuspendieron en la misma disolución tampón (2 ml/placa). Para las mediciones se tomaron alícuotas de 1 ml, que se centrifugaron a 15000xg durante 5 segundos. El pellet resultante se resuspendió en 2 ml de KRH, transfiriéndose las células a la cubeta. Seguidamente se añadió el bis-oxonol a la suspensión (100 nM) final, a partir de una disolución en DMSO

anhidro concentrada 1.000 veces (esta disolución madre se conserva en las mismas condiciones que las del fura 2 A/M), y se equilibraron las células con el indicador fluorescente durante 10 min. La lectura se realizó a una longitud de onda de excitación de 540 nm, y a una longitud de onda de emisión de 580 nm. Con este indicador fluorescente, la hiperpolarización de la membrana resulta en una deflexión hacia abajo en el trazado, en tanto que la despolarización induce un aumento de los valores de fluorescencia. Como aproximación para la calibración de la señal, se utiliza la gramicidina (1  $\mu$ M) al final de cada experimento, ello permitió establecer una escala en unidades arbitrarias respecto a este ionóforo.

## 21.- ENSAYOS DE ELECTROFISIOLOGÍA

Para la realización de estos ensayos las células fueron cultivadas sobre placas de vidrio de 35 mm de diámetro. Las células fueron estudiadas mediante la técnica denominada *whole cell patch-clamp* (62,63). En los experimentos de *patch clamp* se utilizaron: células aisladas, pequeños agregados celulares y monocapas confluentes y subconfluentes. Para la realización de los ensayos, el medio extracelular se reemplazó por una disolución tamponada EDS (en mM: Na Cl, 154; KCl, 4; CaCl<sub>2</sub>, 2; MgCl<sub>2</sub>, 1; glucosa, 5.5; Hepes-NaOH, 5; pH 7.4). Este cambio se realizó de 10-20 min antes del estudio.

Las pipetas utilizadas para los experimentos de *whole cell patch-clamp* se obtuvieron a partir de capilares de borosilicato, obtenidas en dos pasos: estiramiento de los capilares tras someterlos a calor, y posterior rotura de dichos capilares para obtener así puntas que presenten una fracción de micrómetro. Las micropipetas se rellenaron con una disolución tamponada intracelular ICS (en mM: KCl, 133; MgCl<sub>2</sub>, 3; GTP, 4; EGTA, 0.1; Hepes-KOH, 5; pH 7.3) y mostrando una resistencia de 3-6 M $\Omega$ . En determinados experimentos se reemplazaron el KCl y el KOH equimolarmente por CsCl y CsOH respectivamente. El potencial de membrana y las corriente fueron determinadas por medio de un amplificador *Patch Clamp-7-EPC* (List Electronics; Darmstadt, Germany). Los protocolos de *current* y *voltage-clamp* así como la adquisición de datos se realizaron usando software pClamp (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) en combinación con una interfase. Los registros de corriente fueron filtrados a 10 KHz y recopilados en el disco duro para su posterior análisis.

## 22.- DETERMINACIÓN DE LA COMUNICACIÓN INTERCELULAR A TRAVÉS DE LAS UNIONES gap POR MEDIDAS DE CAPACITANCIA.

Para estudiar el efecto del bVLF y su implicación en la regulación de las comunicaciones intercelulares, como son las uniones gap, se utilizó la técnica denominada *single electrode voltage-clamp*, las respuestas fueron medidas en pulsos, como se ha descrito previamente en detalle (64). De forma resumida, el registro del potencial de membrana fue interrumpido brevemente, cambiando a modo *voltage-clamp* aplicando pulsos 10 mV durante 200 milisegundos desde un potencial mantenido a -30 mV. La corriente transitoria obtenida representa la carga de la célula ligada a la pipeta y las células que la rodean. Esto fue analizado para obtener el pico inicial de la corriente,  $I_{pk}$ , y la corriente uniforme fina,  $I_{ss}$ . La ecuación utilizada para la estimación de la conductancia de las uniones gap,  $G_{01}$ , entre la célula acoplada a la pipeta (#0) y el resto de la monocapa de células que la rodean (#1) fue:

$$G_{01x} = I_{ss} \cdot G_{ser} / (I_{pk} - I_{ss})$$

Donde  $G_{01x}$  es el valor infraestimado de  $G_{01}$ , siendo  $G_{01x} = 1 / (R_{01} + R_{1x})$  con  $R_{01} = 1 / G_{01}$  y  $R_{1x}$  la resistencia de salida de la monocapa desde el anillo 1 (la primera hilera de células que rodea a la célula ligada a la pipeta) a tierra.  $G_{ser}$  es la conductancia ( $I_{pk} / 10$  mV) entre la pipeta y el interior de la célula #0, e  $I_{pk}$  es el pico de la corriente pasajera después de la cancelación de la corriente capacitativa rápida que carga la capacitancia de la pipeta (63).

## 23.- PROLIFERACIÓN CELULAR

### 23.1.- Recuento celular

Los ensayos de proliferación se realizaron en la línea celular EGFR-T17 y en el cultivo primario de células hRPE (células del epitelio pigmentario retiniano humano)

### **23.1.1.- Células EGFR-T17**

Las células EGFR-T17 se sembraron en placas de 24 pocillos (15.000 células/pocillo), 500 µl/pocillo de medio completo (DMEM + FBS 10%, v/v), hasta alcanzar una confluencia entorno al 50-60%. Posteriormente las células se serodeprivaron con DMEM + FBS 0.5% (v/v) durante 24 h tras lo cual se estimularon. Los estímulos fueron aplicados bajo las mismas condiciones de serodeprivación y por triplicado. Las células fueron incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h, tras lo que se realizó el recuento celular. Para ello, las células se recogieron por tripsinización, contándose alícuotas de cada placa en un contador automático Coulter Counter ZM tras la dilución con Isotón-II.

### **23.1.2.- Células hRPE**

Las células hRPE se sembraron en placas de 24 pocillos (30.000 células/pocillo), 500 µl/pocillo de medio completo (DMEM + FBS 10%), hasta alcanzar una confluencia entorno al 50-60%. Posteriormente las células se serodeprivaron con DMEM + 0% FBS durante 24 h tras lo cual se estimularon. Los estímulos fueron aplicados bajo las mismas condiciones de serodeprivación y por triplicado. Las células fueron incubadas a 37 °C en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 y 6 días, tras lo que se realizó el recuento celular, para ello las células se recogieron por tripsinización, contándose alícuotas de cada placa en un contador automático Coulter Counter ZM tras dilución con Isotón-II.

### **23.2.- Incorporación de BrdU**

Se determinó la proliferación celular de los cultivos mediante un bioensayo no radiactivo (Roche), basado en la incorporación de 5-bromo-2'-desoxi-uridina (BrdU) (65). Las células que incorporan BrdU a su DNA (las proliferantes), son detectadas mediante el uso de un anticuerpo monoclonal contra esa sustancia, y cuantificada gracias a una enzima peroxidasa que en presencia de su sustrato da lugar a un producto coloreado. Para ello se sembraron las células en placas de 96 pocillos [2000 células/pocillo, 200 µl/pocillo DMEM +FBS 10% (v/v)]. Transcurridas 48 h de cultivo, las células fueron serodeprivadas (DMEM + 0.5% v/v) y posteriormente estimuladas.

Transcurrido 42h postestímulo, se añadió a las células 10 µl/pocillo de BrdU, disolución de marcaje durante 6 h. Se aspiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con 200 µl por pocillo del medio completo. Tras la incorporación de la BrdU se fijaron las células durante 30 min a -20 °C con 200 µl de disolución de fijado. La disolución de fijado fue retirada y las células fueron lavadas 3 veces con medio completo, digiriendo parcialmente el ADN con 100 µl de disolución de nucleasas durante 30 min a 37 °C. Tras aspirar esta disolución y lavar las células con medio completo se añadieron 100 µl de disolución de anticuerpo contra la BrdU, marcado con peroxidasa (Anti BrdU-POD), durante 30 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo el anticuerpo fue aspirado y las células lavadas 3 veces con tampón de lavado 1, seguido de la incubación con 100 µl de sustrato de peroxidasa. La incorporación de BrdU se detectó en un lector de ELISA (modelo 550 Microplate Reader. BioRad. Hercules, California, USA) usando un filtro de lectura a 405 nm y como referencia un filtro de lectura a 490 nm.

## **24.- VIABILIDAD CELULAR**

Para estos experimentos, se utilizó el bioensayo (Boehringer Mannheim Biochemica) que se basa en un método colorimétrico que utiliza el reactivo Bromuro 3-[4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil]-2,5-difenil-2H tetrazolio (MTT). Las células EGFR-T17 fueron sembradas en placas de 96 pocillos [4.000 células /pocillo en 200 µl/pocillo de DMEM + FBS 10% (v/v)]. Tras la completa adhesión, las células fueron serodeprivadas (DMEM + FBS 0.5%, v/v) durante 24 h, posteriormente fueron estimuladas con el bVLF (5 y 10 µg/mL). Transcurridas 48 h, las células se marcaron con MTT (0.5 mg/ml) e incubadas durante 4 h a 37 °C en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>. Tras esta incubación, se añadió 0.1 ml de la disolución solubilizante [SDS, 10% (p/v) en HCL 10 mM]. Por último, se midió la absorbancia de cada muestra usando un lector de microplacas a una longitud de onda de 550 nm.

## **25.- APOPTOSIS Y NECROSIS CELULAR**

Para la evaluación de la apoptosis celular se utilizó el bioensayo de anexina V (Boehringer Mannheim). Las células EGFR-T17 sembradas en placas de 6 pocillos, fueron incubadas con DMEM + FBS 10% (v/v) a 37 °C

en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h. Transcurrido este tiempo, las células fueron serodeprivadas 24 h con DMEM + FBS 0.5% (v/v) y posteriormente tratadas con bVLF y los respectivos controles durante 12, 24 y 48 h. Tras la tripsinización de las células, éstas fueron centrifugadas durante 5 min. El pellet resultante fue resuspendido en 100 µl de la disolución de marcaje [prediluir 20 µl del reactivo de marcaje Anexina-V-FLUOS en una disolución de yoduro de propidio (20 µl de una disolución de 50 µl /ml) en 100 µl de Hepes], incubando durante 10-15 min. A continuación se añadieron 0.4 ml del tampón de incubación (Hepes/NaOH 10 mM a pH 7.4; NaCl, 140 mM; CaCl<sub>2</sub>, 5 mM.) manteniéndose protegidas de la luz hasta el posterior análisis en el citómetro de flujo, trabajando con una longitud de onda de de excitación 488 nm (FACScalibur tour colors, Beckton-Dickinson, San José, CA, USA).

## 26.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EE. Las diferencias entre las medias fueron evaluadas por ANOVA. El método PLSD se utilizó para determinar las diferencias específicas entre las medias representativas según ANOVA (ANalysis Of VAriance between groups) (\*p<0.05).



## **Resultados**





*Caracterización de la estructura del bVLF*



En trabajos preliminares, nuestro grupo detectó la presencia de un factor con potente actividad movilizadora de calcio intracelular en células EGFR-T17, presente en muestras de vítreo humano obtenidas de pacientes con PDR. Se partió de la hipótesis inicial de que el factor responsable de esta actividad fuese de naturaleza polipeptídica o proteica, como ocurre para la mayoría de los factores de crecimiento clásicos. Sin embargo, se pudo constatar que la hipótesis de partida no era cierta, a raíz de una serie de datos experimentales, que mostraban que este factor era un compuesto de naturaleza lipídica, sin aunque, ligado a la albúmina. Una de las principales limitaciones encontradas fue la escasa cantidad de material de partida disponible para abordar una caracterización completa del compuesto. Esta limitación viene fundamentalmente impuesta por el uso de muestras quirúrgicas, nunca disponibles en cantidades suficientes. Para solventar en lo posible la escasez de muestras se realizaron trabajos con otros sistemas biológicos con el fin de identificar fuentes alternativas. Así a partir de muestras de vítreo bovino se consiguió purificar y caracterizar un lípido con características similares al descrito en muestras humanas que se utilizó como modelo experimental. Básicamente se optó por este abordaje por dos razones, la primera, identificar sustancias de naturaleza similar a la descrita en muestras de vítreo humano, y la segunda, poder obtener cantidades importantes de este factor para la caracterización química y biológica.

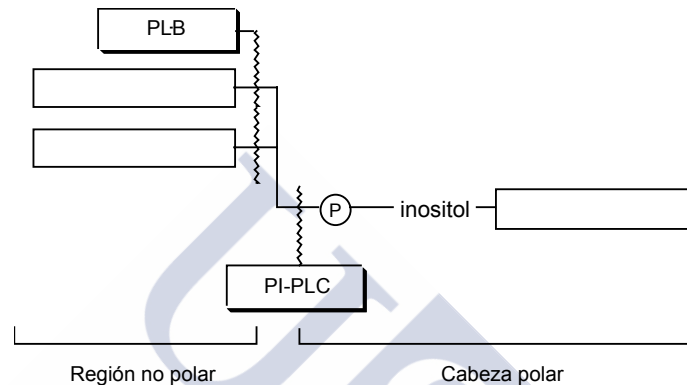
A diferencia del vítreo humano, el vítreo bovino induce una respuesta dual de movilización de calcio intracelular, pudiéndose comprobar que esta respuesta era debida a la acción de al menos dos sustancias de naturaleza diferente: la primera señal de calcio era producida por una sustancia de naturaleza aparentemente lipídica, seguida de una segunda señal que era inducida por un compuesto de naturaleza protéica. La purificación de estas dos sustancias se realizó de una forma independiente. Para el caso de la sustancia responsable de la segunda señal, el proceso de purificación, permitió la identificación de las isoformas de aFGF, uno de los factores de crecimiento descritos clásicamente en el vítreo. Por lo que nuestra atención se centró en el aislamiento de la sustancia responsable de la primera señal, la cual mostraba una gran similitud en cuanto a dinámica de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  al factor bioactivo 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 en gel de sílice, cromatografía de intercambio aniónico, nueva extracción en fase sólida y, finalmente, HPLC con columna de gel de sílice. La cantidad de

etapas que fueron necesarias, dan una idea de la complejidad de la muestra de partida. El compuesto bioactivo obtenido tras el HPLC aparece como un único pico, compuesto que se denominó bVLF (bovine vitreous lipid factor).

Los primeros estudios de caracterización bioquímica (24) parecían indicar que el bVLF era un compuesto de naturaleza fosfolipídica, ya que el tratamiento con la fosfolipasa B y la fosfatasa alcalina resultó en una pérdida total de la bioactividad de la muestra, lo que sugería que ésta dependía de la presencia de cadenas acilo y de grupo(s) fosfato(s) terminal(es), además el hecho de que la bioactividad se perdiese tras el tratamiento con pronasa y proteinasa K, parecían indicar la existencia de enlaces peptídicos en el compuesto. Ante los datos enzimáticos que se obtuvieron, todo parecía indicar que el bVLF presentaba una gran similitud composicional con los glicofosfatidilinositales de anclaje de proteínas (GPI, glycosyl-phosphatidilinositol), compuestos que presentan una estructura base de:  $\text{Man-}\alpha 1\text{-4 GlcNH}_2\text{-}\alpha 1,6 \text{ mio-inositol-1-PO}_4\text{-lípido}$ . La familia de los GPI puede ser dividida en dos grupos basados en la homología estructural y en su funcionalidad. El primer grupo corresponde al anclaje de proteínas a la membrana a través de un enlace al extremo C terminal de una amplia variedad de proteínas de membrana. El segundo grupo corresponde a estructuras que se encuentran en protozoos (30). Como punto de partida, se optó por confirmar la naturaleza del bVLF, para ello seleccionamos una serie de ensayos claves en base al tratamiento con la PI-PLC o PLB así como ensayos de hidrólisis alcalina y desaminación con ácido nitroso.

## 1.- CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA Y QUÍMICA DEL bVLF, DIFERENCIACIÓN DE LOS GPI.

El factor bVLF (bovine vitreous lipid factor) obtenido tras la purificación, previamente descrita, se sometió a digestión enzimática bajo condiciones controladas utilizando la PLB (fosfolipasa B) y la PI-PLC (fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina).

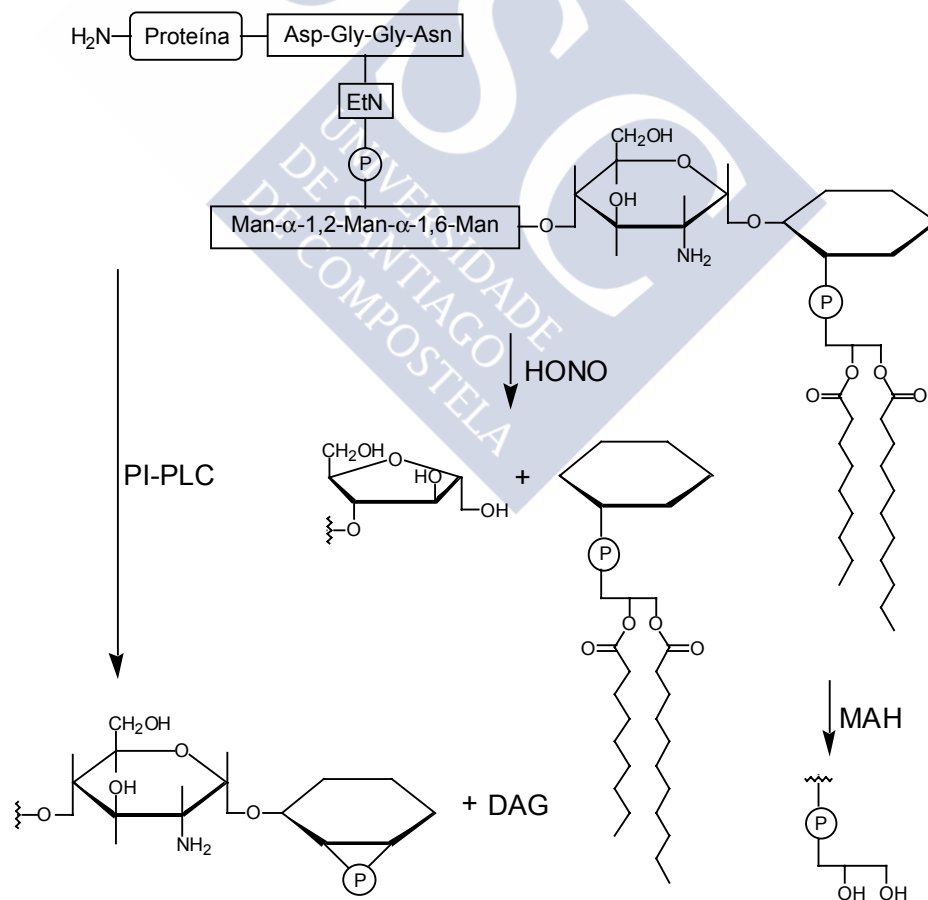


Los ensayos se realizaron bajo las condiciones descritas en métodos, tomando como control el bVLF puro bajo las mismas condiciones pero en ausencia de la enzima o la inactivación de la misma. La determinación de la bioactividad se determinó mediante el ensayo de movilización de calcio intracelular. Los resultados obtenidos se muestran en la TABLA 1. Para este tipo de ensayos se tomaron como controles el LPA y la S1P. El tratamiento con la PLB inhibió un 66% de la bioactividad del bVLF, un 55% del LPA y no afectó la bioactividad de la S1P. Estos ensayos sugieren la presencia de una sustancia que requiere la presencia de dos cadenas acilo ligadas en posiciones *sn1* y *sn2* de un esqueleto de glicerol. Se ha de resaltar que el hecho de que la PLB tenga efecto sobre la bioactividad del LPA resta especificidad a esta enzima, al carecer este último compuesto de dos cadenas acilo. Por otra parte, la bioactividad del bVLF no se vio afectada tras el tratamiento con la PI-PLC, lo que descarta por completo la presencia de inositol-1-fosfato (inositol-1-PO<sub>4</sub>) en la estructura del bVLF, estructura característica de los GPI.

Paralelamente se realizaron ensayos de hidrólisis alcalina así como de desaminación con ácido nitroso (HONO), tanto con el bVLF puro como con el LPA o la S1P. Las condiciones de reacción fueron las indicadas en métodos, tomando como los lípidos a estudio bajo las mismas condiciones

pero sin los reactivos correspondientes. La respuesta de movilización de calcio del bVLF se vio inhibida significativamente (68% de inhibición) tras la hidrólisis alcalina, inhibición que también se observó para el LPA que presenta un 100% de inhibición de la actividad, sin embargo la S1P no se vio afectada (inhibición, 5%). Por otra parte, la desaminación con ácido nitroso (HONO), resultó en un 39% de inhibición de la respuesta del calcio para el caso del bVLF, aunque no presentó efecto alguno sobre la bioactividad del LPA o de la S1P. El hecho de que la HONO inhibiese un 39% de la bioactividad del bVLF no permite descartar la presencia de GlcNH<sub>2</sub> como parte estructural de la molécula.

En resume, los datos obtenidos con la PI-PLC permitieron descartar que el bVLF perteneciese a la familia de los GPI, al carecer este del anillo de inositol como componente estructural. Los datos obtenidos con la PLB, MAH o incluso la HONO no fueron del todo concluyentes.



**Figura 6.-** Esquema de las reacciones utilizadas para determinar los componentes estructurales básicos de los GPI.

**TABLA 1.- Caracterización enzimática y química del bVLF.** Diferentes alícuotas de bVLF fueron digeridas *in vitro* con las enzimas que se indican, bajo las condiciones descritas en métodos. Paralelamente diferentes alícuotas de bVLF fueron sometidas a una hidrólisis alcalina (MAH) así como a una desaminación con ácido nitroso (HONO). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición tras los diferentes tratamientos enzimáticos y químicos, expresados respecto a sus correspondientes controles (muestras sin tratamiento pero bajo las mismas condiciones experimentales).

<u>% INHIBICIÓN</u>				
Tratamiento	Reactivos	bVLF	LPA	S1P
Enzimático	PLB	66±8	50±5	<b>5±0.1</b>
	PI-PLC	6±8	–	–
Químico	MAH	68±10	100±0	<b>10±1</b>
	HONO	39±2	8±5	–

## 2.- ANÁLISIS DE LA NATURALEZA DEL bVLF.

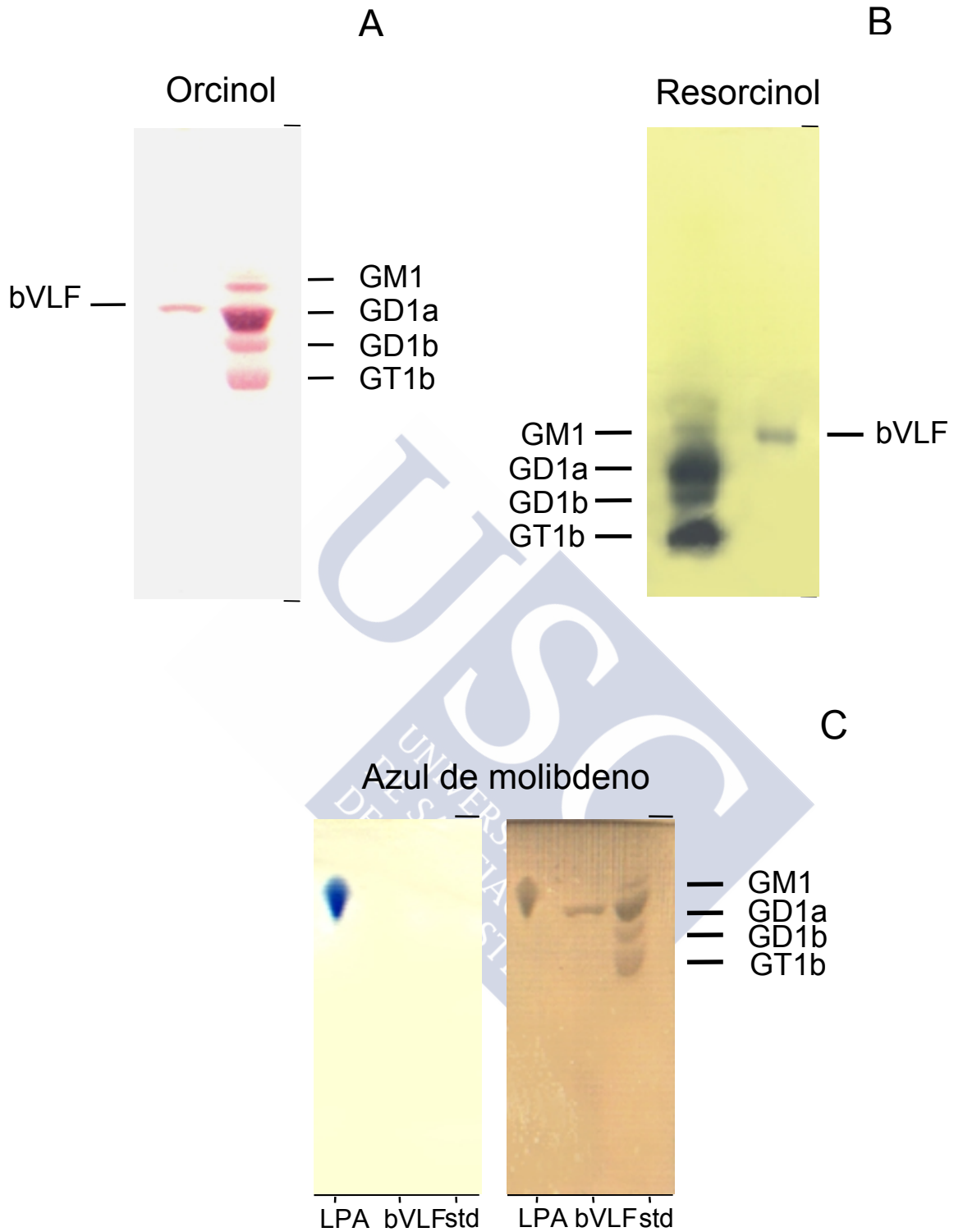
Una vez descartado que el bVLF fuese un GPI, se procedió a la caracterización estructural básica por la combinación del desarrollo cromatográfico con la posterior identificación mediante tinciones específicas. Los ensayos se realizaron en cromatoplasmas de gel de sílice (Merck), utilizando como eluyente la mezcla ternaria cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub> 0.02% (5:4:1, v/v/v). El material de partida fue el bVLF puro. En una primera aproximación, ante los resultados obtenidos con la PLB así como con la hidrólisis alcalina, se optó por determinar la presencia de enlaces ésteres que pudiesen corresponder a un compuesto fosfolípido con una estructura base de glicerol. Para ello se realizaron tinciones con hidroxilamina (TABLA 2). Como controles positivos se utilizaron dos fosfolípidos, fosfatidilcolina (PC) y lisofosfatidilcolina (LPC); mientras que como control negativo S1P. Los resultados obtenidos fueron negativos para los ensayos realizados con el bVLF a diferencia de los resultados para la PC o la LPC. Este resultado

parece descartar que el bVLF pertenezca a ninguna de las familias de lípidos que contienen un esqueleto base de glicerol. Por otra parte los ensayos con el reactivo azul de molibdeno (TABLA 2) tinción específica de los grupos fosfatos, permitieron descartar que este compuesto fuese de naturaleza fosfolipídica. Como control se utilizó el LPA, el cual se visualizó en todos los ensayos realizados como una mancha azul. Estudios previos evidenciaron experimentalmente la presencia de grupos fosfatos en el bVLF (24). Ensayos realizados con la fosfatasa alcalina parecían sugerir que la bioactividad del bVLF dependía de la existencia de grupos fosfatos terminales. Por ello, fue necesario evaluar la presencia de este grupo mediante un ensayo colorimétrico basado en el método de Bartlett para la identificación y cuantificación de fosfatos, basado esencialmente en el paso de fósforo orgánico a fósforo inorgánico con posterior evaluación de este último mediante espectrofotometría visible, tal y como se detalló en métodos. Los ensayos se realizaron tanto para el bVLF como para el LPA (control positivo). Los resultados obtenidos fueron negativos para el bVLF, lo cual parecía concordar con los resultados en HPTLC con el reactivo azul de molibdeno. Paralelamente, el bVLF se trató previamente con la fosfatasa alcalina y posteriormente la presencia de grupos fosfato se determinó bajo las mismas condiciones experimentales antes citadas. Como control positivo se utilizó el LPA bajo las mismas condiciones. Sin embargo, los resultados siguieron siendo negativos para el bVLF, aunque positivos para el LPA. En general, los resultados obtenidos tanto en HPTLC como por el método de Bartlett, permitieron descartar que el bVLF fuese un fosfolípido. Los ensayos realizados con bencidina (TABLA 2) que revela específicamente los esfingolípidos, dieron resultados positivos para todos los ensayos realizados con el bVLF. Ello planteaba la posibilidad de que el bVLF perteneciese a las familias de esfingolípidos, resultado que parecía confirmarse para los ensayos realizados con tinción de ninhidrina que revela los grupos aminos libre y en menor medida los grupos amidas. De los ensayos realizados con la tinción con orcinol, tinción específica de azúcares (TABLA 2), se pudo constatar la presencia de residuos glicosídicos en el bVLF. Además, los resultados obtenidos tras la tinción con resorcinol (TABLA 2), tinción específica de gangliósidos, permitió determinar que el bVLF pertenecía a la familia de los gangliósidos. Para este tipo de ensayos se utilizaron como controles positivos GM1, GD1a, GD1b y GT1b, (Figura 7). En conjunto estos resultados sugieren que el bVLF pertenece a la familia de los esfingoglicolípidos, concretamente a la familia de los gangliósidos. Estos

compuestos se caracterizan por presentar residuos de ácido siálico en la fracción glicídica, correspondiente a la cabeza polar, además de una base esfingoide en la región hidrofóbica, base que puede estar ligada o no a ácidos grasos mediante un enlace amida.

**TABLA 2.- Visualización de los cromatogramas desarrollados para el bVLF mediante diferentes reveladores específicos.** Para la cromatografía en capa fina se empleó gel de sílice de alta resolución (HPTLC, Merck) utilizando como eluyente una mezcla ternaria de cloroformo: metanol:  $\text{CaCl}_2$  0.02% (5:4:1, v/v/v). El revelado se realizó mediante diferentes tratamientos con diferentes reactivos que muestran especificidad para los grupos que se indican en la tabla.

TINCIÓN	ESPECIFICIDAD	RESULTADO
Ninhidrina	Grupo amino libre	dudoso
Dragendorf	Grupo colina	negativo
Orcinol	Azúcares	positivo
Resorcinol	Ácido siálico	positivo
Azul de molibdeno	Grupo fosfato	negativo
Hidroxilamina	Grupo éster	negativo
Bencidina	Esfingolípidos	positivo



**Figura 7.- Análisis del bVLF por cromatografía en capa fina (HPTLC) y tinción específica para glicolípidos (orcínol), gangliósidos (resorcinol) y fosfolípidos (azul de molibdeno).** El bVLF puro fue aplicado a cromatoplasmas de HPTLC desarrolladas con la mezcla ternaria de cloroformo:metanol:CaCl<sub>2</sub> 0.02% (5:4:1,v/v/v). Los diferentes cromatoplasmas fueron visualizados con A) orcínol; B) resorcinol; y C) azul de molibdeno (HPTLC izquierda). La HPTLC derecha muestra la misma cromatoplasma sobrecalentada para el revelado completo de los compuestos.

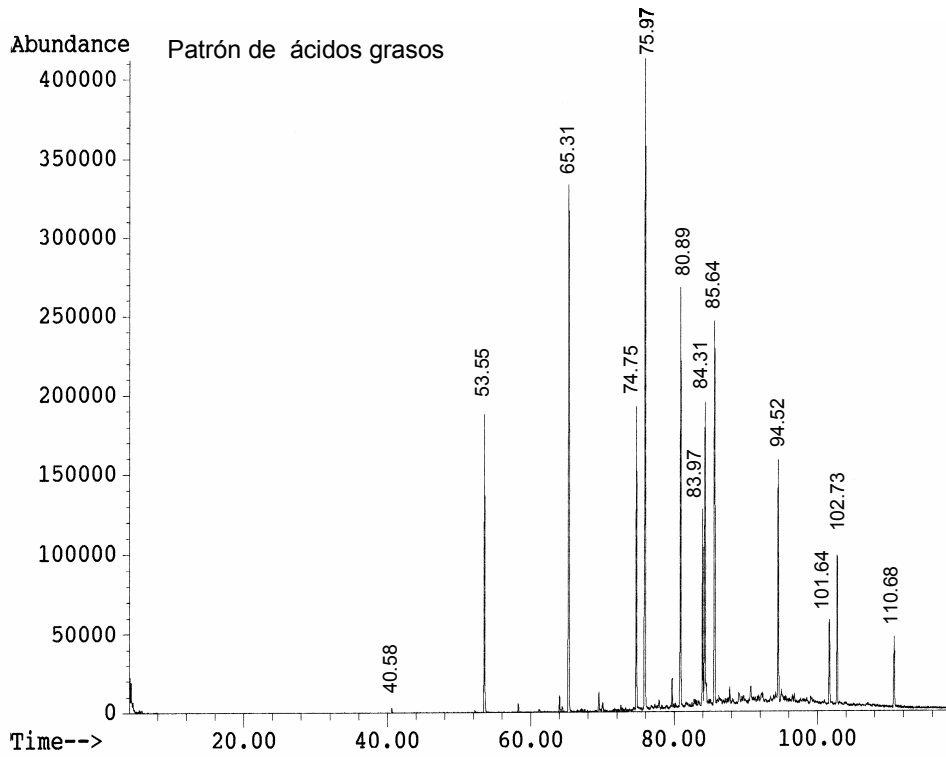
### **3.- CARACTERIZACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE LA ESTRUCTURA DEL bVLF.**

Para evaluar de forma cualitativa los diferentes componentes del bVLF, se realizó la determinación de los ácidos grasos, las bases esfingoides, el ácido siálico y los residuos de azúcares mediante GC/MS (66).

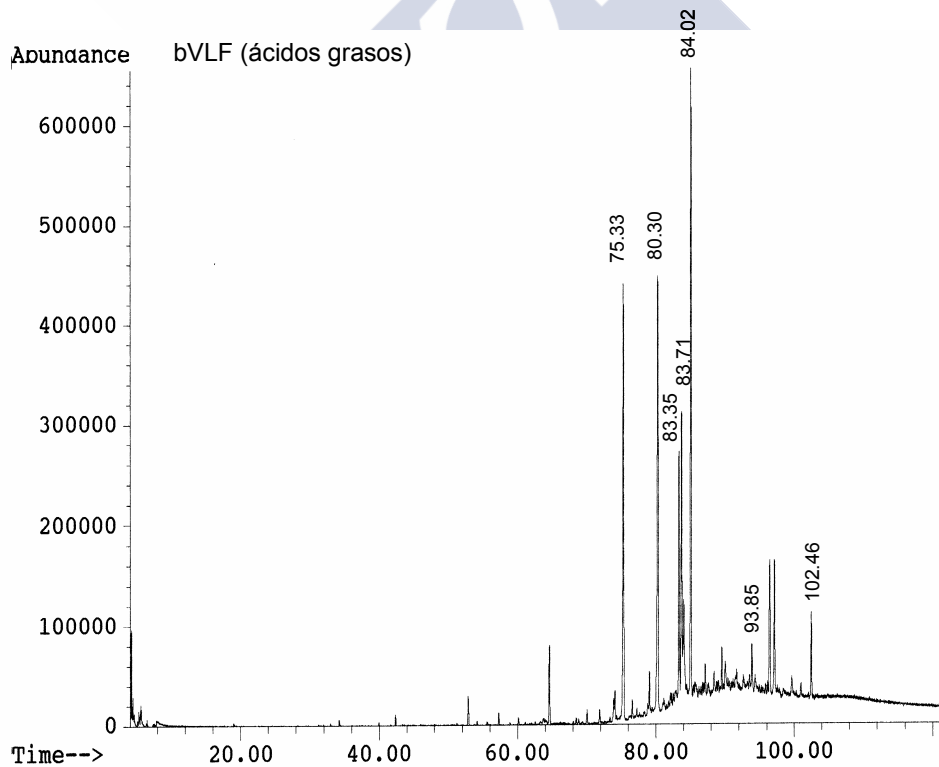
#### **3.1.-Análisis de ácidos grasos.**

La determinación de los ácidos grasos presentes en el bVLF se realizó mediante la hidrólisis ácida (67) y posterior formación de los correspondientes ésteres metílicos (FAMES) lo que permitió su determinación mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). Ello permitió la identificación inequívoca de cada ácido graso en base a los tiempos de retención para los patrones correspondientes (Figura 8A), junto con la identificación de los fragmentos iónicos característicos  $m/z$  74 y 87 (42) de los espectrómetros de masas asociados al perfil cromatográfico. De los ensayos realizados para diferentes purificaciones del bVLF, los ácidos grasos más abundantes detectados fueron: hexadecanoico (C16:0); octadecanoico (C18:0), (C18:10,13), (C18:9) o (C18:7); ecosanoico (C20:0); docosanoico (C22:0) (Figura 8B y Figura 9). El hecho de que se detectasen diferentes ácidos grasos para un único compuesto demuestra la consabida heterogeneidad de la parte hidrofóbica de este tipo de moléculas (TABLA 3). Debemos reseñar que la purificación final se realizó en base a la cabeza polar y no a la zona hidrofóbica.

Resultados

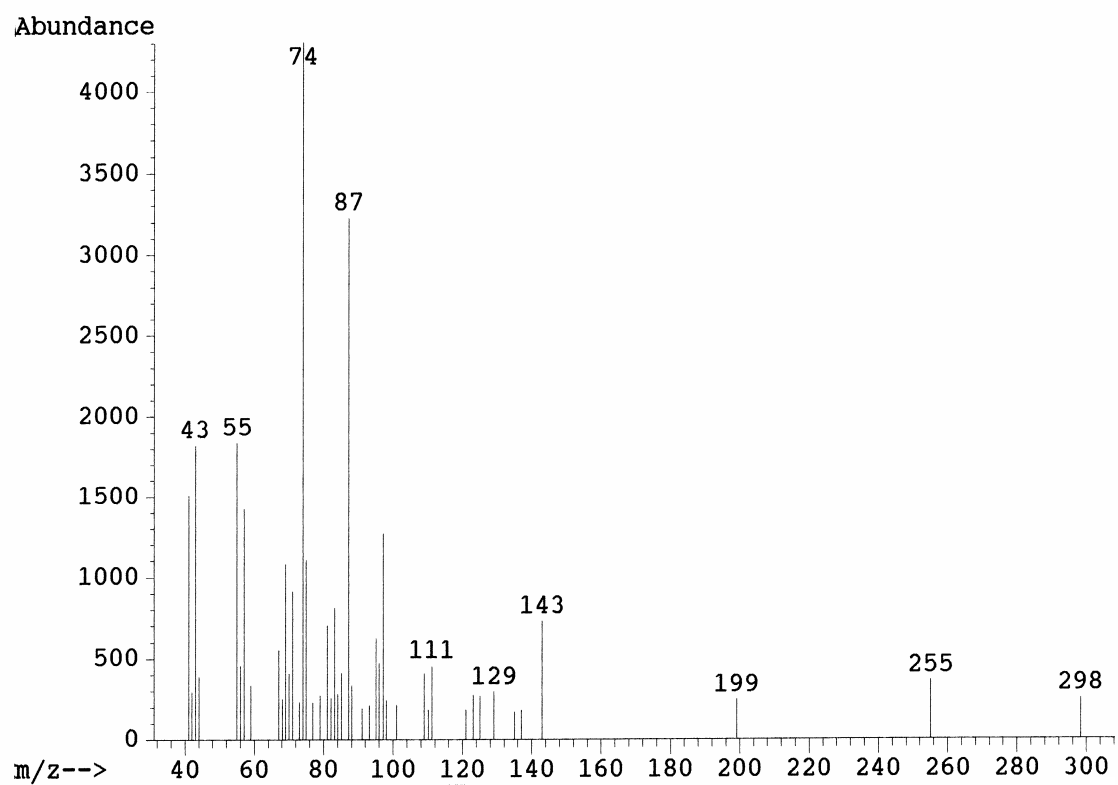


A



B

**Figura 8.- Análisis de los ácidos grasos.** A) Cromatograma de gases para los patrones de los FAMES y B) Cromatograma de los FAMES correspondiente a un análisis significativo del bVLF.



**Figura 9.- Fragmentos iónicos característicos de los ácidos grasos.** Fragmentos iónicos característicos de los FAMES: m/z 74 y m/z 87.

**TABLA 3.- Determinación de los ácidos grasos constituyentes del bVLF.** Se muestran los tr(s) y el MRRF calculado respecto al patrón interno, metil ester de ácido heptadecanoico. Los ácidos grasos detectados en el bVLF se muestran como porcentaje de abundancia respecto al de mayor abundancia, metil ester de ácido octadecanoico.

FAMES	Tiempo de retención (min)	MRRF	% en bVLF(*)
<b>Decanoico (C10:0)</b>	40.58	0.42	-
<b>Dodecanoico (C12:0)</b>	53.55	1.43	-
<b>Tetradecanoico (C14:0)</b>	65.31	1.90	-
<b>9-Hexadecanoico (C16:9)</b>	74.75	0.95	-
<b>Hexadecanoico (C16:0)</b>	75.97	1.34	<b>44</b>
<b>Heptadecanoico (C17:0)</b>	80.89	1	
<b>10,13-Octadecanoico (C18:10,13)</b>	83.97	0.63	<b>78</b>
<b>9 o 7-Octadecanoico (C18:9 o C18:7)</b>	84.31	1.20	<b>89</b>
<b>Octadecanoico (C18:0)</b>	85.64	1.14	<b>100</b>
<b>Ecosanoico (C20:0)</b>	94.53	0.73	<b>56</b>
<b>13-Docosanoico (C22:13)</b>	101.64	0.39	-
<b>Docosanoico (C22:0)</b>	102.73	0.36	<b>44</b>
<b>Tetracosanoico (24:0)</b>	<b>110.68</b>	<b>0.28</b>	-

(\*) Relativo al metil ester de ácido octadecanoico

### 3.2.- Análisis de la composición de azúcares/ácido siálico.

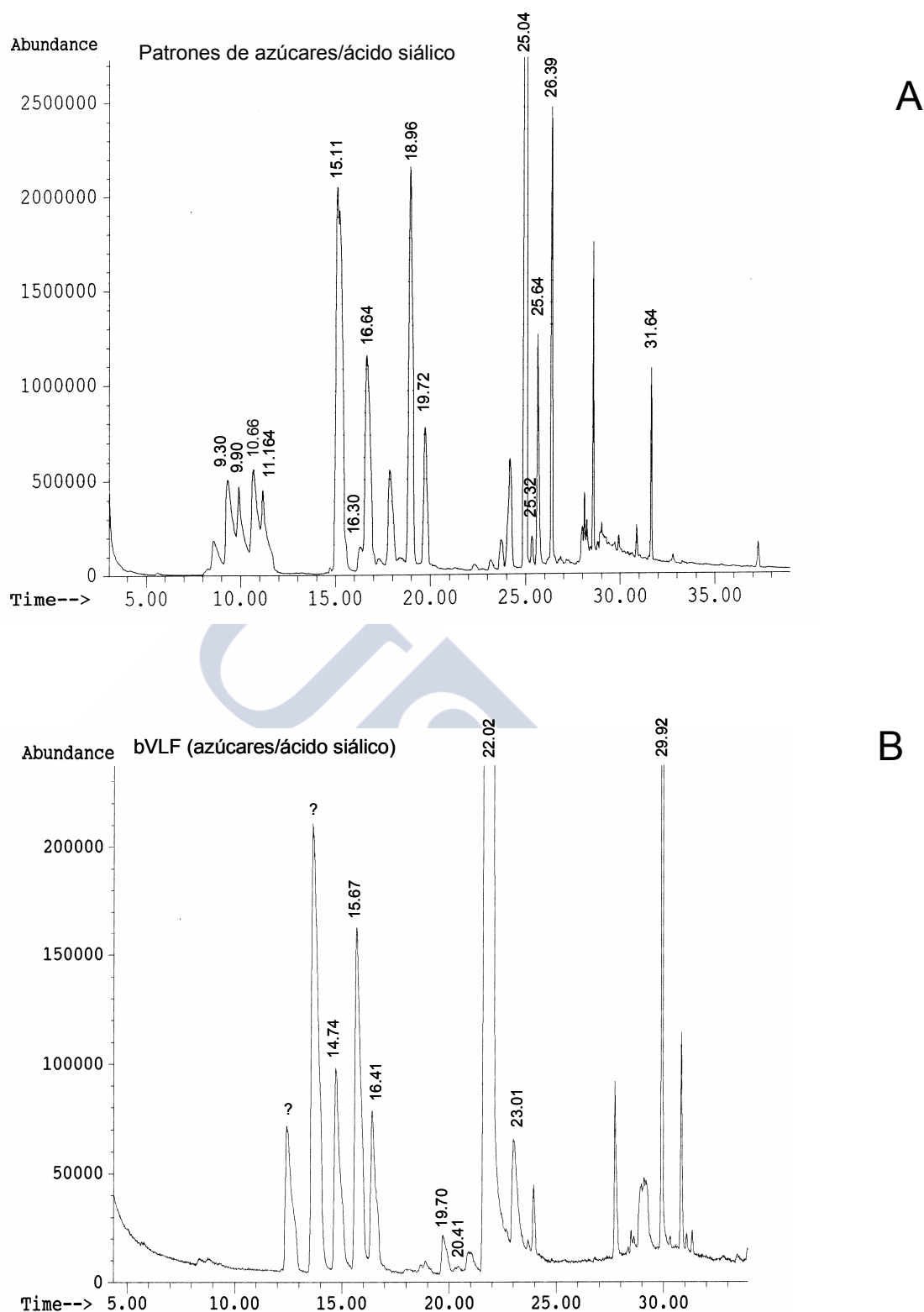
El análisis de los monosacáridos utilizando metanólisis seguido de la derivatización con TMS y determinación por GC-MS ofrece la ventaja de poder analizar los azúcares neutros los *N*-acetil hexosaminas, el ácido siálico, los ácidos grasos y los alquil-glicerole en un mismo ensayo. La metanólisis ácida es análoga a la hidrólisis ácida y es llevada a cabo mediante la utilización de HCl 0.5 M en metanol anhidro. Bajo estas condiciones se rompen la mayoría de los enlaces glicosídicos dando lugar a los correspondientes metil-glicósidos.

Debido al fenómeno de mutarrotación cada monosacárido puede producir cuatro productos,  $\alpha$  y  $\beta$  metil-glicósidos del anillo en forma piranosa o furanosa, lo que dificulta el análisis de los monosacáridos al generar más de un pico característico para cada azúcar; sin embargo, el acoplamiento entre el GC y el MS, facilita la identificación debido a la existencia de fragmentos iónicos característicos:  $m/z$  204 y 217 para los monosacáridos;  $m/z$  173 para *N*-acetil hexosaminas;  $m/z$  298 para el ácido siálico y  $m/z$  305/318 para el *scillo*-inositol (42).

Previo al análisis de azúcares del bVLF se realizaron una serie de ensayos utilizando patrones de azúcares: L-fucosa, D,L-xilosa, L-manosa, D-galactosa, D-glucosa, *N*-acetil-d-glucosamina, *N*-acetil-d-galactosamina y NANA (ácido siálico); con el objeto de obtener los tiempos de retención para cada uno de ellos (Figura 10A) así como los espectrómetros de masas característicos. En una primera aproximación se utilizaron las condiciones experimentales descritas por MAJ Ferguson (42), sin embargo los resultados fueron bastante confusos, debido fundamentalmente a la falta de redisolución y sensibilidad. Las modificaciones introducidas corresponden al tiempo de reacción de la metanólisis, así como la temperatura de la derivatización. Para la metanólisis, fue necesario ampliar el tiempo de 4 a 16 h, manteniendo la temperatura a 85 °C. Para el caso de la derivatización, la modificación fue en la temperatura, 80 °C mantenida 20-30 min. Además, se modificó la rampa de temperaturas para la cromatografía de gases, para lo cual se aplicó una temperatura inicial de 160 °C durante 3 min, seguido de un gradiente lineal a 2 °C hasta alcanzar una temperatura de 200 °C continuando con un segundo gradiente de 10 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 260 °C la cual se mantuvo durante 20 min.

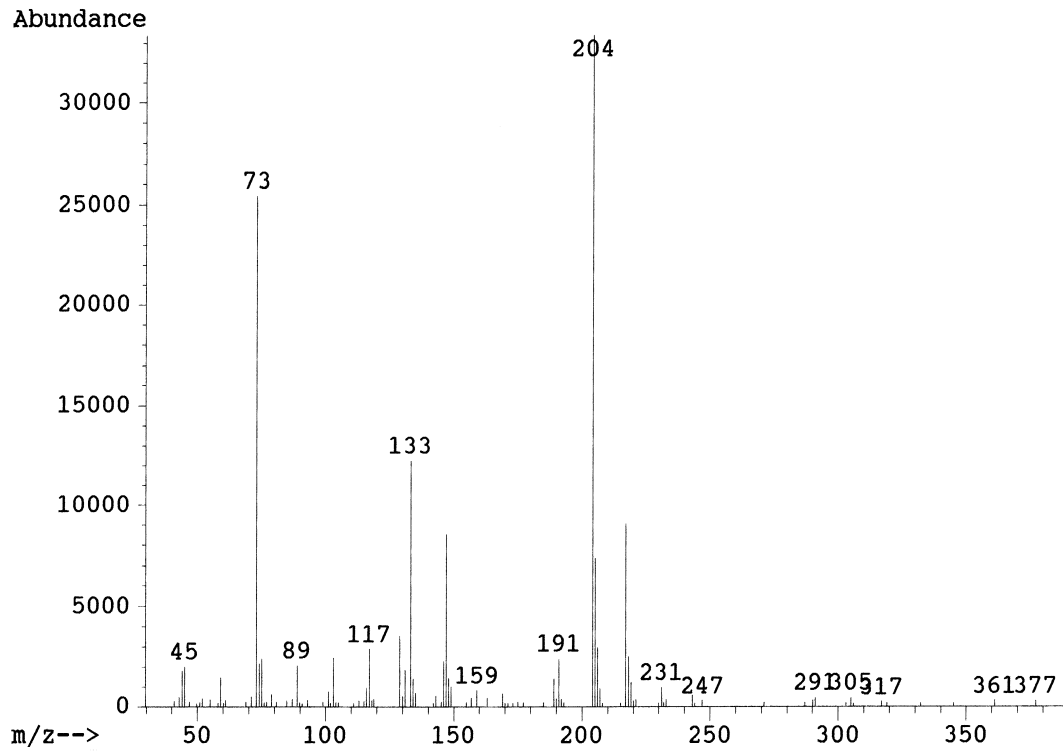
Dichas modificaciones permitieron, primero, la identificación de los azúcares presentes en la mezcla de patrones, y segundo, de los presentes en el bVLF. De los tiempos de retención (Figura 10B) así como del patrón de fragmentos iónicos en el espectrómetro de masas se identificaron manosa, glucosa, galactosa como azúcares neutros, como azúcares *N*-acetilados: *N*-glucosa o *N*-galactosa, así como el ácido siálico (Figura 11 y 12). Sin embargo, no se pudo realizar una asignación cuantitativa inequívoca dado el alto grado de complejidad de los cromatogramas obtenidos, debido fundamentalmente al antes citado fenómeno de mutarrotación.



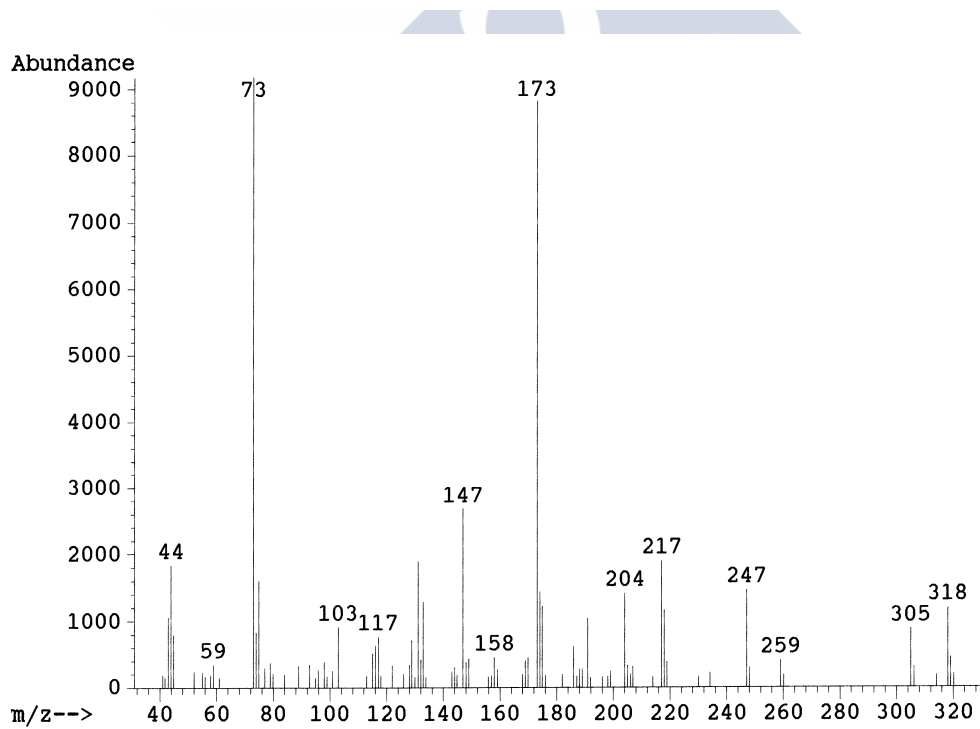


**Figura 10.- Análisis de azúcares** A) Cromatograma de la muestra mezcla de patrones de azúcares: fucosa tr(min): 9.30 y 9.90; xilosa tr(min): 10.66 y 11.16; manosa tr(min): 15.11; galactosa tr(min): 16.30 y 16.64 y glucosa tr(min): 18.96 y 19.72; *scillo*-inositol tr(min): 25.04; *N*-acetilgalactosamina tr(min): 25.32 y 25.64; *N*-acetilglucosamina tr(min): 26.39 y ácido siálico tr(min): 31.64. B) Cromatograma de los azúcares del bVLF: manosa tr(min): 14.74; galactosa tr(min): 15.67 y 16.41; glucosa tr(min): 19.70 y 20.41, azúcar *N*-acetil tr(min): 23.01 y ácido siálico tr(min): 29.92. El análisis mediante GC/MS se realizó tras la metanólisis y posterior derivatización de las muestras.

Resultados

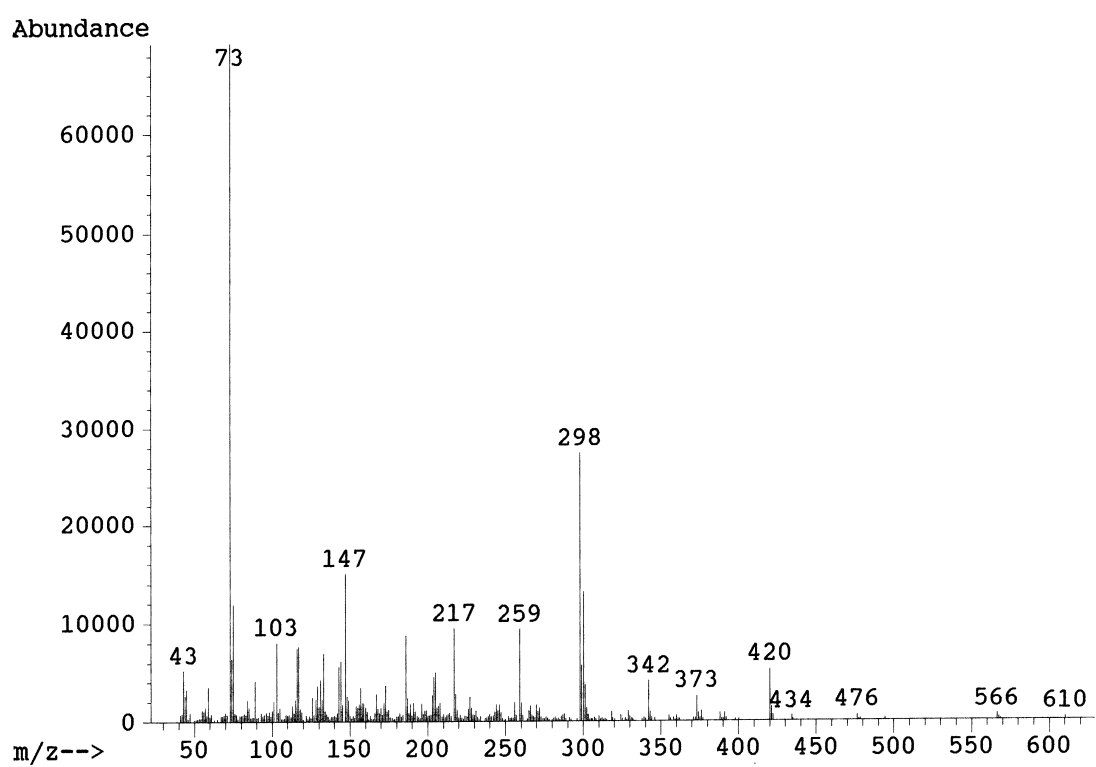


A



B

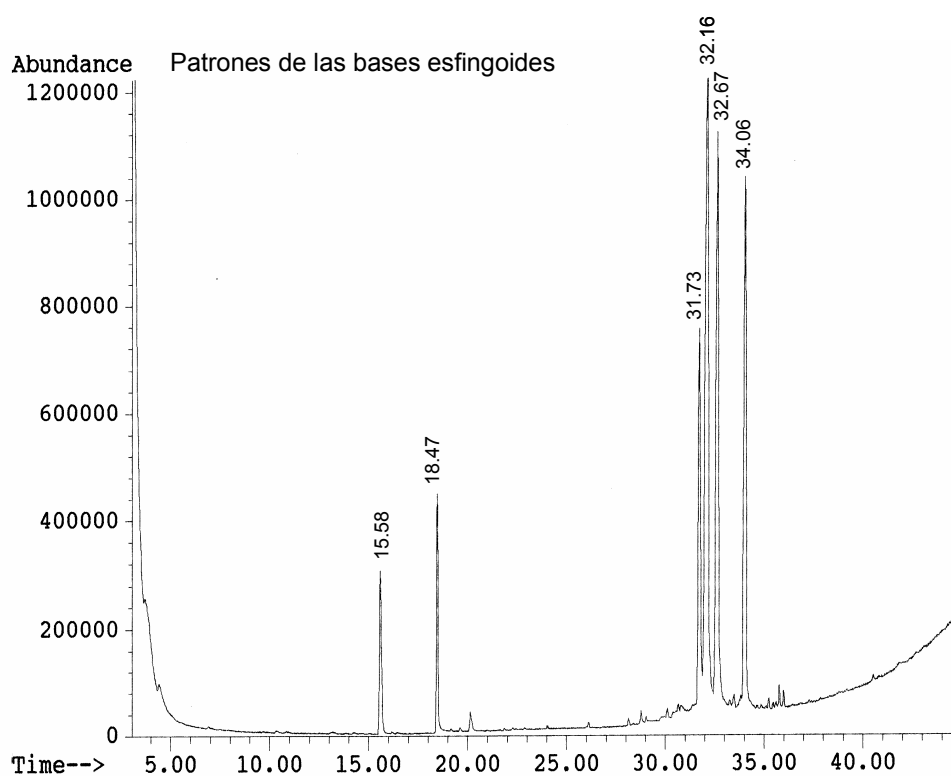
**Figura 11.-** A) Espectrómetro de masas representativo para los derivados trimetilsililo de los metil-glicósidos. Picos característicos: m/z 204 y m/z 217. B) Espectrómetro de masas representativo para los derivados trimetilsililo de las *N*-acetil hexosaminas. Pico característico m/z 173. Espectrómetros obtenidos del análisis del bVLF.



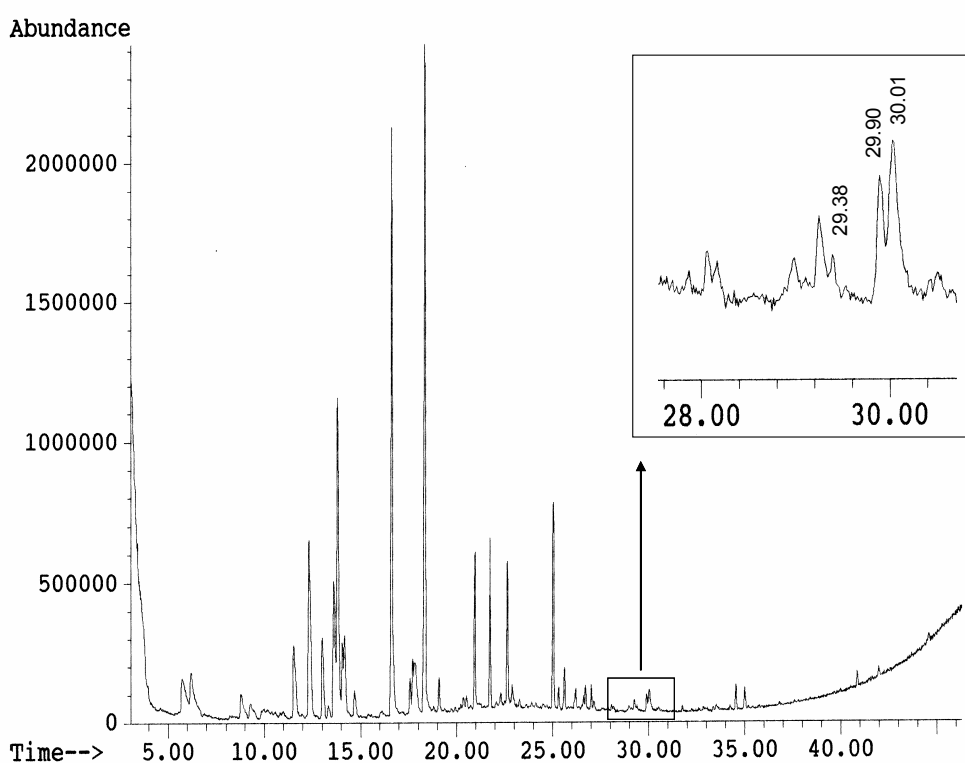
**Figura 12.-** Espectrómetro de masas representativo para el derivado trimetilsililo del NANA. Pico característico: m/z 298. Espectrómetro obtenido del análisis del bVLF

### 3.3.- Análisis de la composición de las bases esfingoides.

La determinación de las bases esfingoides se realizó inicialmente en base a una hidrólisis básica (42), obtención de las bases, formación de los derivados TMS y posterior análisis por GC/MS. Se utilizaron como patrones la fitoesfingosina, la D-esfingosina y la dihidroesfingosina, correspondientes a las bases esfingoides más abundantes detectadas en los esfingoglicolípidos. La determinación de los tiempos de retención se realizó en base a los valores de  $m/z$  157 y 174 (42) (Figura 14) iones característicos que presentan estos compuestos. Sin embargo, los análisis realizados bajo estas condiciones para el bVLF, no permitieron la identificación de base esfingóide alguna. Se planteó la posibilidad de que el bVLF no presentase esta unidad estructural en la zona hidrofóbica de la molécula. Para confirmar este punto, se optó por un cambio en las condiciones de la hidrólisis. Bajo una hidrólisis ácida y posterior derivatización (35,67-69) de las bases obtenidas, se consiguió identificar tres tipos de bases esfingoides, no correspondiendo a los tiempos de retención de los patrones utilizados (Figura 13). Se confirmó que el bVLF pertenecía a la familia de los glicoesfingolípidos. Será necesario introducir un mayor número de patrones para la asignación de estas tres bases esfingoides.

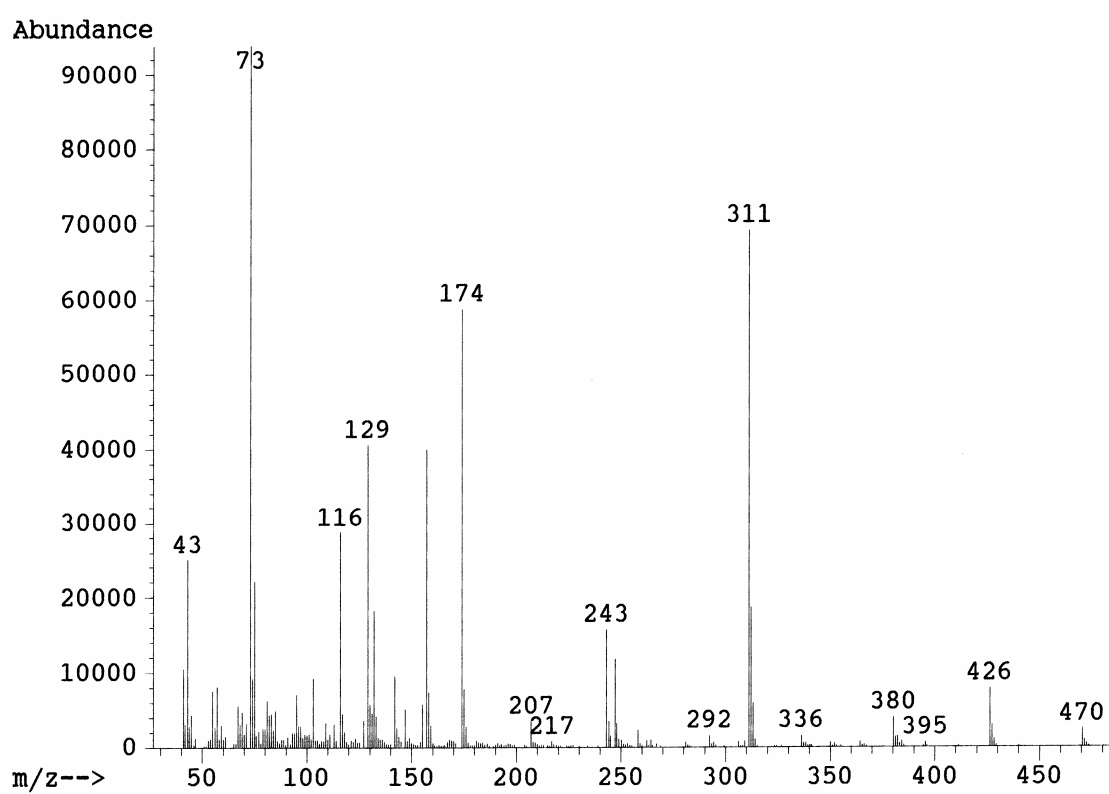


A



B

**Figura 13.-** Análisis de las bases esfingoides A) Cromatograma de la muestra mezcla de los patrones de bases esfingoides: palmitoil glicerol, tr(min):15.58 y 18.47; D-esfingosina tr(min):31.73; dihidroesfingosina t tr(min):32.16 y 32.67; fitoesfingosina t tr(min):34.06. B) Cromatograma representativo del bVLF para el análisis de las bases esfingoides. Los picos de tr(min):29.38, tr(min):29.9 y tr(min):30.01 corresponden a bases esfingoides asignables por su espectrómetro de masas. El análisis mediante GC/MS se realizó tras la metanólisis y posterior derivatización de las muestras.



**Figura 14.-** Espectrómetro de masas representativo para los derivados trimetilsililo de las bases esfingoides. Picos característicos: m/z 174 y m/z 157.



*Ensayos de bioquímica celular en EGFR-T17*

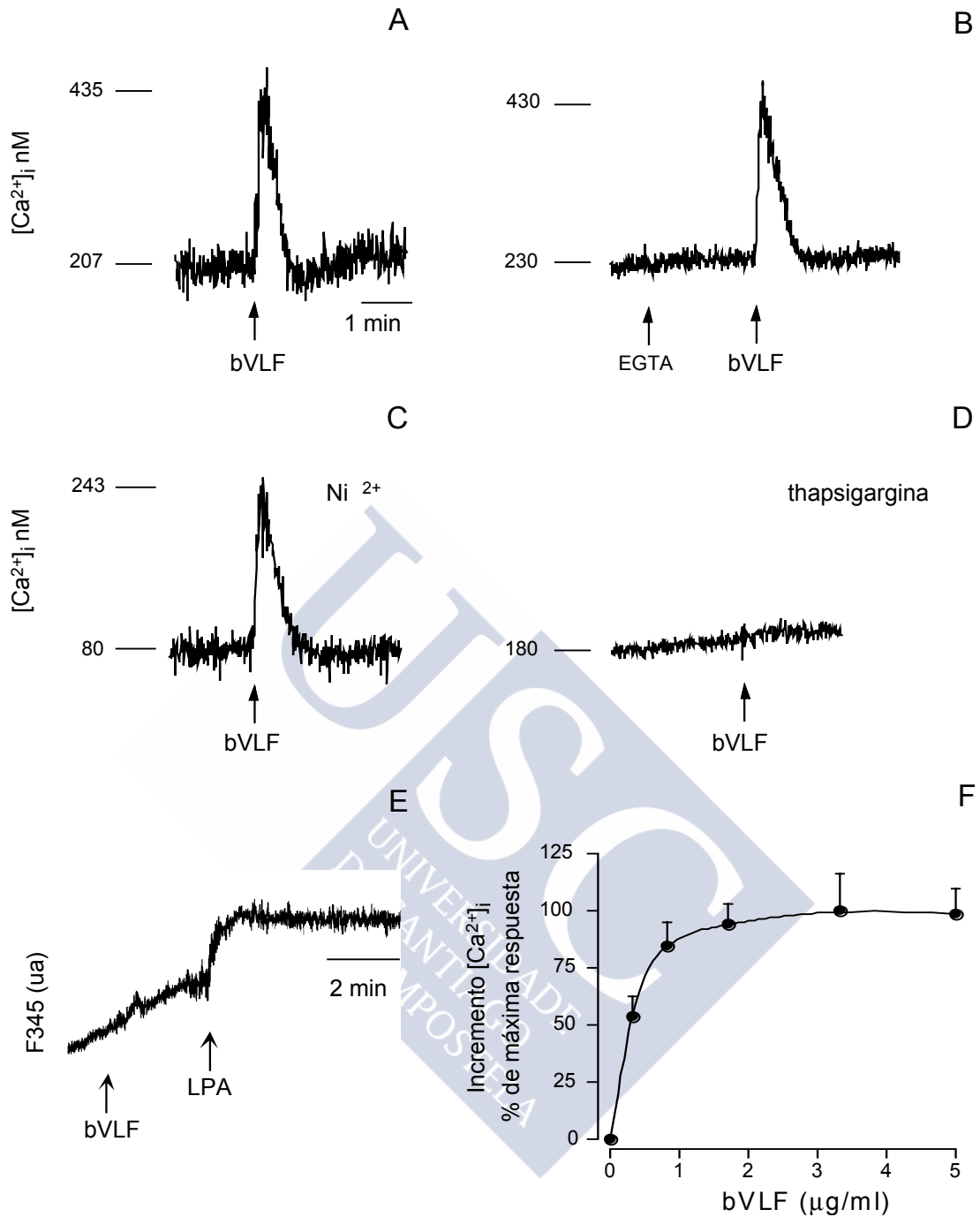


## 1.- CARACTERIZACIÓN DE LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INDUCIDA POR EL bVLF EN CÉLULAS EGFR-T17.

La adición del bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ) a las células EGFR-T17 cargadas con la sonda calcio selectiva fura 2 indujo un aumento rápido ( $< 1$  s) y pasajero que alcanza un máximo a los 4-10 s, decayendo a los 50-60 s a niveles infrabasales para volver al nivel basal a los 100-120 s (Figura 15A). Este pico de calcio fue debido exclusivamente a una redistribución de depósitos intracelulares, lo que se demostró por:

- 1) La ausencia de efecto sobre la señal tras la quelatación del calcio extracelular con exceso de EGTA (4 mM) (Figura 15B).
- 2) Ausencia de un bloqueo significativo de la señal en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  (5 mM), bloqueante inespecífico de canales de calcio (70) (Figura 15C).
- 3) Inhibición de la respuesta tras la preincubación de las células con thapsigargina (50  $\mu\text{M}$ , 30 min preincubación), un bloqueante de las bombas calcio-ATPasa del retículo endoplasmático (71) (Figura 15D).

La pequeña deflexión negativa que se produce tras el pico, en un principio podría ser debida a una corriente de salida de calcio desde el medio intracelular al extracelular. De hecho, esta parte de la señal fue eliminada en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  o EGTA. Para confirmar o descartar esta hipótesis se utilizó el siguiente diseño experimental: las células se dispusieron en la cubeta del fluorímetro en ausencia de calcio extracelular, tras el equilibrado del trazado, se adicionó al medio extracelular la sal penta potásica del fura 2, el cual no puede atravesar las membranas celulares, permitiendo de este modo monitorizar el calcio extracelular. Después de la adición del bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ), no se observó aumento alguno de la fluorescencia tras la administración del estímulo (Figura 15E) y por lo tanto, salida alguna de calcio al medio extracelular. Por otra parte, la adición del LPA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) indujo una corriente de salida de calcio, salida que puede ser debida al funcionamiento de los mecanismos que aseguran el retorno del calcio citosólico a niveles basales tras la estimulación (Figura 15E).



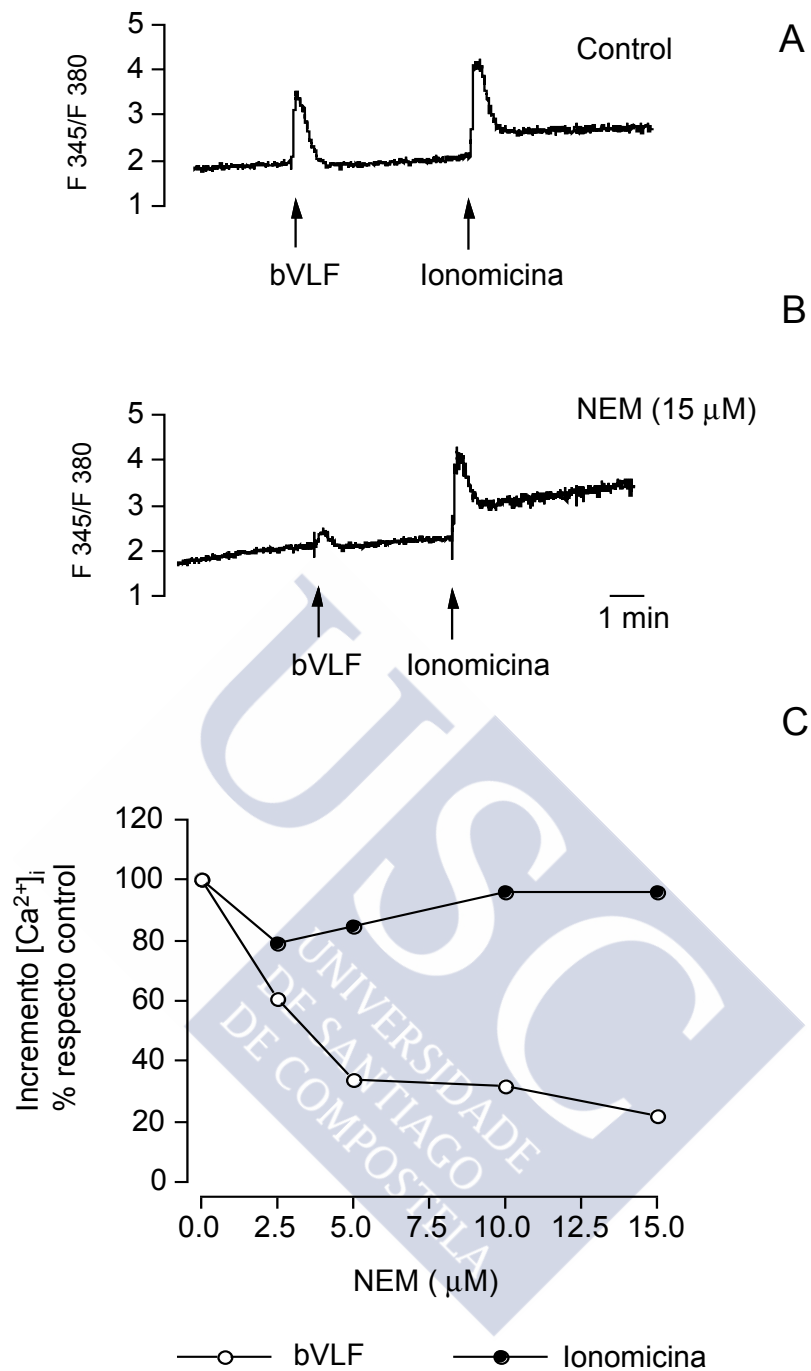
**Figura 15.- bVLF induce movilización de  $Ca^{2+}$  en células EGFR-T17.** Las células EGFR-T17 fueron estimuladas con el factor purificado bVLF, y fueron medidos los cambios de  $Ca^{2+}$  intracelular con el marcador fluorescente fura-2. A) La adición del bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ) induce un incremento rápido de calcio intracelular seguido de una deflexión hacia los niveles infrabasales tras lo que recupera gradualmente el nivel basal. B) Cuando la estimulación se realizó en ausencia de calcio extracelular (por adición previa de EGTA, 4 mM final) se mantuvo la respuesta desapareciendo la deflexión de la señal, retornando al nivel basal. C) Movilización de calcio en presencia de  $Ni^{2+}$  (5 mM). D) Respuesta en células preincubadas con thapsigargina (50 nM, 30 min). E) Efecto del bVLF sobre la salida de calcio al medio extracelular. Experimento realizado en células preincubadas con la sonda fura-2 en su forma impermeable a la célula. (ua: unidades arbitrarias) F) Curva de dosis-respuesta para la movilización de calcio inducida por bVLF en EGFR-T17, (media  $\pm$  EE).

## **2.- DOSIS RESPUESTA DE LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR.**

La Figura 15F muestra la relación dosis-respuesta para la movilización de calcio intracelular inducida por el bVLF estimado como porcentaje respecto a la máxima respuesta obtenida. Un incremento de la concentración de bVLF causó un aumento gradual en la señal fluorescente emitida por el fura 2 a 345 nm, la cual fue saturante para 1  $\mu\text{g/ml}$ , mostrando una estimulación maximal media en torno a 0.25  $\mu\text{g/ml}$ .

## **3.- EVALUACIÓN DE LA EXISTENCIA DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA QUE MEDIAN LA ACCIÓN DEL bVLF**

La curva dosis respuesta obtenida para el bVLF sugiere la presencia de un receptor saturable en la superficie celular. Para confirmar esta hipótesis las células en suspensión fueron tratadas con N-etilmaleimida (NEM) el cual es impermeable a la célula y produce modificaciones de los residuos de cisteína de las proteínas mediante la formación de S-(etil-succinimido)-cisteína. Este compuesto ha sido ampliamente utilizado para desnaturalizar proteínas integrales y periféricas de membrana en estudios de caracterización de receptores (72). Como muestra la Figura 16B la preincubación de las células en presencia de NEM (15  $\mu\text{M}$ ) durante 15 min, provocó una acusada inhibición de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducidas por el bVLF. Se utilizó como control un ionóforo de calcio, la ionomicina (1  $\mu\text{M}$ ), que no requiere de ninguna proteína de membrana para mediar su acción, y cuya señal no se vio afectada por dicho tratamiento. Es interesante destacar que después de la estimulación con ionomicina las células preincubadas con NEM la línea basal después de la estimulación se mantiene más alta que en las células control, esto podría estar reflejando los daños de los mecanismos de extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana celular tras el tratamiento con NEM.



**Figura 16.- Efecto de *N*-etilmaleimida (NEM) sobre la respuesta de calcio inducida por el bVLF en células EGFR-T17.** A) La elevación del calcio intracelular en respuesta al bVLF (1  $\mu g/ml$ ) e ionomicina (1  $\mu M$ ) se determinó en células EGFR-T17 antes (panel superior) y después (panel inferior) del tratamiento con NEM (15  $\mu M$ , 5 min preincubación). La interacción entre NEM y los residuos de cisteína de las proteínas extracelulares modifica la respuesta al bVLF sin afectar a la respuesta de la ionomicina. B) Curva dosis-respuesta para el efecto de NEM sobre la respuesta de calcio inducida por la ionomicina (1  $\mu M$ ) y por el bVLF (1  $\mu g/ml$ ). Las células se preincubaron durante 5 min en presencia de diferentes concentraciones de NEM, tras lo que se estimularon con el bVLF e ionomicina. Los resultados se expresan como porcentajes respecto de la respuesta control.

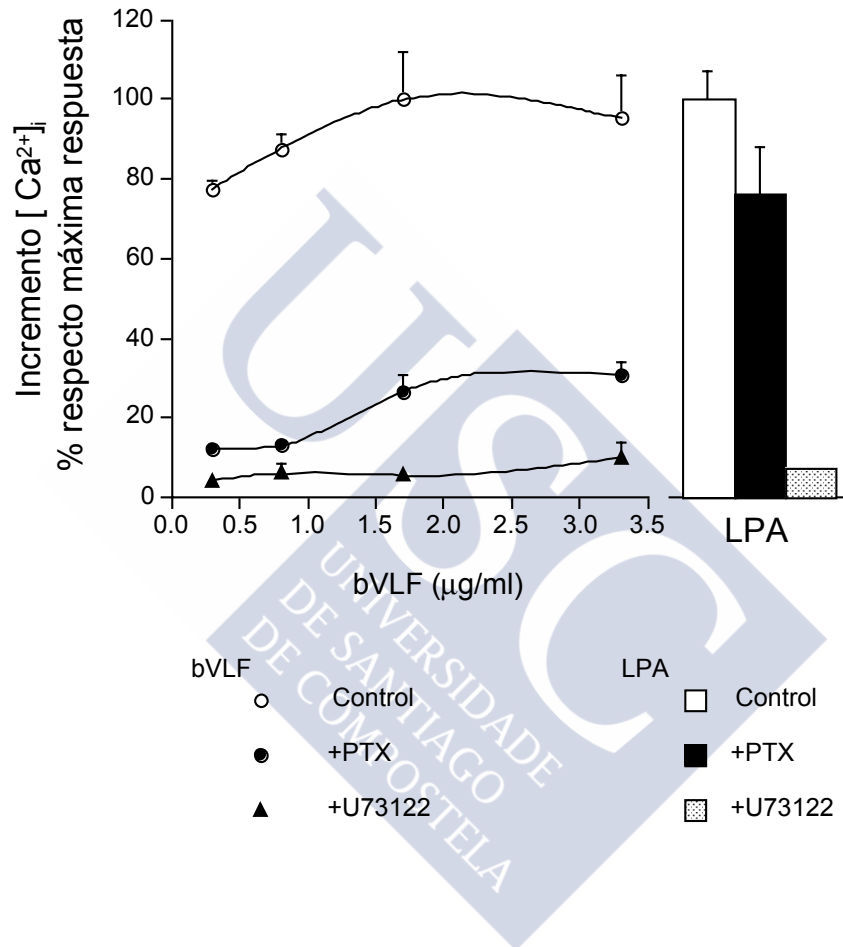
## 4.- IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE LOS INOSITOLES.

### 4.1.- Implicación de la PI-PLC.

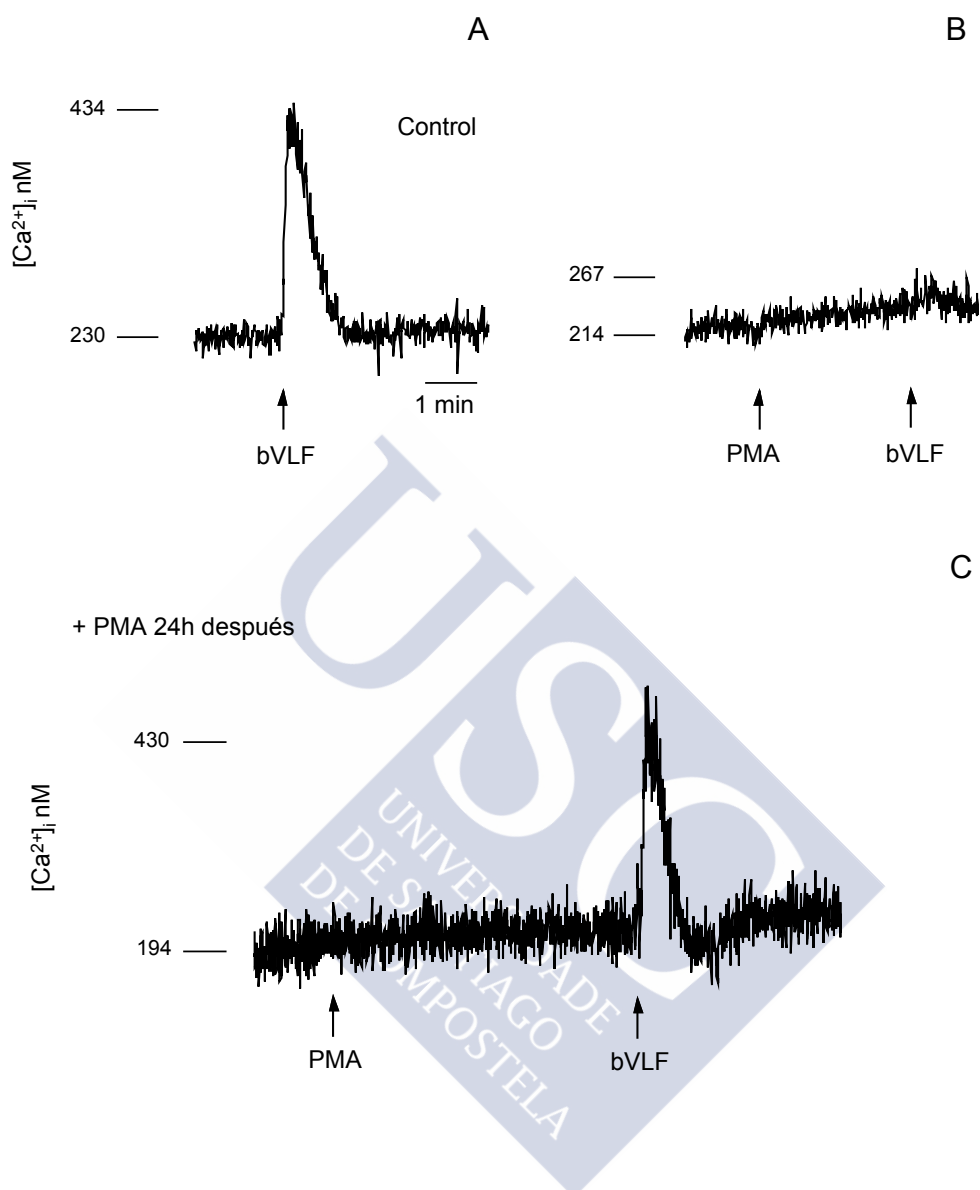
En la mayoría de los mecanismos celulares, la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares es normalmente provocada por la activación de una fosfolipasa C específica para los inositoles (PI-PLC). La activación de la PI-PLC da lugar a la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [PtdIns (4,5) $\text{P}_2$ ] y generación de dos segundos mensajeros: inositol 1,4,5-trifosfato [Ins (1,4,5) $\text{P}_3$ ] y diacilglicerol (DAG). Puesto que el DAG tiene carácter hidrofóbico, permanece en la membrana mientras que el Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  difunde por el medio citosólico uniéndose a receptores específicos de los depósitos intracelulares de calcio (73) induciendo la apertura de canales de calcio a este nivel y la salida de este catión al citosol. La activación de la PKC por el DAG ha sido descrita previamente (74). Con el fin de comprobar si este mecanismo pudiese ser el responsable de la movilización de calcio inducida por el bVLF en las células EGFR-T17, se evaluó el efecto del U73122, un inhibidor supuestamente específico de la PI-PLC (75) sobre la respuesta al bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Como se muestra en la Figura 17, la inhibición sobre la respuesta de calcio fue completa para las diferentes dosis utilizadas del bVLF. El efecto inhibitorio fue también significativo para la respuesta de calcio inducida por el LPA (1  $\mu\text{g/ml}$ ), lípido que actúa por activación de la PI-PLC y que se utiliza como control.

### 4.2.- Implicación de la PKC.

Por otra parte, además de la generación del Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ , la activación de PI-PLC genera DAG, un segundo mensajero que activa PKC. Para acceder al papel del complejo DAG-PKC sobre la ruta de señalamiento activado por el bVLF, la PKC fue estimulada mediante el tratamiento de las células con PMA (1  $\mu\text{M}$ , 5 min preincubación). Como se muestra en la Figura 18, la administración de PMA abolió la respuesta de calcio inducida por el bVLF (Figura 18B). Esta acción inhibitoria del PMA fue específica, ya que desapareció tras la "down" regulación de la PKC (76), mediante el tratamiento crónico de las células con PMA durante 24 horas. Como se puede observar en la Figura 18C, la administración aguda de PMA, a células previamente desprovistas de actividad PKC, no tuvo efecto alguno sobre la respuesta al bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ). La vía de señalamiento activada por el bVLF es susceptible de ser bloqueada por la activación de la PKC.



**Figura 17.- Efecto del inhibidor de la PI-PLC, U73122 y la toxina pertúsica (PTX, pertussis toxin) en la señal de calcio inducida por el bVLF en células EGFR-T17.** Las células EGFR-T17 fueron estimuladas con diferentes dosis del bVLF en células control o en presencia del U73122 (2.5  $\mu\text{M}$ , 5 min) o la PTX (100 ng/ml, 2h). En gráfico de barras a la derecha se muestra el efecto de la PTX (barras negras) o del U73122 (barras punteadas) sobre la señal de calcio inducida por el LPA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) los resultados se expresan como porcentaje de la respuesta máxima de calcio, (media  $\pm$  EE).



**Figura 18.- Efecto inhibitorio del PMA sobre la respuesta de calcio intracelular al bVLF en células EGFR-T17.** La elevación del calcio en respuesta al bVLF (1  $\mu$ g/ml) se determinó en; A) Células control; B) En células tratadas de forma aguda con PMA (1  $\mu$ M, 5 min preincubación); C) En células en las que la PKC ha sido "down" regulada por tratamiento prolongado con PMA (1  $\mu$ M, 24 h incubación). La movilización de calcio inducida por el bVLF fue inhibida completamente tras la activación de la PKC en células control. Cuando esta enzima se eliminó tras el tratamiento crónico con PMA, la administración aguda de PMA no tuvo efectos sobre el aumento de calcio en la respuesta al bVLF.

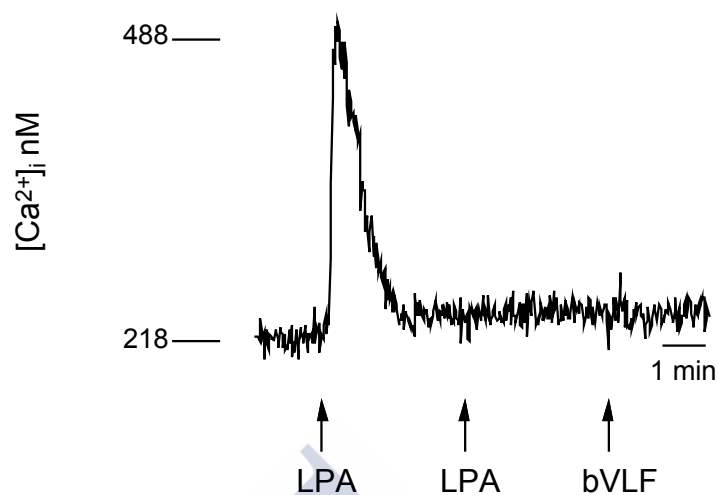
#### 4.3.- Desensibilización cruzada con el LPA.

Con objeto de obtener mayor conocimiento sobre el mecanismo de acción del bVLF, este fue comparado con el LPA, considerando que la activación de la movilización de calcio intracelular es una de las respuestas tempranas celulares inducidas por LPA (77-82). Como se muestra en la Figura 19A, la adición de LPA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) indujo un aumento máximo de movimiento de calcio intracelular a los 4-10 segundos post-estimulación. Este incremento fue transitorio, volviendo a niveles basales tras un periodo de 1-3 min. Tras inducir la desensibilización homóloga del receptor del LPA por estimulación repetida del mismo, la adición de una dosis saturante del bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ) no indujo movilización de calcio. Sin embargo cuando el orden de los estímulos fueron invertidos se pudo constatar que el bVLF no indujo desensibilización homóloga a pesar de la administración de dosis saturantes (1  $\mu\text{g/ml}$ ) ni tampoco causó desensibilización heteróloga para el LPA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figura 19B). Este resultado fue sorprendente ya que si se asume que el señalamiento está mediado por PI-PLC, el DAG sería generado en paralelo con el  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , induciendo la activación de la PKC, que cerraría el sistema evitando activación posterior por el bVLF o el LPA.

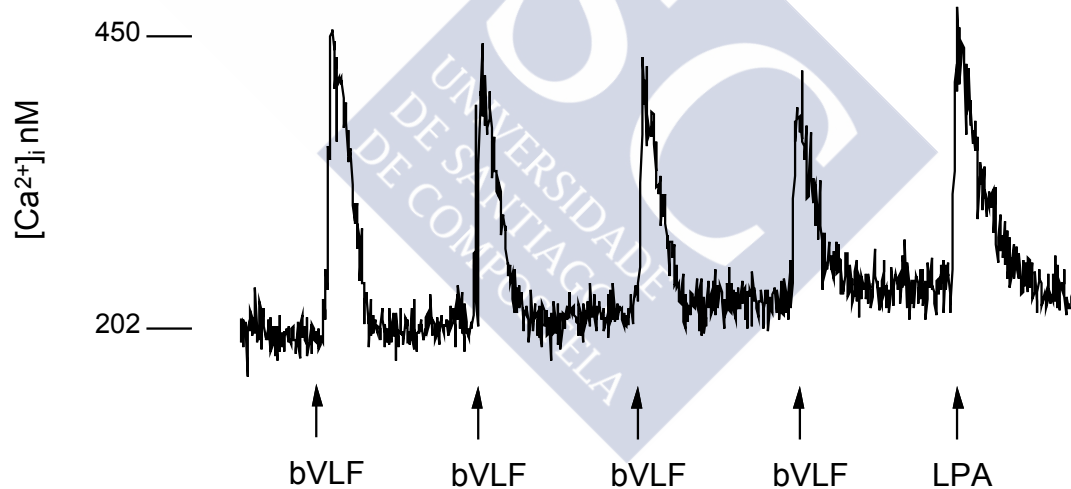
#### 4.4.- Generación de inositoles totales.

Con objeto de evaluar la implicación de la PI-PLC, se estudió la generación de los inositoles fosfato tras la estimulación de las células con el bVLF, y otros estímulos como el LPA, S1P así como el EGF, estímulos que activan la hidrólisis de  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ . Como se muestra en la Figura 20, al contrario de lo que ocurre en el caso del LPA (5  $\mu\text{g/ml}$ ), S1P (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y EGF (50 nM) que inducen un aumento significativo de la producción de inositoles totales, la movilización de calcio en respuesta al bVLF (5  $\mu\text{g/ml}$ ) no requiere la hidrólisis previa del  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ , lo que sugiere la participación de depósitos independientes, no regulados por  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , y por lo tanto de una ruta alternativa.

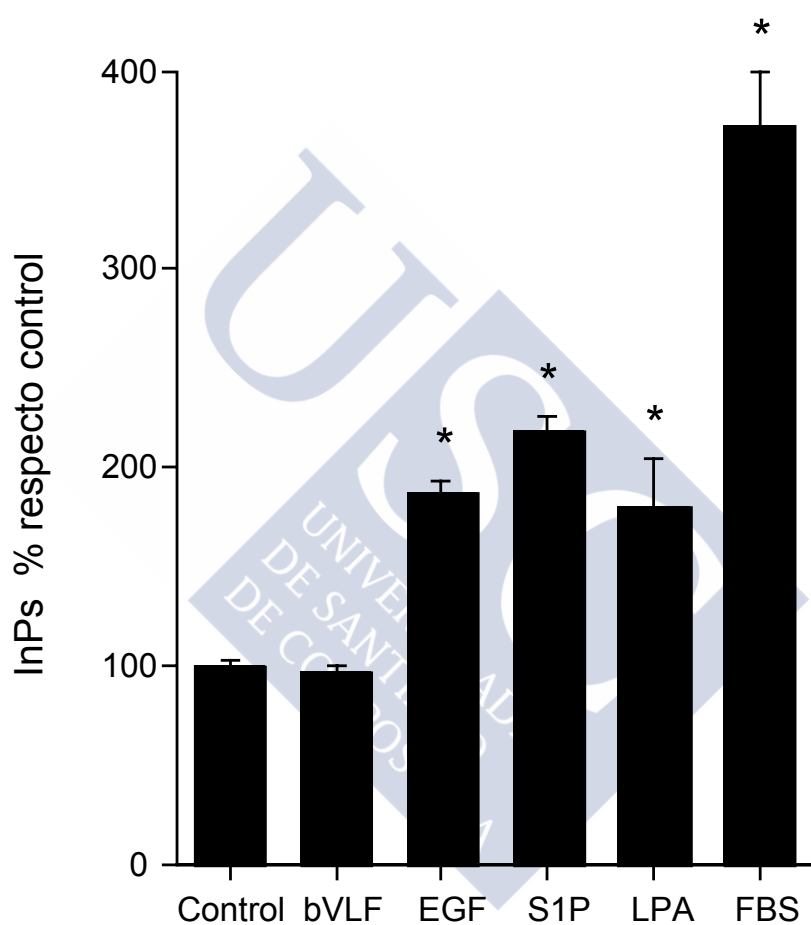
A



B



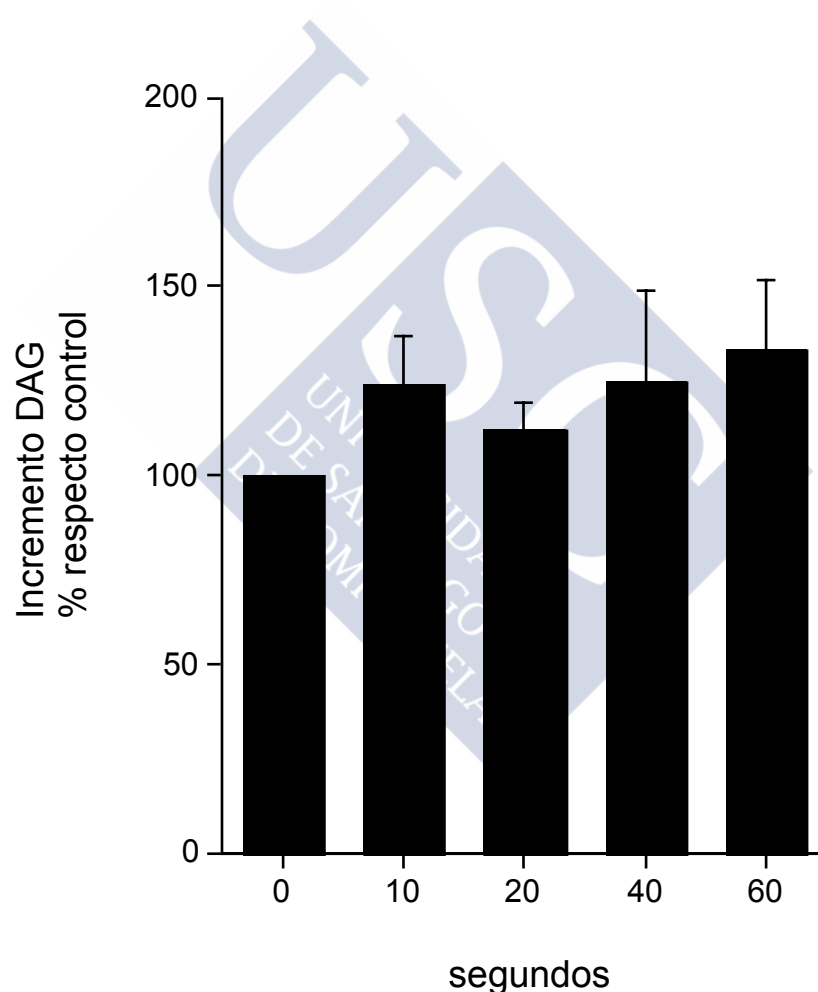
**Figura 19.- Desensibilización cruzada entre las respuestas del LPA y el bVLF en células EGFR-T17.** A) La adición secuencial del LPA induce desensibilización homóloga del receptor del LPA, y la desensibilización heteróloga del receptor del bVLF. B) La adición secuencial del bVLF no induce una desensibilización de la respuesta de calcio, ni tampoco afecta la respuesta al LPA. Las dosis utilizadas en los experimentos fueron: LPA (1  $\mu\text{g/ml}$ ), bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ).



**Figura 20.- Efecto del bVLF sobre la generación de inositoles totales en células EGFR T17.** Las células se marcaron durante 24 h en medio suplementado con *mio* [ $2\text{-}^3\text{H}$ ] inositol 2  $\mu\text{Ci/ml}$  y se estimularon con el bVLF (5  $\mu\text{g/ml}$ ), EGF (50 nM), LPA (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y S1P (5  $\mu\text{g/ml}$ ), en presencia de LiCl (10 mM). La reacción se detuvo con ácido tricloroacético, y los inositoles totales se extrajeron como se describe en Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje sobre el valor control (sin estímulo) (media  $\pm$  EE).

#### 4.5.- Generación del DAG.

Para confirmar los resultados previos, que parecían descartar la activación de la PI-PLC por el bVLF, se estudió la generación del DAG a diferentes tiempos, en fibroblastos estimulados con el bVLF (5  $\mu\text{g/ml}$ ). La Figura 21 no muestra aumento significativo alguno sobre la generación de DAG tras la estimulación con el bVLF (5  $\mu\text{g/ml}$ ), lo que sugiere que si el DAG es generado sería transformado inmediatamente. La otra opción es la no participación del DAG en la ruta de calcio activada por el bVLF.



**Figura 21.-** Las células EGFR-T17 marcadas con ácido [ $^3\text{H}$ ]mirístico durante 48 h como se describe en Métodos, se estimularon con el bVLF (5  $\mu\text{g/ml}$ ) durante diferentes tiempos y el DAG generado se determinó por TLC. Resultados (media  $\pm$  EE) de tres experimentos independientes, expresados como porcentaje sobre el valor control (sin estímulo) (media  $\pm$  EE).

## **5.- EVALUACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DE PROTEÍNAS G EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN.**

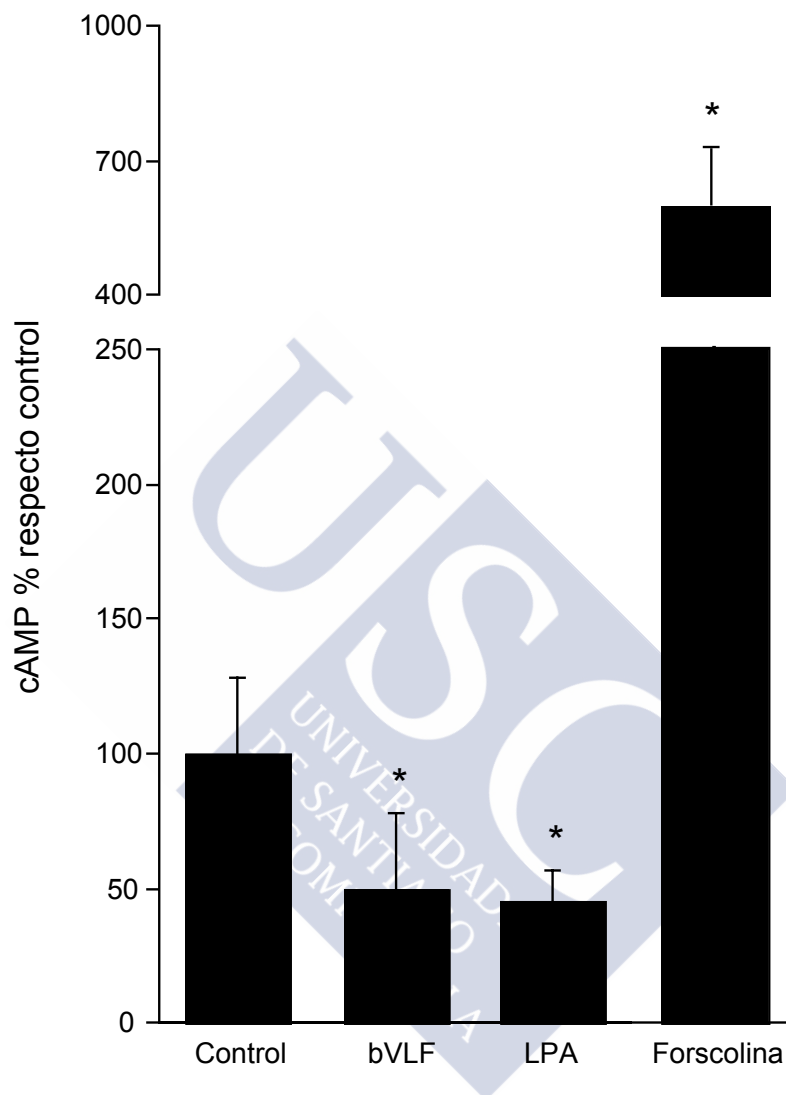
Se evaluó el efecto de la PTX sobre la respuesta de calcio para el bVLF y el LPA. La Figura 17 muestra la respuesta a diferentes dosis del bVLF en células control y células preincubadas con PTX (100 ng/ml) durante 2 h. Se pudo constatar como la inhibición por PTX se mantuvo para todas las dosis utilizadas del bVLF, sin que se modificase de forma significativa la respuesta del LPA (1 µg/ml). Las subunidades α de las proteínas G que acopla a receptores implicados en la ruta de PLC-Ins(1,4,5)-Ca<sup>2+</sup> pertenecientes a la subfamilia de las G<sub>q</sub>, no son sensibles al tratamiento con PTX (83,84). Para el bVLF, la proteína G implicada, parece sensible a PTX, y, por lo tanto, no acopla a PI-PLC. De hecho, ninguno de los productos generados por esta enzima Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> y DAG parece aumentar tras la estimulación con el bVLF en las células EGFR-T17.

## **6.- IMPLICACIÓN DEL bVLF EN LA GENERACIÓN DEL cAMP.**

Tras observar que la proteína G implicada en la señal de transducción activada por el bVLF parecía ser una proteína G sensible a PTX, se estudió la posible implicación de la vía del cAMP en células EGFR-. La activación de la adenilato ciclasa (AC) con forskolina 1µM, un activador directo de la subunidad catalítica de esta enzima, produjo un aumento significativo de la generación de cAMP (Figura 22). Por el contrario, la estimulación de las células con bVLF (5 µg/ml) o LPA (5 µg/ml) indujo una clara inhibición de la generación de cAMP con respecto a células no estimuladas (Figura 22).

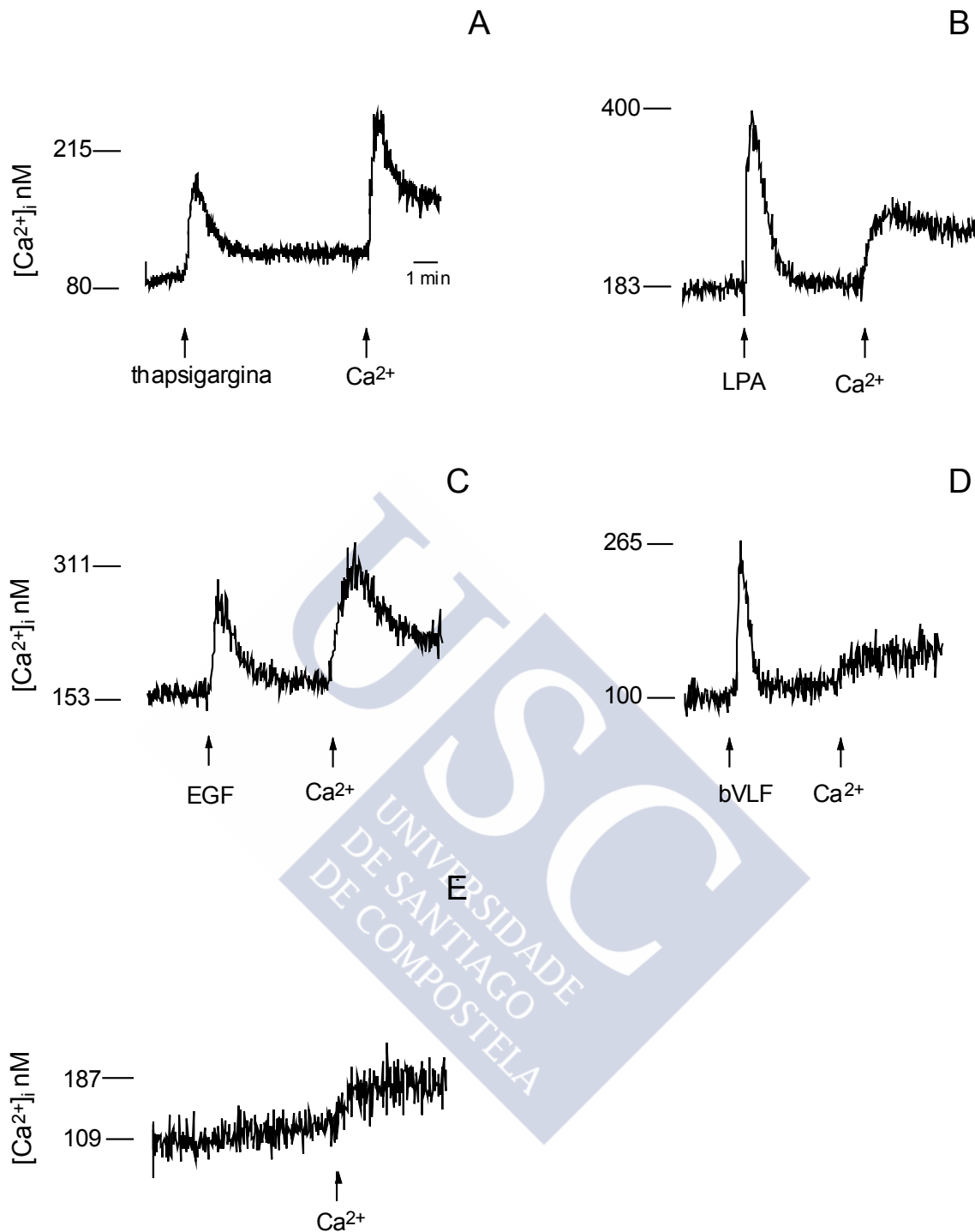
## **7.- ENTRADA CAPACITATIVA DE CALCIO.**

En las células NIH 3T3, la movilización de calcio de depósitos sensibles a Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> está dinámicamente acoplada al calcio extracelular. Tras la activación de la vía de Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup> por agonistas (LPA o EGF, por ejemplo) que activan la hidrólisis de PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, se produce una disminución de los niveles de calcio de los depósitos intracelulares sensibles a Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> que lleva consigo una apertura de canales capacitativos de calcio a nivel de la membrana plasmática (85,86).



**Figura 22.- Efecto del bVLF sobre la generación de cAMP en fibroblastos EGFR-T17.** Las células se incubaron con IBMX (1 mM ) durante 20 min a 37 °C, tras lo cual se estimularon con bVLF (5 µg/ml), LPA (5 µg/ml) y forskolina (1 µM) manteniendo la concentración de IBMX, después de 30 min a 37 °C se analizaron los niveles de cAMP. Los resultados se expresan como porcentaje sobre el valor control (sin estímulo) (media ± EE).

Como la redistribución de  $\text{Ca}^{2+}$  que sigue tras la administración del bVLF parece ser originado por depósitos no sensibles a  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , se analizó el efecto del bVLF sobre la entrada capacitativa de calcio se analizó el efecto del bVLF sobre la entrada capacitativa de calcio. Como se muestra en la Figura 23A la adicción de thapsigargina a células EGFR-T17 en suspensión en un medio libre de calcio fue seguido de un incremento pasajero de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; consecuencia del vaciado de los depósitos intracelulares. Cuando el calcio extracelular es restaurado, se produjo una entrada capacitativa de calcio (Figura 23A). Una entrada capacitativa similar se observó tras la restauración del calcio extracelular en células preestimuladas con LPA (Figura 23B) o EGF (Figura 23C) en medio sin calcio. Por el contrario, cuando las células fueron preestimuladas con el bVLF en ausencia de calcio extracelular, se produjo un incremento menor tras la restauración del calcio extracelular (Figura 23D), efecto que no es muy diferente al que se observó cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular fue restaurado en células control, no estimuladas (Figura 23E). Este resultado sugiere que la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el bVLF no parece funcionalmente acoplada a una entrada capacitativa de calcio, dato que refuerza la hipótesis de que los depósitos activados por este factor son diferentes de los depósitos sensibles a  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ .



**Figura 23.- Estimación de la entrada capacitativa de calcio activada por el bVLF en células EGFR-T17.** Las medidas de calcio se realizaron en células resuspendidas en medio libre de calcio. Al final de cada experimento, el  $Ca^{2+}$  extracelular fue restaurado (flecha) con objeto de evaluar la entrada capacitativa de calcio. La adición de thapsigargina (50 nM) (A) indujo una entrada capacitativa de calcio tras la restauración del calcio extracelular. Después de la estimulación con el LPA (1  $\mu$ g/ml) y EGF (10 nM) (C), la restauración de calcio del medio extracelular fue seguido por una entrada de calcio. La magnitud de la entrada de  $Ca^{2+}$  fue muy pequeña en células estimuladas con el bVLF (1  $\mu$ g/ml) (D) y no diferente de las células control (E), no estimuladas.

## **8.- ESTUDIO DE UNA RUTA ALTERNATIVA RESPONSABLE DE LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INDUCIDA POR EL bVLF EN CELULAS EGFR-T17.**

En los últimos años ha sido reconocida la importancia biológica de numerosos lípidos como el LPA, la S1P y la SPC que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G regulando diversas funciones biológicas a través de diferentes rutas de señalización en diferentes líneas celulares.(78,82,87-93), Por lo que se realizaron diversos ensayos para determinar la ruta que estaba siendo activada por el bVLF, descartando la ruta de movilización calcio intracelular inducida por la generación de los  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  a través de la PI-PLC.

### **8.1.- Implicación de la fosfolipasa D específica de fosfatidilcolina (PC-PLD).**

La implicación de la fosfolipasa D (PLD) en la movilización de calcio intracelular activado por el bVLF, se evaluó en base a estudios de transfosforilación de butanol (BuOH) a fosfatidilbutanol (PtdBuOH) catalizado por la PLD. Como muestra la Figura 24, la movilización de calcio en respuesta al bVLF (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) no activa la PLD, al no observar aumento de PtdBuOH respecto a células control.

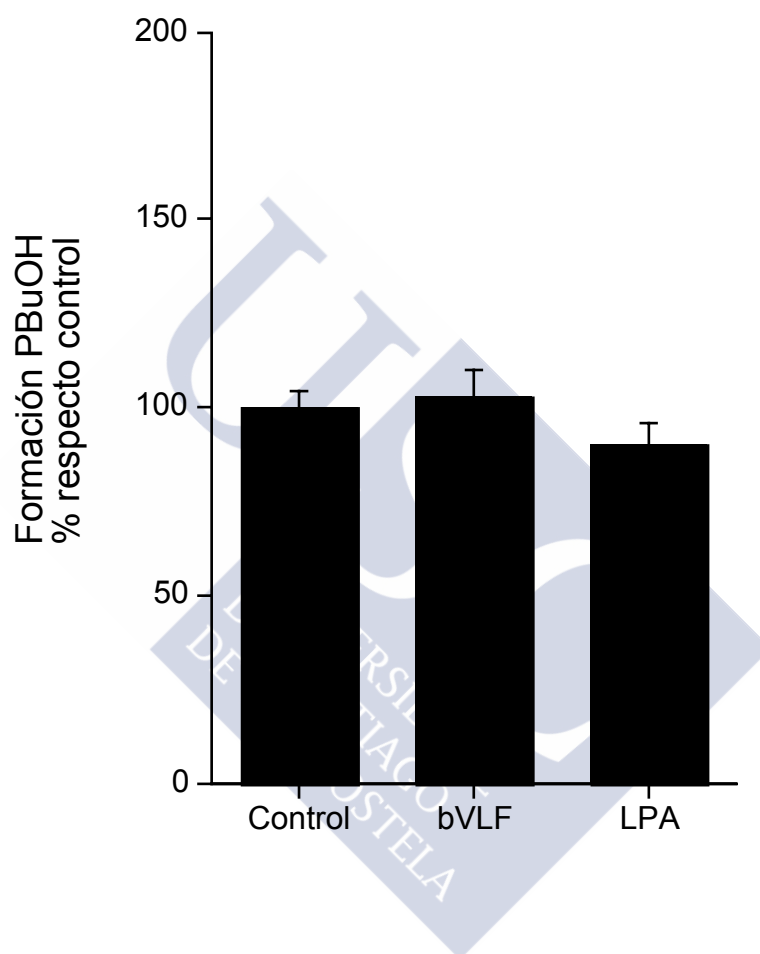
### **8.2.- Implicación de la fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) y la diacilglicerol quinasa (DAG-K).**

En estos últimos años se ha postulado la existencia de rutas alternativas responsables de la movilización de calcio de depósitos no sensibles a  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . Esta movilización podría ser activada en diversos sistemas celulares por la fosfolipasa C específica (PC) generando así diacilglicerol (DAG) y fosfocolina (94,95). El DAG formado sería convertido a ácido fosfatídico (PA, phosphatidic acid) por acción de la diacilglicerol quinasa (DAG-K), el cual activaría la redistribución de calcio de depósitos intracelulares no sensibles a  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  (94,95). Con objeto de comprobar la posible activación de esta vía por el bVLF, se utilizó un inhibidor específico de la DAG-K R59022 (96). Como se muestra en la Figura 25A-B, la preincubación (10  $\mu\text{M}$ , 30 min) en presencia de este inhibidor causó una clara inhibición de la respuesta de calcio inducida por el bVLF (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

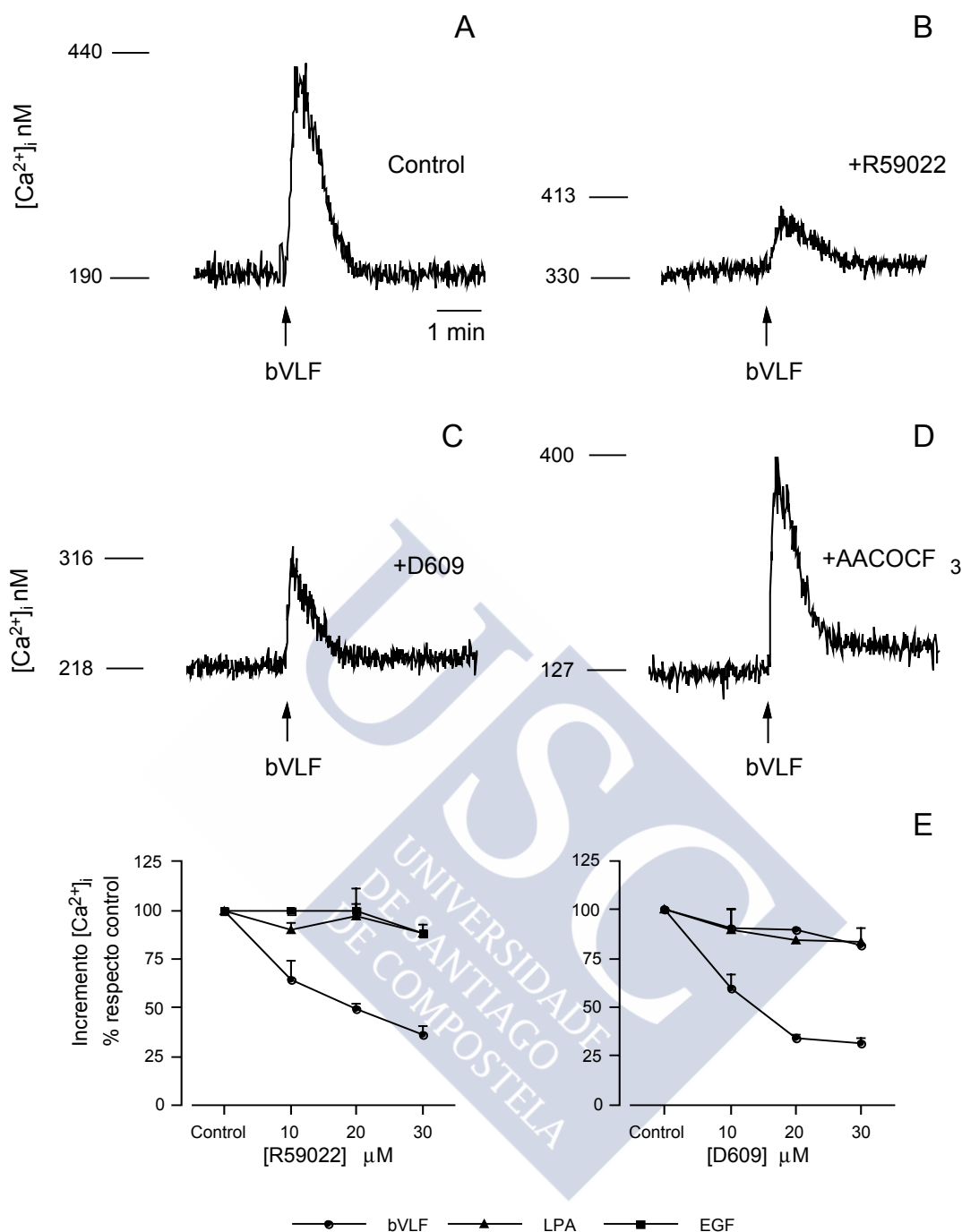
sugiriendo que esta vía podría estar implicada en la movilización de calcio en respuesta al bVLF. Esta idea se reforzó tras la inhibición que se observó después del pretratamiento con D609 (10  $\mu$ M, 5min) (97) un inhibidor específico de la PC-PLC (Figura 25C). El efecto inhibitorio del R59022 y del D609 parece ser específico, ya que no se observó inhibición significativa cuando la células fueron estimuladas con EGF o LPA (Figura 25E). Además, la falta de efecto del inhibidor específico de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, AACOCF3 (10  $\mu$ M, 5 min) sobre la movilización de calcio inducida por el bVLF (Figura 25D) respalda la idea de una acción directa del PA sobre los depósitos intracelulares de calcio más que una acción directa mediada por la conversión a LPA por PLA<sub>2</sub>, como se ha demostrado para la esfingosilfosforilcolina (SPC) (54).

### **8.3.- Generación de ácido fosfatídico (PA) intracelular.**

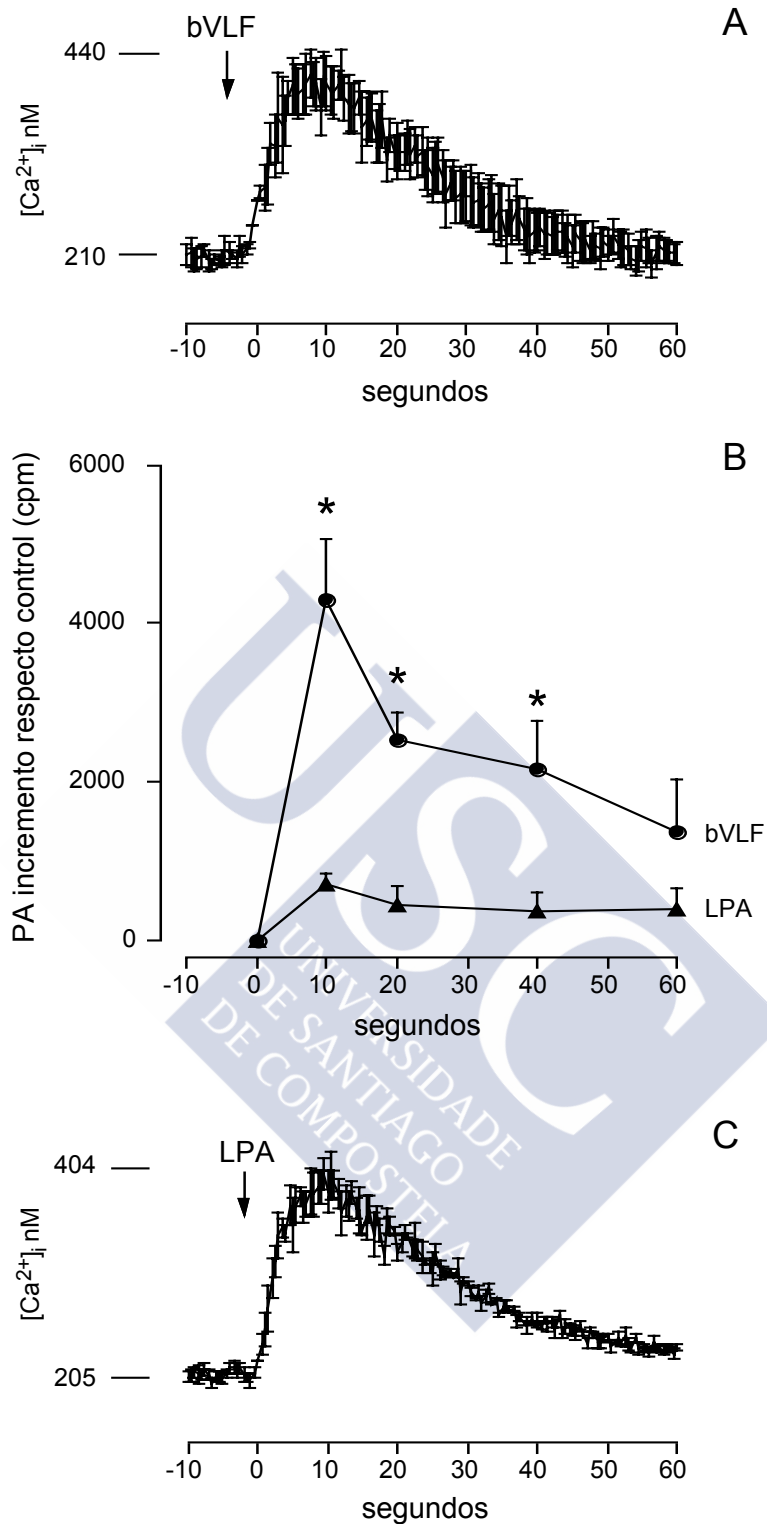
Cuando los niveles intracelulares de calcio y PA fueron correlacionados en células estimuladas con el bVLF (5  $\mu$ g/ml) o el LPA (5  $\mu$ g/ml), se hizo patente que tras la administración del bVLF se produjo un rápido y pasajero incremento de los niveles de PA (Figura 26B) cuyo transcurso temporal fue paralelo a la elevación de calcio intracelular inducida por este factor. Este fenómeno no se observó para el caso del LPA (98).



**Figura 24.- Efecto del bVLF sobre la activación de la PLD en las células EGFR-T17.** El producto de la reacción de la transfosforilación de la PLD, es el fosfatidilbutanol (PtdBuOH) en presencia de butanol (BuOH) que se midió por TLC tras la estimulación con el bVLF (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y el LPA (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados se expresan como porcentaje sobre el valor control (sin estímulo) (media  $\pm$  EE).



**Figura 25.- Efecto de los inhibidores de DAG-K, PC-PLC en la movilización de  $Ca^{2+}$  inducida por bVLF, en células EGFR-T17.** A) Células control estimuladas con una dosis saturante del bVLF (1  $\mu$ g/ml). B) Células pretratadas con el inhibidor de la DAG-K, R59022 (10  $\mu$ M, 30 min). Como la inhibición de la DAG-K provoca acumulo de DAG, los experimentos se realizaron en presencia de un inhibidor de la PKC como es la estaurosporina (1  $\mu$ M) para evitar interferencias. C) Células pretratadas con el inhibidor de la PI-PLC, D609 (10  $\mu$ M, 5 min) las cuales fueron estimuladas con una dosis saturante del bVLF (1  $\mu$ g/ml). D) Células pretratadas con el inhibidor de PLA<sub>2</sub>, AACOCF<sub>3</sub> (10  $\mu$ M, 5 min). E) Dosis-respuesta del efecto de R59022 y D609 sobre el aumento de  $Ca^{2+}$  inducido por dosis saturantes del bVLF (1  $\mu$ g/ml), LPA (1  $\mu$ g/ml), y EGF (10 nM). Ninguno de estos inhibidores afecta a la respuesta de  $Ca^{2+}$  inducida por el LPA y el EGF. Los resultados están expresados como porcentaje respecto a la máxima respuesta obtenida (media  $\pm$  EE).



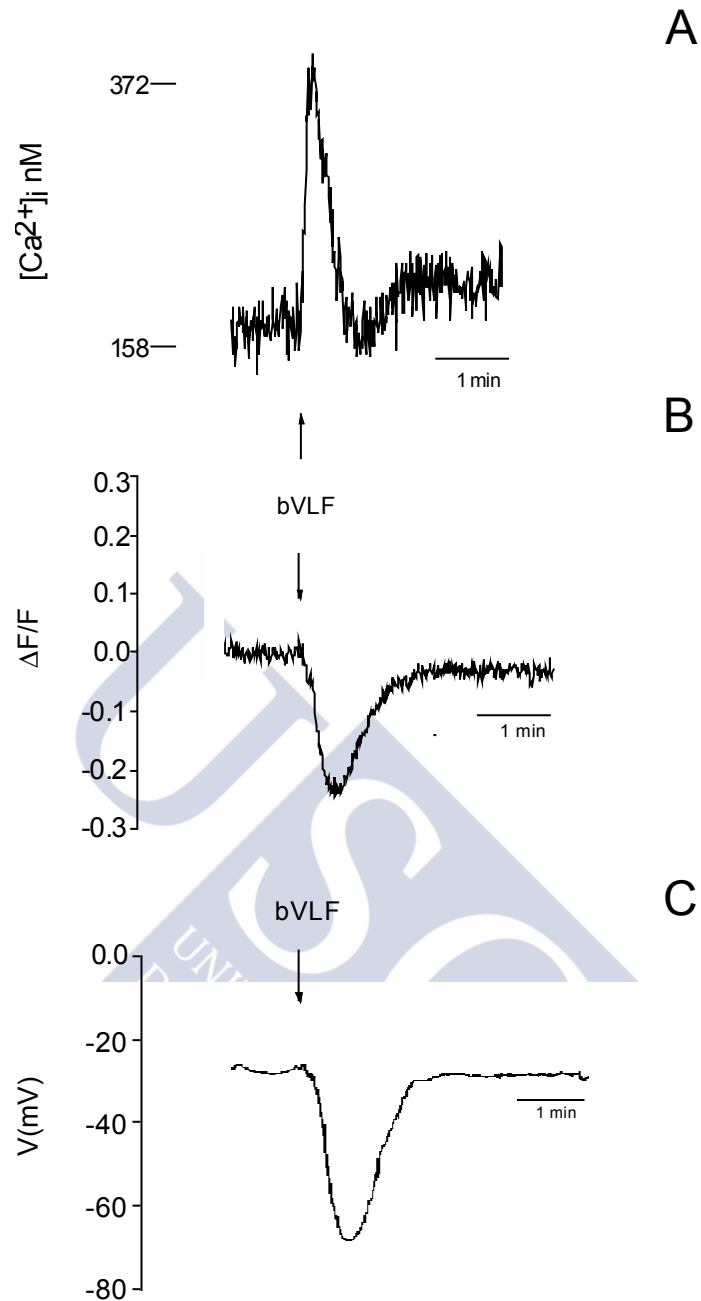
**Figura 26.- Correlación temporal de los niveles de Ca<sup>2+</sup> y PA en células estimuladas con el bVLF y el LPA, en células EGFR-T17.** De forma paralela las placas subconfluente fueron (i) resuspendidas y marcadas con fura-2 para la monitorización de los niveles de Ca<sup>2+</sup> en respuesta al bVLF (1 µg/ml, flecha)(A), o el LPA (1 µg/ml)(C); (ii) marcadas con ácido [<sup>3</sup>H] mirístico para la determinación de la generación de PA después de la estimulación con el bVLF o el LPA (ambos 5 µg/ml) por TLC (B). Resultados (media ± EE) de tres experimentos independientes, expresados en B como incremento (en cpm) sobre el control.

## 9.- EFECTO DEL bVLF SOBRE EL POTENCIAL DE MEMBRANA (Vm)

Se realizaron numerosos ensayos para determinar el efecto del factor bVLF sobre el potencial de membrana en fibroblastos EGFR-T17, utilizando una sonda fluorescente bis-oxonol en combinación con la técnica electrofisiológica denominada *whole cell patch-clamp*. Esta última permite estudiar las propiedades de los canales iónicos a través de la unión de una micropipeta de vidrio a la membrana celular de forma hermética. Utilizando esta técnica, se puede registrar el comportamiento eléctrico de la célula de forma similar a como se haría con un microelectrodo pero con la opción adicional de poder alterar la composición química de la célula.

### 9.1.- Caracterización del efecto del bVLF sobre el Vm en células EGFR-T17.

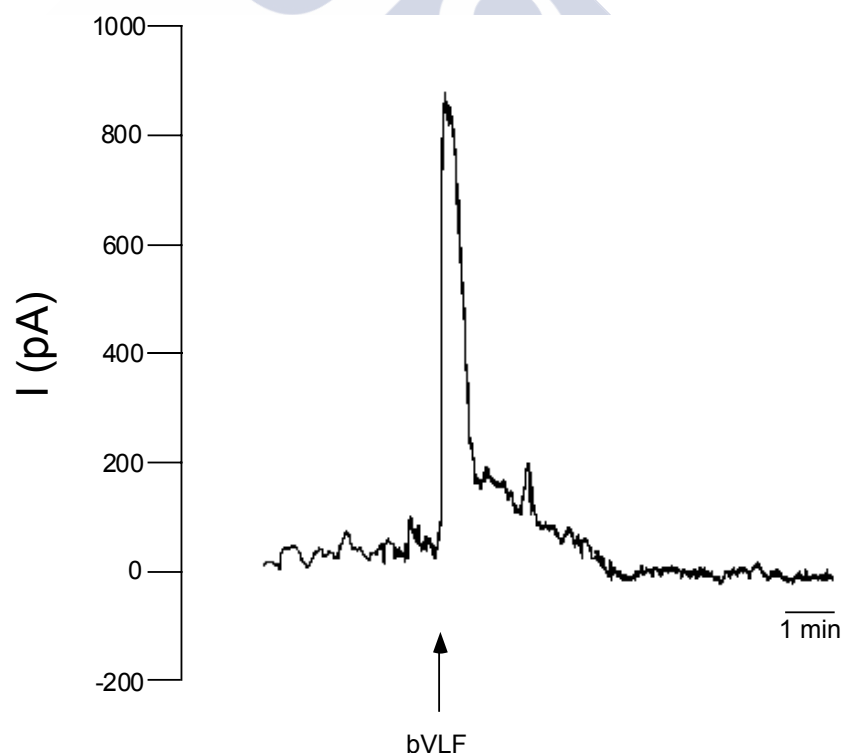
A nivel del potencial de membrana, se pudo observar que la estimulación con el bVLF (1 µg/ml) indujo una marcada hiperpolarización, que resultó ser concomitante con la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular (Figura 27). Dicha señal se caracterizó por una disminución rápida de la fluorescencia a los 30-40 s tras la estimulación, seguido de un lento retorno a los niveles basales a los 1.3-1.5 min después de la estimulación (n=60). Para confirmar este efecto, se realizaron estudios con la técnica *whole-cell patch-clamp*, en modo *current-clamp*, a raíz de los cuales se confirmó que el factor bVLF (1 µg/ml) inducía una rápida hiperpolarización con un pico máximo a los 20-30 s desde el valor de reposo de la membrana  $30.6 \pm 0.7$  mV (n=200) a  $-70 \pm 3.0$  mV (n=19), seguida de una rápida repolarización hasta la recuperación de los valores de potencial preestimulatorios a los 1.5-2 min, sin la presencia de oscilaciones en el potencial de membrana (Figura 27C). Las diferencias temporales que se observan entre las respuestas obtenidas tras el análisis en el *patch-clamp* y con el bis-oxonol, pueden ser debidas a la lentitud en el mecanismo de redistribución del bis-oxonol. Esta técnica no invasiva, permite obtener resultados sobre el efecto de inhibidores, agonistas etc. Sin embargo, el bis oxonol no permite realizar un análisis cuantitativo exacto de los cambios en el potencial de membrana.



**Figura 27.- Efecto del bVLF sobre el potencial de membrana ( $V_m$ ) y la  $[Ca^{2+}]_i$  en fibroblastos EGFR-T17.** A) El tratamiento con el bVLF (1  $\mu$ g/ml) induce un incremento en los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular, en fibroblastos EGFR-T17 marcados con la sonda fluorescente Fura-2. B) El bVLF (1  $\mu$ g/ml) induce una hiperpolarización de membrana, medido con el marcador fluorescente bis-oxonol. C) Inducción de una hiperpolarización de membrana tras el tratamiento con el bVLF (1  $\mu$ g/ml) en células en monocapa, efecto medido con la técnica *whole cell patch-clamp* en modo *current clamp*.

## 9.2.- Caracterización de las corrientes iónicas asociadas a la hiperpolarización.

Para determinar que corrientes iónicas estaban implicadas en la señal de hiperpolarización de membrana producida por el factor lipídico bVLF, se realizaron estudios con *whole-cell patch-clamp* en modo *voltage clamp* en células en monocapa. A un potencial de trabajo de  $-30$  mV, el bVLF ( $1$   $\mu\text{g/ml}$ ) indujo una corriente rápida de salida, con un máximo de amplitud de  $740 \pm 63$  pA ( $n=25$ ) (Figura 28), la cual se vio completamente anulada a los 1.5-2 min después de alcanzar su valor máximo. Corriente de salida que resultó ser concomitante con los cambios en el potencial de membrana, por lo que se pensó en la posibilidad de que estos procesos estuvieran acoplados evaluándose la participación de una corriente de salida de cationes.



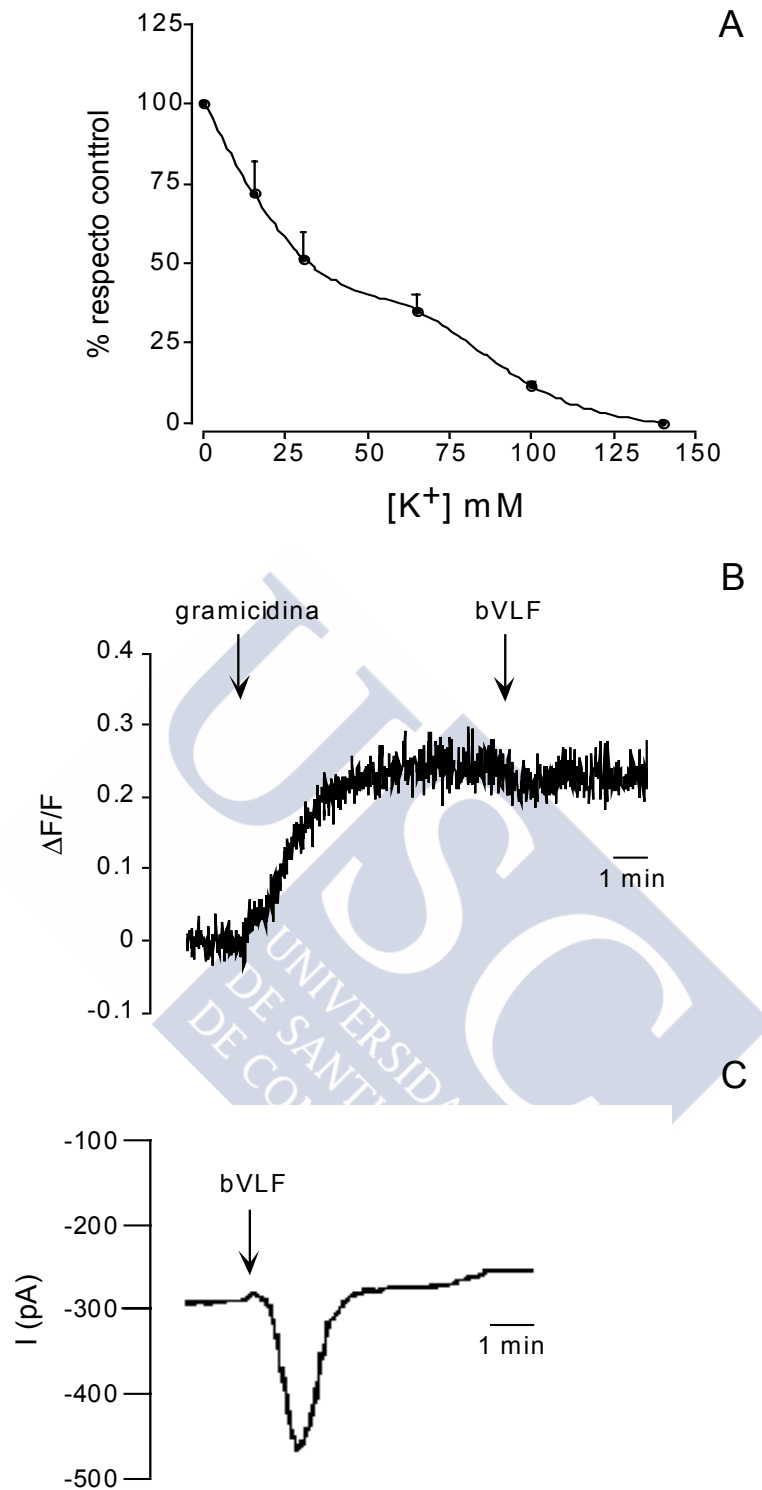
**Figura 28.- Corriente de salida al medio extracelular activada por el bVLF, en células EGFR-T17.** Esta corriente fue medida en células en monocapa. Mediante la técnica de célula entera en modo *voltage-clamp* a un potencial de  $-30$ mV.

De los 15 ensayos realizados en células aisladas y realizados a un potencial fijo de -30 mV, el bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ) no indujo ninguna corriente significativa de salida, posiblemente por el medio intracelular artificial impuesto a la célula a través de la disolución de la pipeta. En estas células tampoco se observó la hiperpolarización de membrana tras el estímulo con el bVLF. Esto indica que la corriente de salida medida en células en monocapa fue originada por las células que están rodeando a la célula acoplada a la pipeta. Por lo que se descarta la evaluación del tipo de corriente en célula aislada mediante la determinación del potencial inverso. Ello impuso la utilización de células en monocapa para el estudio de las corrientes iónicas. Este tipo de abordaje excluye una estimación inequívoca del potencial inverso de las curvas IV (Intensidad de Voltaje), pero permite la medición de las propiedades cualitativas de las corrientes. A este respecto, se describió recientemente una situación similar en células Rat-1, en las cuales el LPA induce una despolarización (61).

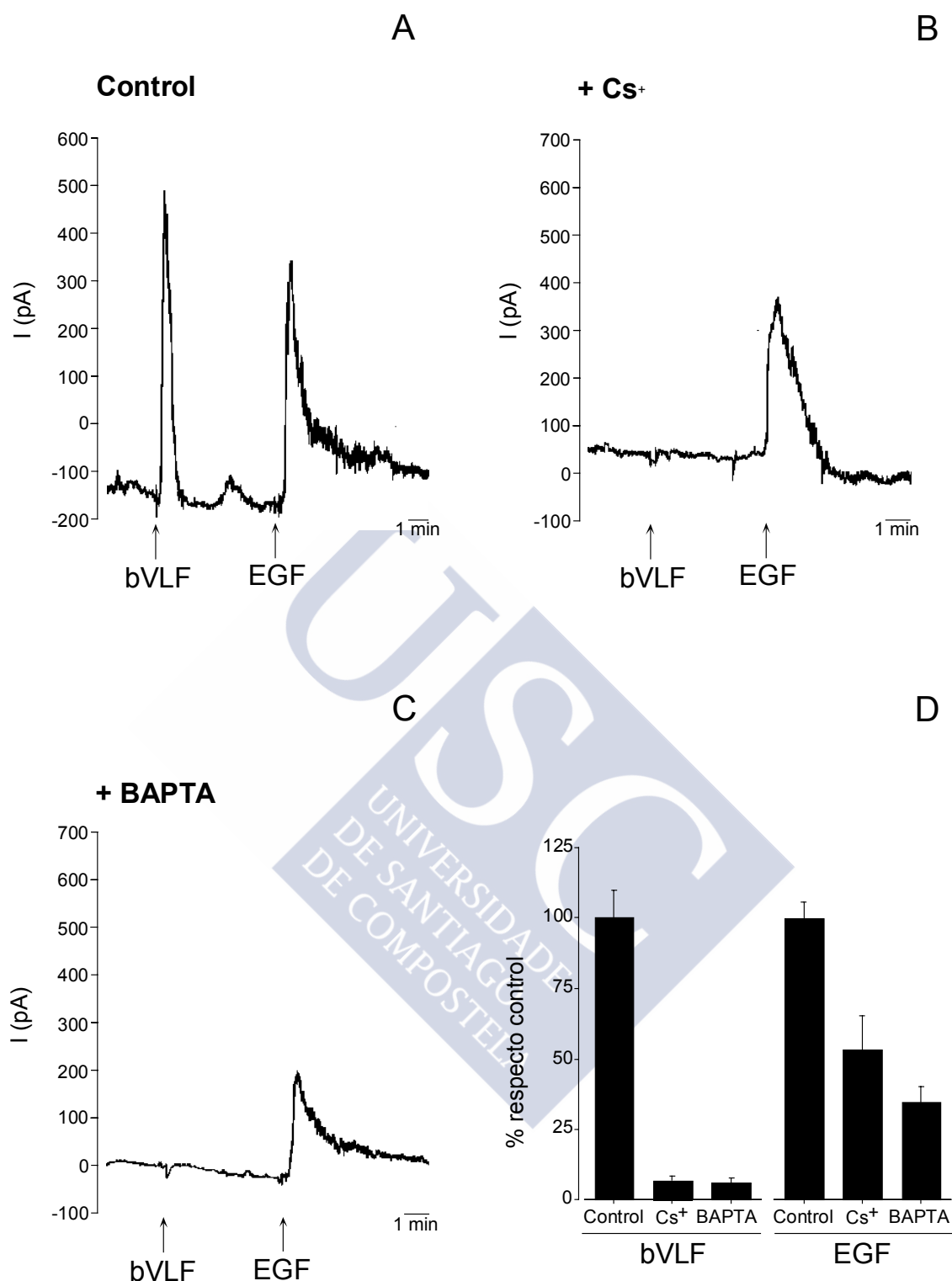
Para determinar concretamente que ión o iones estaban implicados en la respuesta de hiperpolarización activada por el bVLF, se realizaron experimentos en los cuales se utilizaron sustituciones iónicas tanto en el medio extracelular como en el medio intracelular. En primer lugar, se estudio la implicación del  $\text{Na}^+$ , mediante la sustitución este catión por colina en el medio extracelular lo cual no produjo ninguna modificación significativa en la respuesta de hiperpolarización inducida por el bVLF ( $3.3 \pm 5.6$  de inhibición,  $n=5$ ). En los ensayos realizados de sustitución de los iones  $\text{Cl}^-$  por gluconato, la respuesta de hiperpolarización no se vio significativamente inhibida. Estos resultados demostraban que los iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Na}^+$  no estaban implicados. Sin embargo, cuando se incrementó la concentración de  $\text{K}^+$  en el medio extracelular, en un rango de 5 a 160 mM, se observó una disminución progresiva de la respuesta de hiperpolarización alcanzando un máximo de inhibición a concentraciones de  $\text{K}^+$  de 140 mM ( $n=5$ ; Figura 29). Paralelamente se observó la inhibición de la respuesta cuando se inducía una disipación del gradiente electroquímico de  $\text{K}^+$ , tras el tratamiento con gramicidina (1  $\mu\text{g/ml}$  en colina-KRH,  $n=8$ ; Figura 29B). En general, estos datos parecían sugerir que la hiperpolarización inducida por el bVLF podría ser causada por corrientes de  $\text{K}^+$ . Estos resultados se confirmaron mediante ensayos de *whole-cell patch clamp (modo voltage-clamp)*, en los que el gradiente electroquímico de  $\text{K}^+$  fue invertido mediante la sustitución del medio extracelular por una disolución que contenía 150 mM de  $\text{K}^+$ . Una vez alcanzados valores de 0 mV en el  $V_m$  (modo *current clamp*), se aplicó un

potencial fijo de -30 mV (en modo *voltage clamp*) y se estimularon las células con el bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Para todos los ensayos el bVLF activó corrientes de entrada con amplitudes de  $182 \pm 23$  pA ( $n=12$ ; Figura 29C), mostrando una dinámica mucho más lenta que en condiciones control. Ensayos realizados en los que el  $\text{K}^+$  fue sustituido por  $\text{Cs}^+$  en la disolución de la pipeta (intracelular) mostraron una disminución de la corriente de salida activada por el bVLF ( $50 \pm 12$  pA; Figura 30B y D). Este tipo de ensayos mostraron además la capacidad de difusión de los iones de  $\text{Cs}^+$  a las células circundantes a la ligada a la pipeta, probablemente a través de las uniones gap. Sin embargo, la corriente de salida inducida por el EGF (10 nM), el cual activa canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , no se vio completamente inhibida tras la sustitución con  $\text{Cs}^+$ , en las mismas células y con la misma técnica (control  $390 \pm 62$  pA  $n=13$ , tratamiento con  $\text{Cs}^+$   $230 \pm 51$  pA,  $n=13$ ; Figura 30B y C). Estos resultados parecen corroborar que la hiperpolarización inducida por el bVLF es debido a la activación de un canal de  $\text{K}^+$  que presenta diferentes propiedades que los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por el EGF. Estas diferencias podrían ser explicadas, teniendo en cuenta, que los canales de  $\text{K}^+$  presentan diferencias en la permeabilidad al  $\text{Cs}^+$  (99).





**Figura 29.-** A) Efecto del aumento de la de  $[K^+]_o$  sobre la hiperpolarización producida por el bVLF, en células EGFR-T17 medido por fluorimetría utilizando la sonda bis-oxonol. Los resultados se expresaron como porcentaje de la respuesta máxima. B) Efecto de la disipación del gradiente electroquímico de  $K^+$  sobre la hiperpolarización inducida por el bVLF (1  $\mu$ g/ml) mediante la incubación de las células con gramicidina (1  $\mu$ g/ml en KRH-colina). Medida realizada con el marcador bis-oxonol. C) Corriente de entrada medida en células en monocapa en respuesta al bVLF (1  $\mu$ g/ml) bajo un potencial de -30 mV y una concentración de  $K^+$  extracelular de 150 mM.



**Figura 30.-** A) Corrientes de salida activadas por el bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ) y el EGF (10 nM), bajo condiciones control. B) Efecto de la sustitución de  $\text{K}^+$  por  $\text{Cs}^+$  en el medio intracelular, en las respuestas del bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ) y el EGF (10 nM). C) Efecto del BAPTA (50  $\mu\text{M}$ ) en el medio intracelular sobre las respuestas al bVLF y el EGF. Todos los ensayos se realizaron mediante la técnica de *whole cell patch-clamp* en modo *voltage-clamp* a un potencial de -30 mV. D) Media de los datos obtenidos para los ensayos con  $\text{Cs}^+$  y BAPTA. Los resultados están expresados como porcentaje de la máxima respuesta para cada estímulo (media  $\pm$  EE). Los ensayos se realizaron en células EGFR-T17.

### **9.3.- Efecto de los inhibidores de canales de K<sup>+</sup> sobre la hiperpolarización inducida por el bVLF.**

La caracterización del tipo de canal de K<sup>+</sup> se realizó en base a la sensibilidad de este tipo de canales a diferentes inhibidores utilizando la sonda fluorescente bis-oxonol.

Los efectos fueron comparados con la respuesta que induce el EGF (10 nM), que se ha descrito que activa canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> (60,100,101). Los resultados están esquematizados en la TABLA 4. Ni la apamina (1 μM) y D-tubocurarina (500 μM), inhibidores de algunos canales de K<sup>+</sup> dependientes de Ca<sup>2+</sup> de baja conductancia, no inhibieron la respuesta del bVLF ni del EGF. La 4-aminopiridina (5 mM) inhibidor no selectivo de canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje, no inhibió la respuesta del EGF, sin embargo la señal de hiperpolarización del bVLF se vio inhibida significativamente (62,5% de inhibición). Concentraciones elevadas de cloruro de tetraetilamonio (150 mM) inhibieron parcialmente la respuesta del bVLF (44.7% de inhibición), siendo mayor la inhibición sobre la respuesta del EGF (72.7% de inhibición). Los inhibidores inespecíficos de canales de K<sup>+</sup> como son la quinina y quinidina (1 mM), fueron los mas potentes y efectivos a la hora de inhibir tanto la respuesta de hiperpolarización del bVLF (79.5-83.5% de inhibición, respectivamente) como del EGF (100% inhibición).

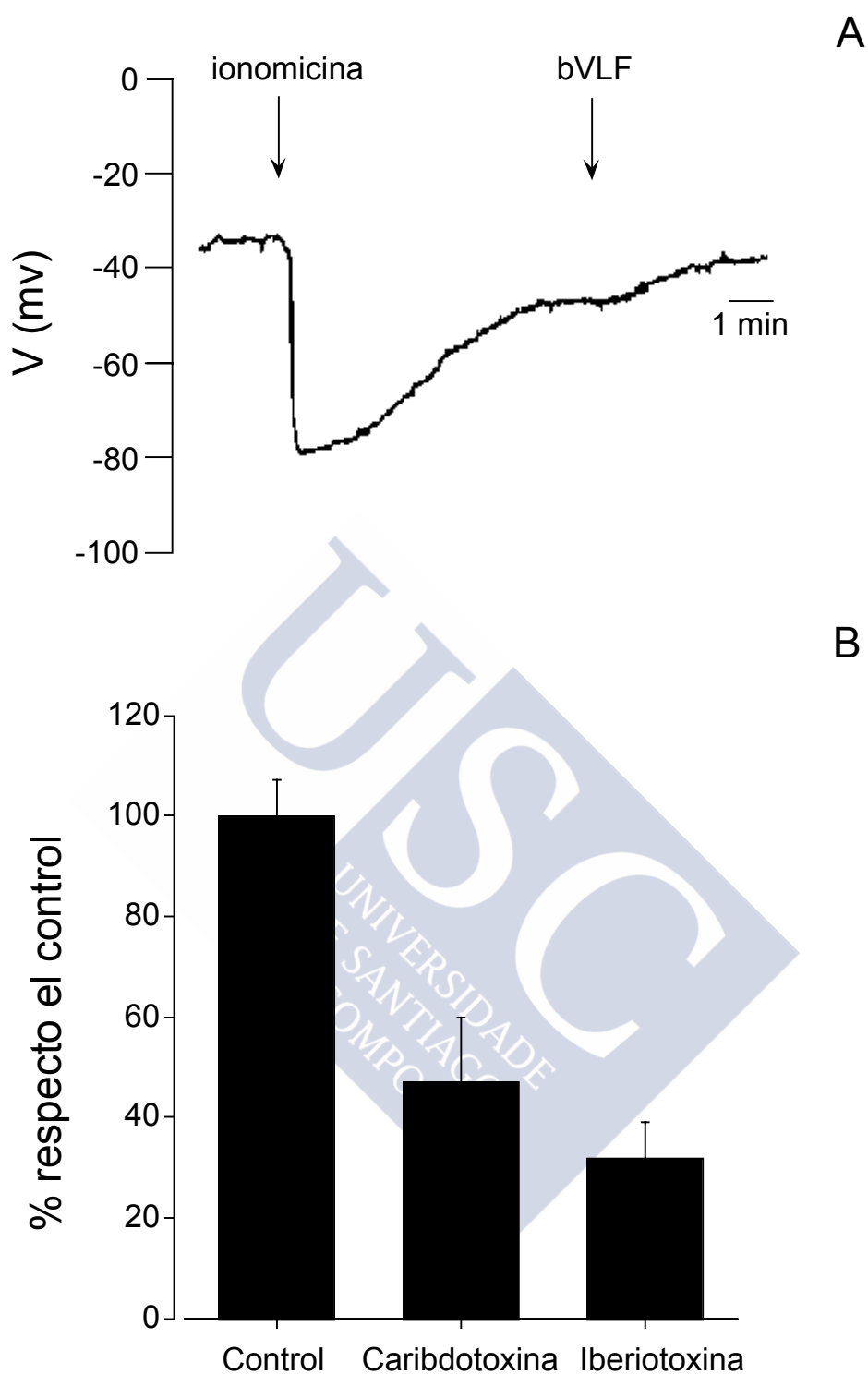
**TABLA 4.-** Las células fueron preincubadas con los diferentes inhibidores durante 5-10 min antes de la estimulación con el bVLF (1 µg/ml) o el EGF (10 nM). Los cambios del potencial de membrana fueron evaluados con el marcador bis-oxonol. Los resultados están expresados como porcentaje de inhibición (media ± EE).

	bVLF	EGF
Inhibidores de canales de K <sup>+</sup>	% Inhibición	% Inhibición
Apamina (1.0 µM)	0.5±0.5	14.5±8.5
Quinina (1.0 mM)	83.5±1.5	100.0±0.0
Quinidina (1.0 mM)	79.5±8.5	100.0±0.0
TEA (150 mM)	44.7±5.0	72.7±5.3
4-Aminopiridina (5.0 mM)	62.5±9.2	2.8±2.8
D-Tubocuranina (500µM)	23.4±9.2	2.0±1.0

#### 9.4.- Implicación del calcio en la respuesta de hiperpolarización.

Se han caracterizado diferentes tipos de canales de  $K^+$ , según su regulación por receptores y segundos mensajeros (102). Teniendo en cuenta que el bVLF induce un aumento en la concentración de  $Ca^{2+}$ , se optó por estudiar el papel que podría desempeñar este catión en la activación de la corriente de  $K^+$ . Para ello se intentaron emular las condiciones de concentración de calcio en el interior celular, utilizando un ionóforo del calcio; la ionomicina. Tras la aplicación de la ionomicina (1  $\mu$ M) se observó una rápida hiperpolarización que va desde niveles basales hasta un pico máximo de  $-79.8 \pm 2.2$  mV (n=4), seguido de una posterior repolarización a los niveles preestimulatorios (Figura 31A). El pretratamiento de las células con ionomicina, provocó una acusada inhibición de la hiperpolarización inducida por el bVLF (n=4; Figura 31A), probablemente consecuencia de la activación previa de corrientes de  $K^+$  dependientes de calcio. Es interesante destacar que las mediciones realizadas con la ionomicina alcanzaron valores de -80 mV lo que representa la mejor aproximación al valor del potencial de Nerst para el  $K^+$  en esta línea celular bajo las condiciones experimentales de células en monocapa. La introducción del BAPTA (50  $\mu$ M), quelante específico de  $Ca^{2+}$ , en el medio intracelular a través de la pipeta causó una clara inhibición de la respuesta del bVLF (control  $728 \pm 70$  pA, con BAPTA  $42 \pm 12$  pA, n=10; Figura 30D y C). Además, el tratamiento con BAPTA fue capaz de inhibir la respuesta al EGF (control  $427 \pm 24$  pA, con BAPTA  $148 \pm 22$  pA) (n=6; Figura 30D y C). La diferencia de sensibilidad al BAPTA parece sugerir propiedades diferentes para los canales activados por el EGF y por el bVLF.

Se han descrito tres clases de canales de  $K^+$  dependientes de calcio: canales de alta, media y baja conductancia (102-106). El inhibidor selectivo de los canales de  $K^+$  dependientes de calcio de alta y media conductancia, caribdotoxina (3nM), inhibió la hiperpolarización de membrana inducida por el bVLF ( $53 \pm 13\%$  de inhibición, n=3; Figura 31B). Tras el tratamiento con el inhibidor selectivo para los canales de  $K^+$  dependientes de calcio de alta conductancia, iberiotoxina (3nM), causó una mayor inhibición de la respuesta de hiperpolarización del bVLF ( $68 \pm 6\%$  de inhibición, n=3; Figura 31B). Los resultados obtenidos sugieren que el bVLF activa canales de  $K^+$  de alta conductancia dependientes de  $Ca^{2+}$ .

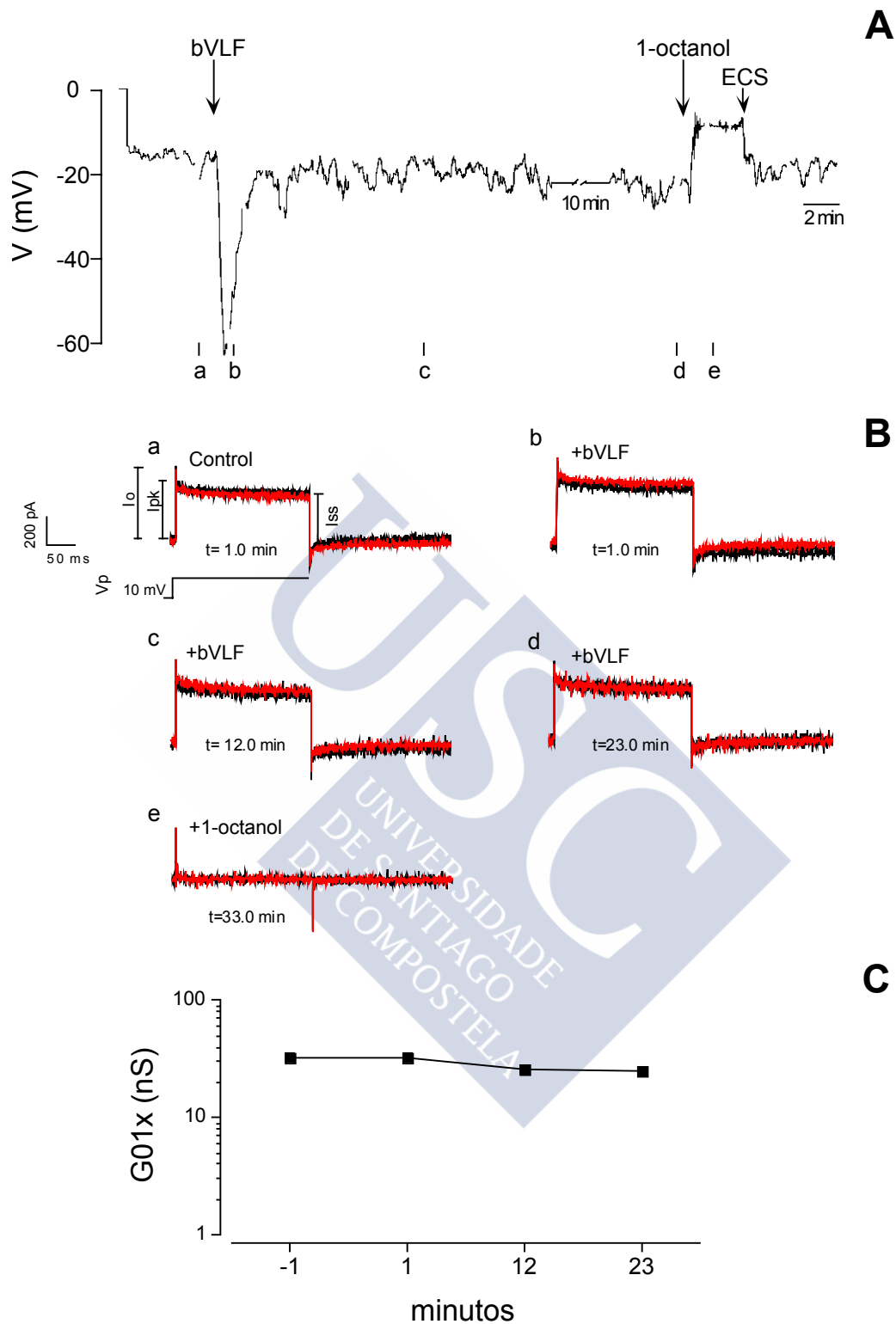


**Figura 31.- A) Efecto de la ionomicina (ionóforo del calcio) sobre la hiperpolarización de la membrana inducida por el bVLF en células EGFR-T17.** La respuesta del bVLF sobre el potencial de membrana se vio completamente inhibido por la previa administración de ionomicina (1  $\mu$ M). B) Efecto de los inhibidores de los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  sobre la hiperpolarización inducida por el bVLF. Las células EGFR-T17 fueron estimuladas con el bVLF (1  $\mu$ g/ml) bajo condiciones controles o en presencia de caribdotoxina (3 nM, 10 min) o iberiotoxina (3 nM, 10 min). Los resultados (media  $\pm$  EE) se expresan como porcentaje sobre el control.

## 10.- EFECTO DEL bVLF SOBRE LAS UNIONES gap

En los últimos años se ha descrito la implicación del calcio intracelular en los mecanismos que modulan las uniones gap (63,64,99,107-109). Para determinar la posible implicación del bVLF sobre la regulación de las uniones gap, se utilizó la técnica denominada *single electrode patch-clamp* (64). Las modificaciones en el acoplamiento intercelular se realizaron en base a la medición de la conductancia y la capacitancia de la membrana de la célula asociada a la pipeta, así como de las células que se encuentran a su alrededor. La conductancia total derivada de la respuesta estacionaria será mayor cuanto mayor es el acoplamiento entre las células, siendo nula para el caso de células aisladas o desacopladas (64). Para este tipo de ensayos, se realizaron registros del potencial en modo *current clamp*, realizando interrupciones durante períodos cortos para pasar a modo *voltage clamp* aplicando pulsos de 10 mV durante 200 ms y registrando las corrientes transitorias. Estos cambios de modo de operación se realizaron en diferentes puntos a lo largo del experimento, puntos que fueron representativos del comportamiento celular anterior y posterior a la estimulación (Figura 32A y B)

La aplicación del bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ) no indujo una aceleración en la caída de la corriente ni tampoco una prolongación en los niveles de  $I_{ss}$  ( $n=10$ ; Figura 32Ba-d). Sin embargo, la aplicación a la misma monocapa de una sustancia lipofílica que bloquea las comunicaciones intercelulares; 1-octanol (500  $\mu\text{M}$ ), redujo la  $I_{ss}$  después de 30-60 s (Figura 32Be). El completo desacoplamiento que indujo el 1-octanol apareció acompañado por una despolarización de la membrana (Figura 32A). Estos resultados demuestran que el bVLF no presenta un efecto significativo sobre el acoplamiento eléctrico en las células EGFR-T17. Este punto se pudo comprobar tras el cálculo de la conductancia de las uniones gap entre la célula acoplada a la pipeta y las células vecinas (G01x) (Figura 32C). El valor medio de G01x fue de  $28.7 \pm 4.1$  nS ( $n=10$ ), no siendo significativamente afectado después de 20 min de estimulación con el bVLF, mostrando valores de  $27.8 \pm 4.5$  nS ( $n=10$ ).

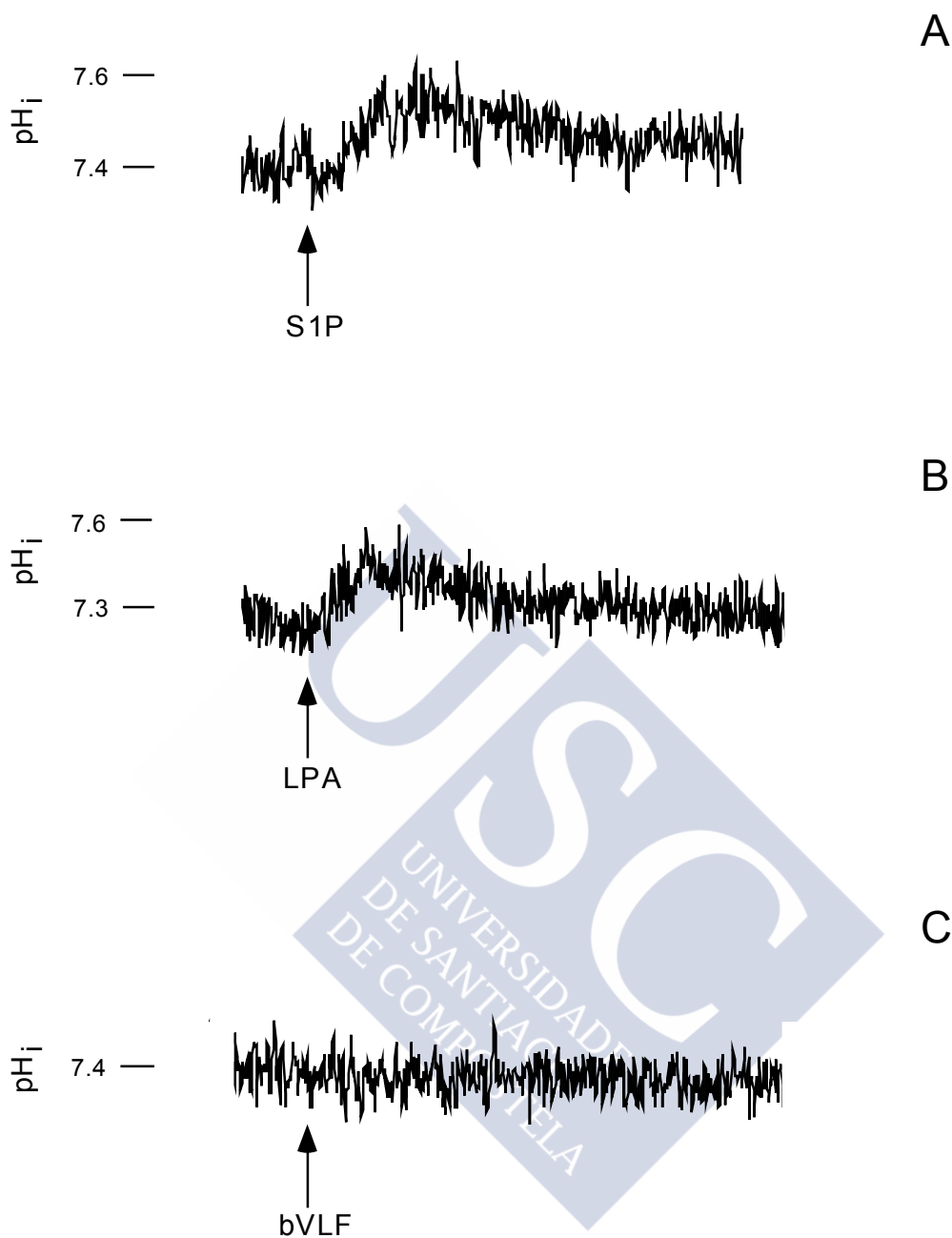


**Figura 32.- Efecto del bVLF sobre el acoplamiento célula-célula en las células EGFR-T17, Efecto del bVLF (1  $\mu$ g/ml) y el 1-octanol (500  $\mu$ M) sobre el potencial de membrana. El registro del potencial se interrumpió (a-e) en los puntos señalados al modo de voltage clamp (A). Para la evolución de las corrientes transitorias tras la aplicación de los pulsos de 10 mV (B). Este tipo de ensayos permitió la estimación de la conductancia asociada a las uniones gap (G01X) en función del tiempo (C).**

## 11.- EFECTO DEL bVLF SOBRE EL pH INTRACELULAR EN CÉLULAS EGFR-T17.

Los dos principales mecanismos que permiten la regulación del  $\text{pH}_i$  son la capacidad reguladora del citosol así como el sistema de transporte que presenta la membrana celular, de los cuales uno de los más importantes es el intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que regula la entrada de  $\text{Na}^+$  así como la salida de  $\text{H}^+$  en una relación estequiométrica 1:1. Este último mecanismo aparece bajo la regulación de la PKC, en diferentes líneas celulares (110,111). Con el fin de evaluar si este mecanismo pudiese ser activado por el bVLF en las células EGFR-T17, se utilizó la sonda BCECF/AM que permite monitorizar las variaciones de la concentración de  $\text{H}^+$  del medio citosólico y, por lo tanto, del  $\text{pH}_i$ . Después de la adición del bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ) no se observó modificación alguna de la fluorescencia y por lo tanto, efecto sobre el  $\text{pH}_i$  (Figura 33C). Por otra parte la adición del LPA (1  $\mu\text{g/ml}$ ) o S1P (1  $\mu\text{g/ml}$ ) indujeron la basificación transitoria del medio citosólico (Figura 33A y B), efecto que puede ser debido a la activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  por parte de la PKC asociada a los mecanismos de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

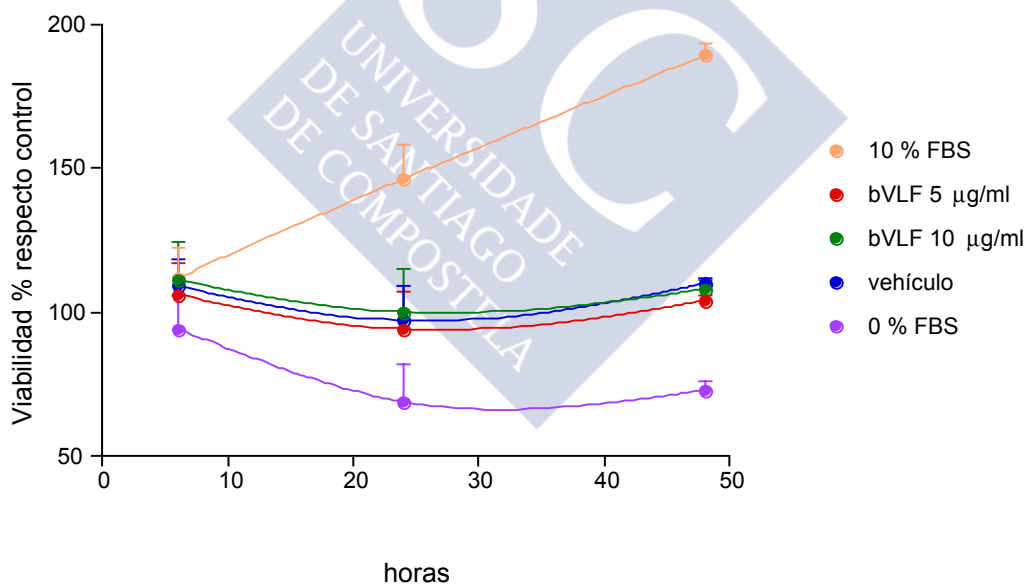




**Figura 33.- Efecto del bVLF sobre el pH intracelular (pHi) en células EGFR-T17.** Las variaciones de pHi fueron medidas en células cargadas con el marcador sensible al pH BCECF/AM mediante fluorimetría como se describe en métodos. A) Células estimuladas con S1P (1  $\mu\text{g/ml}$ ). B) Células estimuladas con el LPA (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Para ambos estímulos se pudo observar una alcalinización del medio. C) Células estimuladas con el bVLF (1  $\mu\text{g/ml}$ ), en las que no se obtiene efecto alguno sobre el pHi.

## 12.- VIABILIDAD CELULAR EN CÉLULAS EGFR-T17.

Como paso previo a los estudios sobre el posible efecto mitogénico del bVLF en la línea celular EGFR-T17, fue necesario evaluar la viabilidad celular a lo largo del tiempo dado las características lipídicas de este compuesto así como la del vehículo utilizado (MeOH). Este tipo de estudios se realizaron en base a la utilización del método colorimétrico MTT (112) para lo cual las células se incubaron con dos concentraciones de bVLF (5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 6, 24 y 48 h. Como muestra la Figura 34, el tratamiento de las células con el bVLF o con el vehículo equivalente no provocó modificación significativa alguna de la viabilidad celular. Se utilizó como control positivo células tratadas con FBS (10%, v/v) que aumentó la viabilidad celular respecto a células incubadas en ausencia de FBS lo que reflejó la activación de la apoptosis celular.

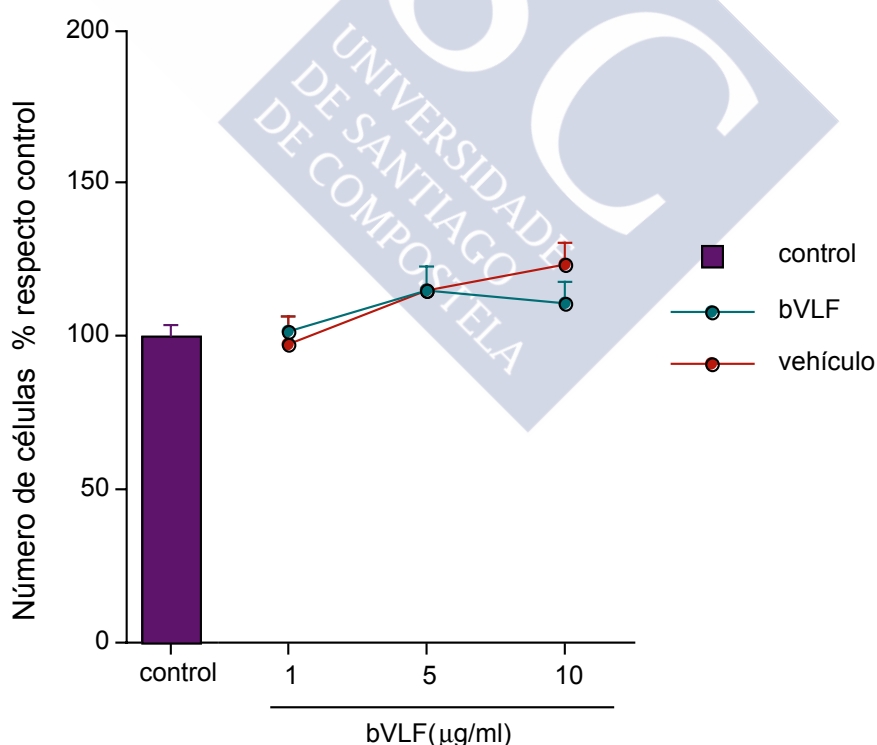


**Figura 34.- Estudio del efecto del bVLF sobre la viabilidad celular en células EGFR-T17 mediante el método MTT.** La línea celular EGFR-T17 fue estimulada con el bVLF (5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) y con los respectivos controles: metanol (vehículo), DMEM + FBS 10% (control positivo) y DMEM + FBS 0% (control negativo). A los tiempos señalados las células fueron incubadas con el reactivo MTT, seguido de la solubilización y medida espectrofotométrica. Los resultados (media  $\pm$  EE) se expresan como porcentaje respecto al control (DMEM + FBS 0.5%).

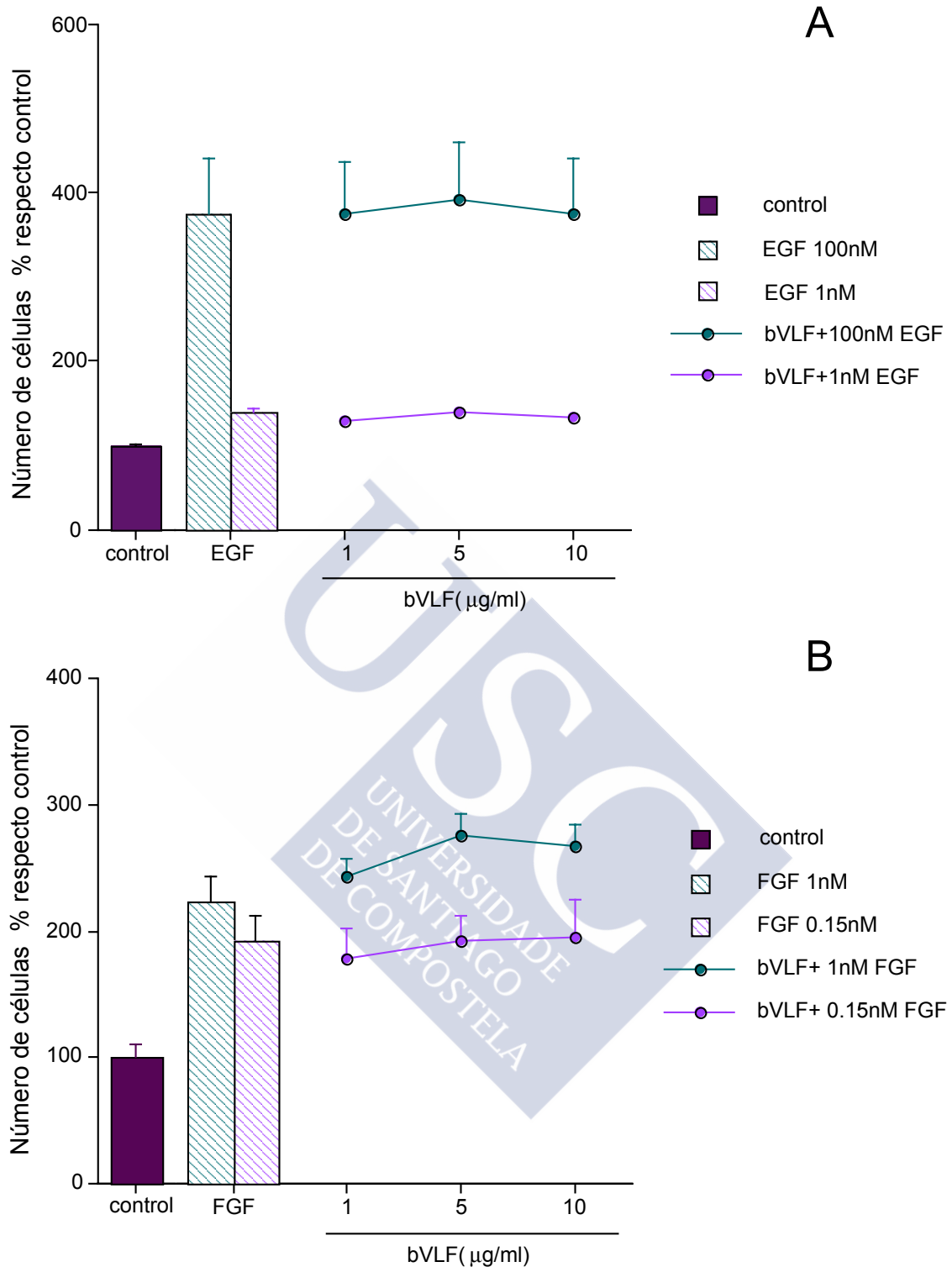
### 13.-PROLIFERACIÓN CELULAR. EFECTO MITOGÉNICO DEL bVLF EN CÉLULAS EGFR-T17.

Como muestra la Figura 35, la estimulación de las células EGFR-T17 con diferentes dosis de bVLF (1, 5, 10  $\mu\text{g/ml}$ ), no tuvo efecto significativo alguno sobre la proliferación celular, evaluada por recuento celular. Estos datos fueron correlacionados con los ensayos de proliferación evaluados con BrdU en los que tampoco se observó efecto alguno (datos no mostrados).

Se estudió también el efecto potenciador/inhibidor del bVLF sobre la capacidad mitogénica de diversos factores de crecimiento como el EGF (1 y 100 nM; Figura 36A) y el FGF (0.15 y 1 nM; Figura 36B). Sin embargo, ni en los ensayos realizados por recuento celular, ni en los ensayos realizados con BrdU (datos no mostrados), se observó efecto alguno del bVLF sobre la acción mitogénica del EGF y FGF, factores de crecimiento que están íntimamente relacionados con la retinopatía diabética proliferativa y cuyos niveles aparecen elevados en muestras de vítreo obtenidas de pacientes con esta patología.



**Figura 35.- Curva dosis-respuesta para el efecto proliferativo del bVLF en fibroblastos EGFR-T17.** Las células fueron estimuladas tras 24 h de serodeprivación (DMEM + FBS 0.5%) con diferentes dosis del bVLF (1, 5, 10  $\mu\text{g/ml}$ ). El recuento celular se realizó a las 48 h de la estimulación. Los resultados están expresados como porcentaje respecto al control (sin estímulo, DMEM + FBS 0.5%FBS) (media  $\pm$  EE).



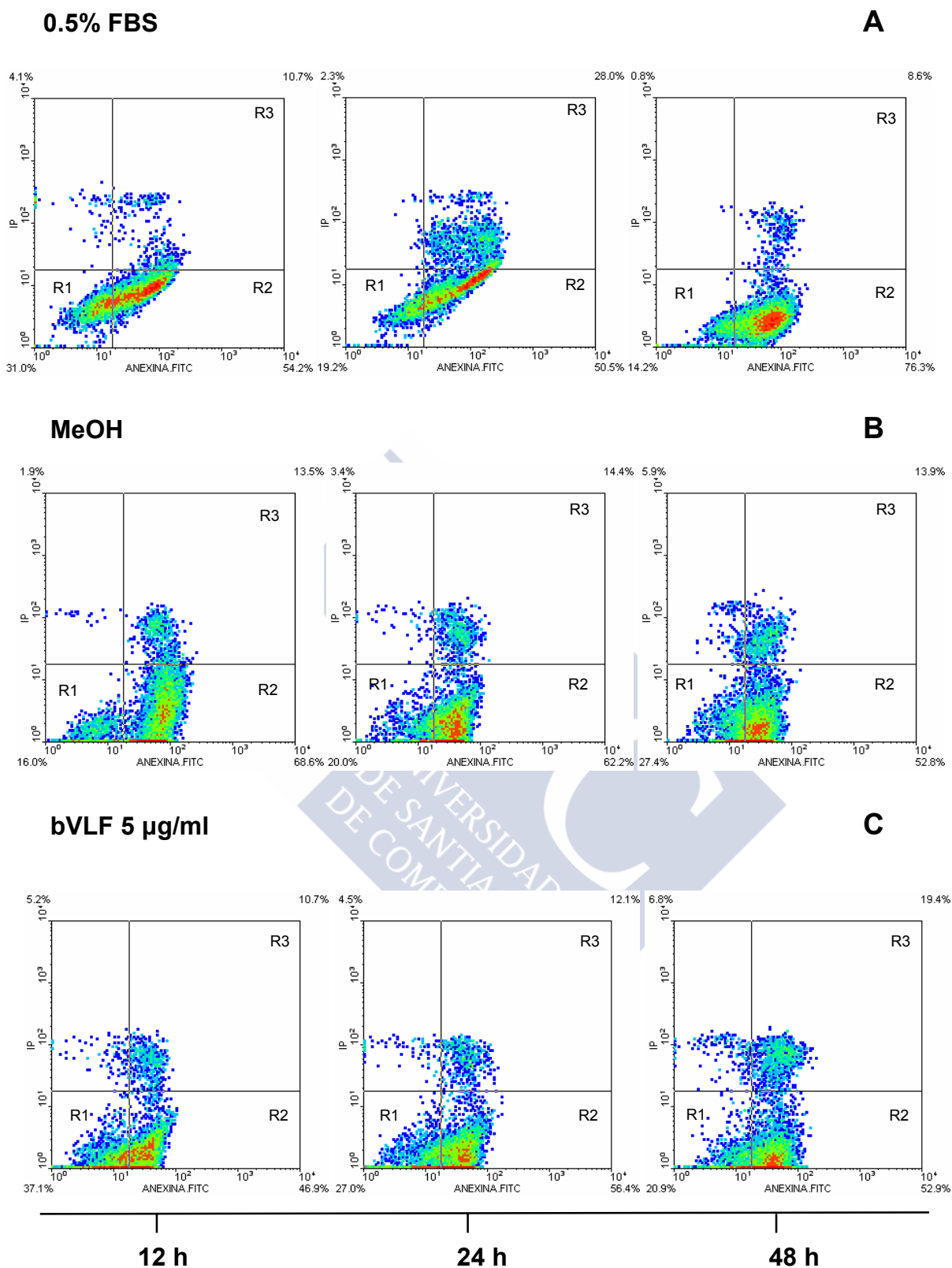
**Figura 36.- Acción del bVLF sobre el efecto mitogénico del EGF y el FGF en células EGFR-T17.** Este experimento se realizó con el fin de evaluar el posible papel potenciador o inhibidor del bVLF sobre el efecto mitogénico de otros factores de crecimiento. A) Las células fueron estimuladas tras 24 h de serodeprivación (DMEM + FBS 0.5%) con EGF (1, 100 nM) y la combinación con diferentes dosis del bVLF (1, 5, 10 µg/ml). B) Las células fueron estimuladas con FGF (0.15 y 1 nM) y la combinación de FGF + bVLF a diferentes dosis de este último. El recuento celular se realizó a las 48 h de la estimulación y los resultados se expresan como porcentaje respecto al control (media ± EE).

#### 14.- APOPTOSIS Y NECROSIS CELULAR, EN CÉLULAS EGFR-T17.

Para el estudio de la apoptosis celular se utilizó el bioensayo de anexina V (ver métodos). La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos con alta afinidad por la fosfatidilserina (PS, phosphatidylserine), fosfolípido presente en la cara interna de la bicapa de la membrana plasmática (113). La detección de la PS de la superficie celular con anexina V sirve como marcador de la apoptosis celular, ya que en células apoptóticas la PS se trasloca desde la cara interna a la cara externa de la bicapa de la membrana plasmática, lo cual permite su unión a la anexina V y su posterior detección. El tratamiento de las células con anexina V se combinó con otro marcador de ADN, el yoduro de propidio, que permitió la evaluación de las células necróticas. Esta tinción dual permite distinguir entre células apoptóticas y células necróticas, en base a la incorporación señalada en el esquema.

	Células normales	Células apoptóticas	Células necróticas
Anexina-V	-	+	+
Yoduro de propidio	-	-	+

Mediante el análisis por citometría de flujo y utilizando un marcaje dual, se pudo determinar el porcentaje de células vivas (R1), apoptóticas (R2) o necróticas (R3), en células tratadas con el bVLF (5 µg/ml), así como en células tratadas con FBS (0.5%, v/v), y metanol (vehículo). Para todos los ensayos las células se habían sincronizado previamente tras una serodeprivación (DMEM + FBS 0.5%, v/v) durante 24 h. Los porcentajes obtenidos tanto de las células vivas (R1), de células apoptóticas (R2) como de células necróticas (R3) fueron similares tanto para las células estimuladas con el bVLF (Figura 37C) como para las estimuladas con la cantidad equivalente de MeOH o con FBS (Figura 37B y A). Estos resultados descartan la idea de una acción apoptótica del bVLF en la línea EGFR-T17.



**Figura 37.- Estudio del efecto del bVLF sobre apoptosis y necrosis celular en células EGFR-T17.** Las células se sometieron a un marcaje dual con yoduro de propidio y anexina-V-FLUOS, para el posterior análisis por citometría de flujo en células previamente sincronizadas por serodeprivación (DMEM 0.5%FBS). A) Células control (DMEM 0.5% FBS). B) Células control con el vehículo (MeOH). C) Células preestimuladas con el bVLF (5 µg/ml). Este marcaje dual nos permite determinar el porcentaje de células vivas (R1), células apoptóticas (R2) y células necróticas (R3).



*Ensayos de bioquímica celular en hRPE*



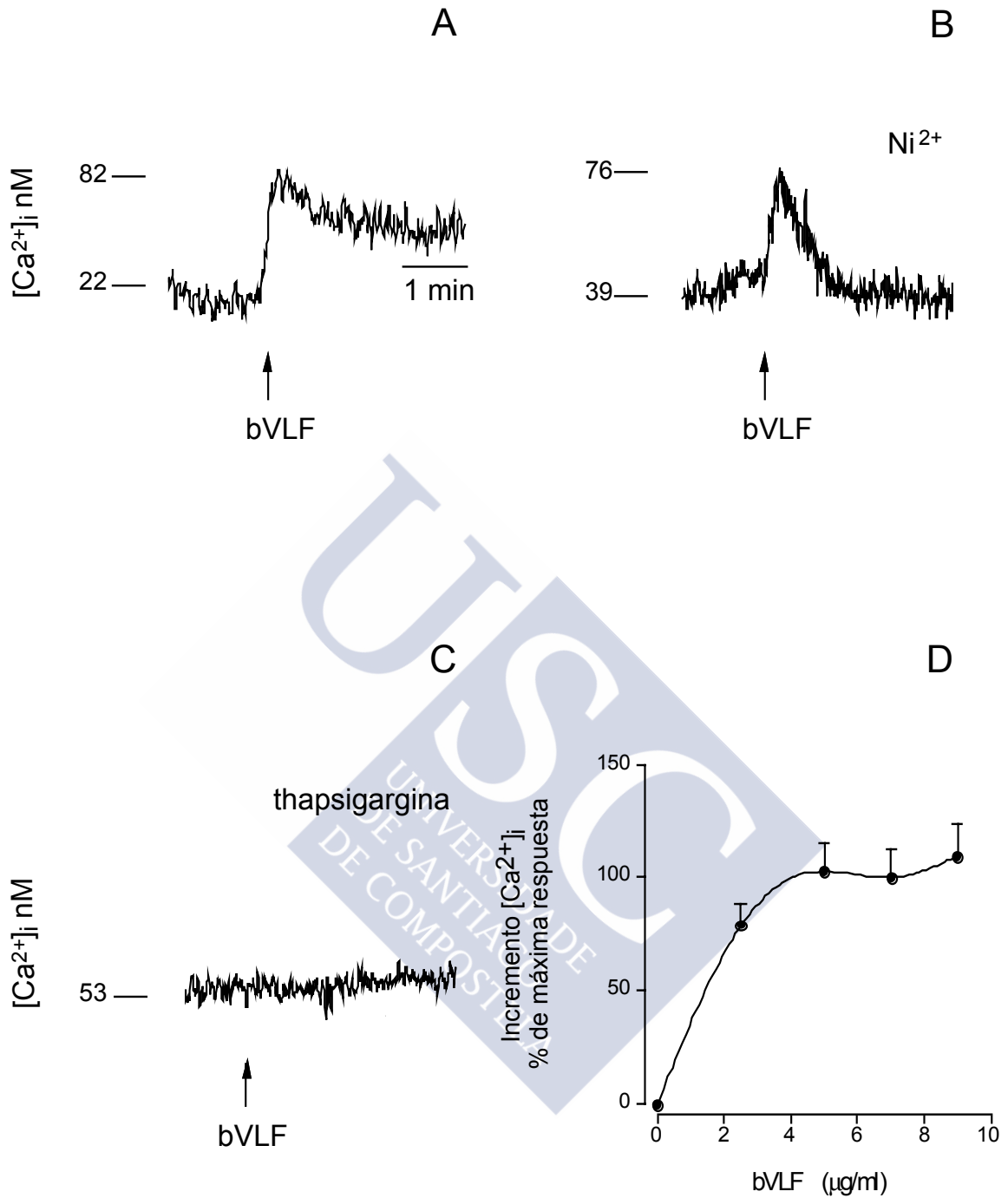
En ojos sanos, las células del epitelio pigmentario retiniano humano (hRPE) forman una monocapa adyacente a los fotorreceptores, estando implicadas en diversas funciones esenciales para la homeostasis de la retina y la función visual (114,115). En condiciones normales, las hRPE se encuentran en fase estacionaria con baja capacidad mitogénica. Sin embargo en situaciones patológicas, como la PDR, estas células comienzan a activarse y movilizarse debido al incremento de numerosos factores de crecimiento peptídicos (6). Se sabe que muchos de estos péptidos son capaces de modificar el comportamiento de diversos mecanismos en las células hRPE, incluido la división, migración, síntesis de la matriz, producción de enzimas y contracción (114). Aunque las complicaciones más graves en la PDR se producen durante la fase proliferativa, ya que se ve activado el proceso de neovascularización desde la retina hacia la cara interior del vítreo. Estos nuevos vasos sanguíneos proliferan alejándose de la retina con contracción continua, lo que finalmente conlleva al desprendimiento de la misma (6).

### **1.- CARACTERIZACIÓN DE LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INDUCIDA POR EL bVLF EN CÉLULAS hRPE.**

La adición del bVLF a células hRPE cargadas con la sonda calcio selectiva fura 2 indujo un aumento rápido y pasajero que alcanza un máximo a los 4-10 s, tras lo cual comienza a decaer sin retornar a los niveles basales en periodos cortos de tiempo (Figura 38A). Este pico de calcio fue debido a una redistribución de depósitos intracelulares acoplada a una entrada de calcio del medio extracelular lo que se demostró por:

- 1) Bloqueo significativo de la segunda parte de la señal en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  (5 mM), bloqueante inespecífico de canales de calcio (70) (Figura 38B).
- 2) Inhibición de la respuesta tras la preincubación de las células con thapsigargina (50  $\mu\text{M}$ , 30 min preincubación), un bloqueante de las bombas calcio-ATPasa del retículo endoplasmático (71) como muestra la Figura 38C.

La Figura 38D muestra la relación dosis-respuesta para la movilización de calcio intracelular inducida por el bVLF estimado como porcentaje respecto a la máxima respuesta obtenida. Un incremento de la concentración del bVLF causó un aumento gradual en la señal fluorescente emitida por el Fura 2 a 345 nm, mostrando una dosis maximal en torno a 2.5  $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 38.- El bVLF induce movilización de  $Ca^{2+}$  en células hRPE.** Las células hRPE fueron estimuladas con el factor bVLF, y fueron medidos los cambios de  $Ca^{2+}$  intracelular con el marcador fluorescente Fura-2. A) La acción del bVLF (2.5  $\mu g/ml$ ) induce un incremento rápido de calcio intracelular sin retornar a los niveles basales de fluorescencia. B) Movilización de calcio en presencia de  $Ni^{2+}$  (5 mM). C) Respuesta en células preincubadas con thapsigargina (50 nM, 30 min). D) Curva de dosis-repuesta para la movilización de calcio inducida por el bVLF en células hRPE.

## 2.- ENTRADA CAPACITATIVA DE CALCIO EN CÉLULAS hRPE.

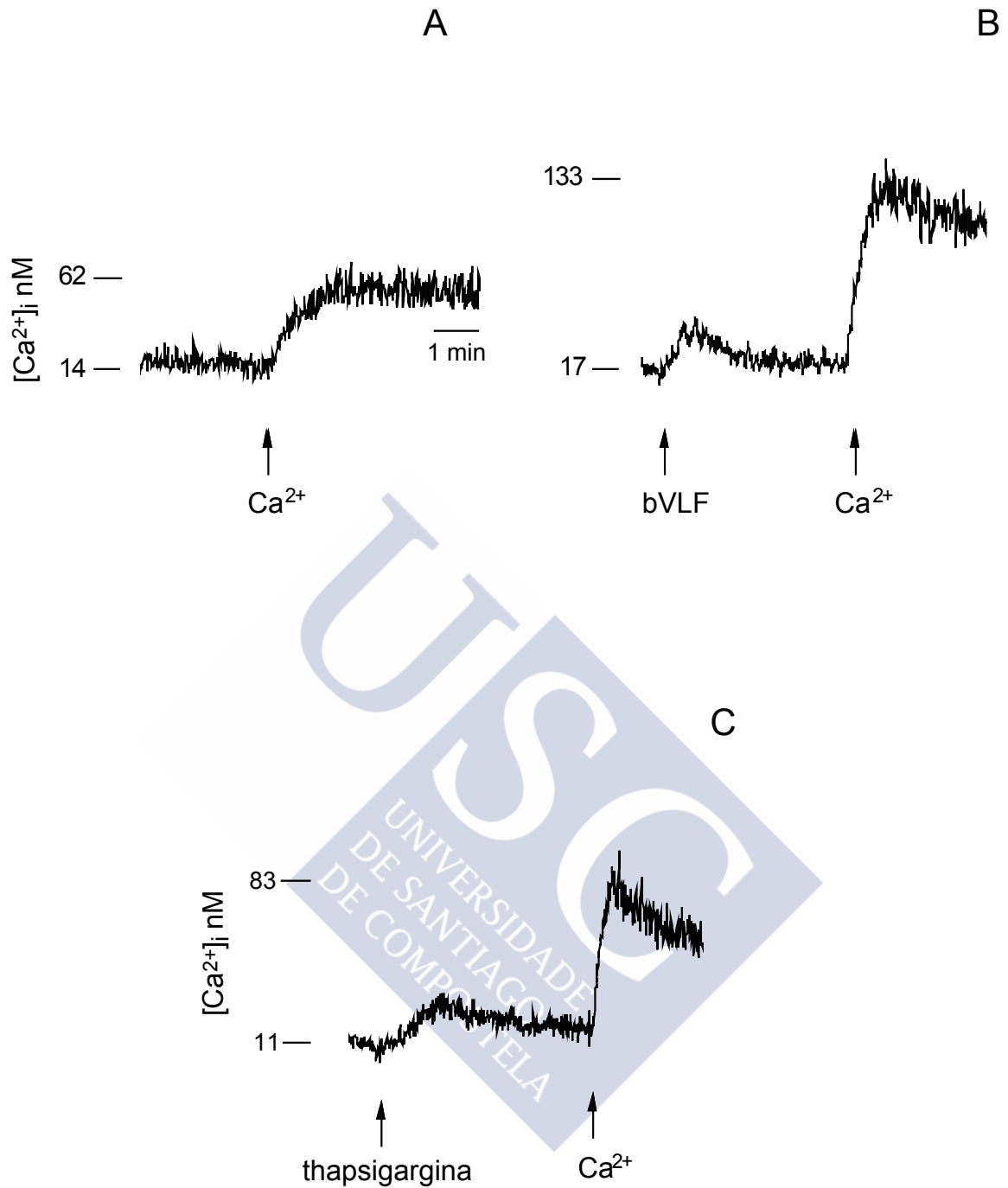
Para determinar el origen de la corriente de entrada de calcio desde el medio extracelular inducida por el bVLF en células hRPE, se realizaron diferentes ensayos con células en suspensión en un medio libre de calcio (Figura 39). Como se muestra en la Figura 39B la estimulación con el bVLF (2.5 µg/ml) en ausencia de calcio extracelular fue seguido de un incremento pasajero de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Consecuencia del vaciado de los depósitos intracelulares. Cuando el calcio extracelular es restaurado, se produjo una entrada capacitativa de calcio, entrada similar a la observada tras la restauración del calcio extracelular en células preestimuladas con thapsigargina (Figura 39C). Este efecto es diferente al que se observó cuando el  $Ca^{2+}$  extracelular fue restaurado en células control (Figura 39A). Este resultado sugiere que la movilización de  $Ca^{2+}$  inducida por el bVLF parece funcionalmente acoplada a una entrada capacitativa de calcio.

## 3.- ESTUDIO DE LA SEÑAL DE TRANSDUCCIÓN RESPONSABLE DE LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO INDUCIDA POR EL bVLF EN CÉLULAS hRPE.

Se realizaron diversos ensayos para determinar si la vía de señalización activada por el bVLF en células hRPE era la misma cascada que la descrita en células EGFR-T17.

### 3.1.- Implicación de la PKC en células hRPE.

La PKC fue estimulada mediante el tratamiento de las células con PMA (éster de forbol; 1 µM, 5 min preincubación). Como se muestra en la Figura 40, la administración de PMA abolió la respuesta de calcio inducida por el bVLF (2.5 µg/ml) (Figura 40B). Esta acción inhibitoria del PMA fue específica, ya que desapareció tras la "down" regulación de la PKC, mediante el tratamiento crónico de las células con PMA durante 24 h (Figura 40C). Esto sugiere que la vía de señalización activada por el bVLF en las hRPE es susceptible de ser bloqueada por la activación de la PKC, como observamos también en el caso de las EGFR-T17.



**Figura 39.- Evaluación de la entrada capacitativa de calcio activada por el bVLF en células hRPE.** Las medidas de calcio se realizaron en células resuspendidas en medio libre de calcio. Al final de cada experimento, el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular fue restaurado (flecha) con objeto de evaluar la entrada capacitativa de calcio, como se representa en las células control (A), tras lo cual se observa una entrada capacitativa de calcio. La magnitud de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  significativa en células estimuladas con el bVLF (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (B) así como la observada tras la adición de thapsigargina (50 nM) (C) indujo una entrada capacitativa de calcio tras la restauración del calcio extracelular.

### **3.2.- Desensibilización cruzada con el LPA en células hRPE.**

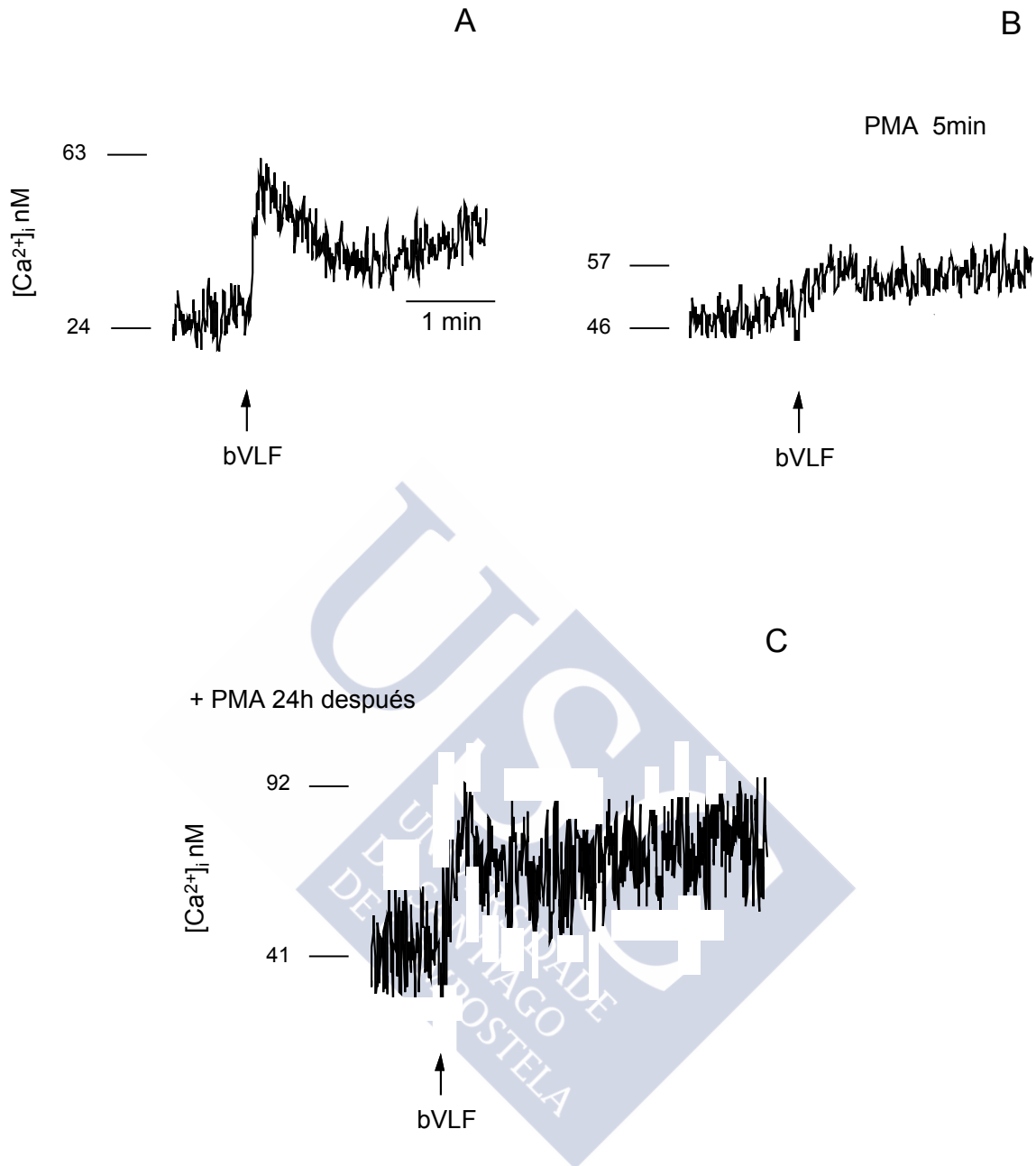
Para obtener mayor conocimiento sobre el mecanismo de acción del bVLF en células hRPE, éste fue comparado con el mecanismo de acción del LPA (22). La activación de la movilización de calcio intracelular es una de las respuestas tempranas celulares inducidas por el LPA como se muestra en la Figura 41A, la adición del LPA (1 µg/ml) indujo un aumento en la concentración de calcio intracelular a los 4-10 segundos post-estimulación. Este incremento fue transitorio, sin retorno a los niveles basales en un periodo corto de tiempo. Tras inducir la desensibilización homóloga del receptor del LPA por estimulación repetida del mismo, la estimulación con el bVLF (2.5 µg/ml) no indujo movilización de calcio alguna. Sin embargo, cuando el orden de los estímulos fue invertido, se pudo constatar que el bVLF no indujo desensibilización homóloga ni tampoco heteróloga para el LPA (1 µg/ml) (Figura 41B). Este resultado fue igual al obtenido para las células EGFR-T1

### **3.3.- Generación de inosítoles totales en células hRPE.**

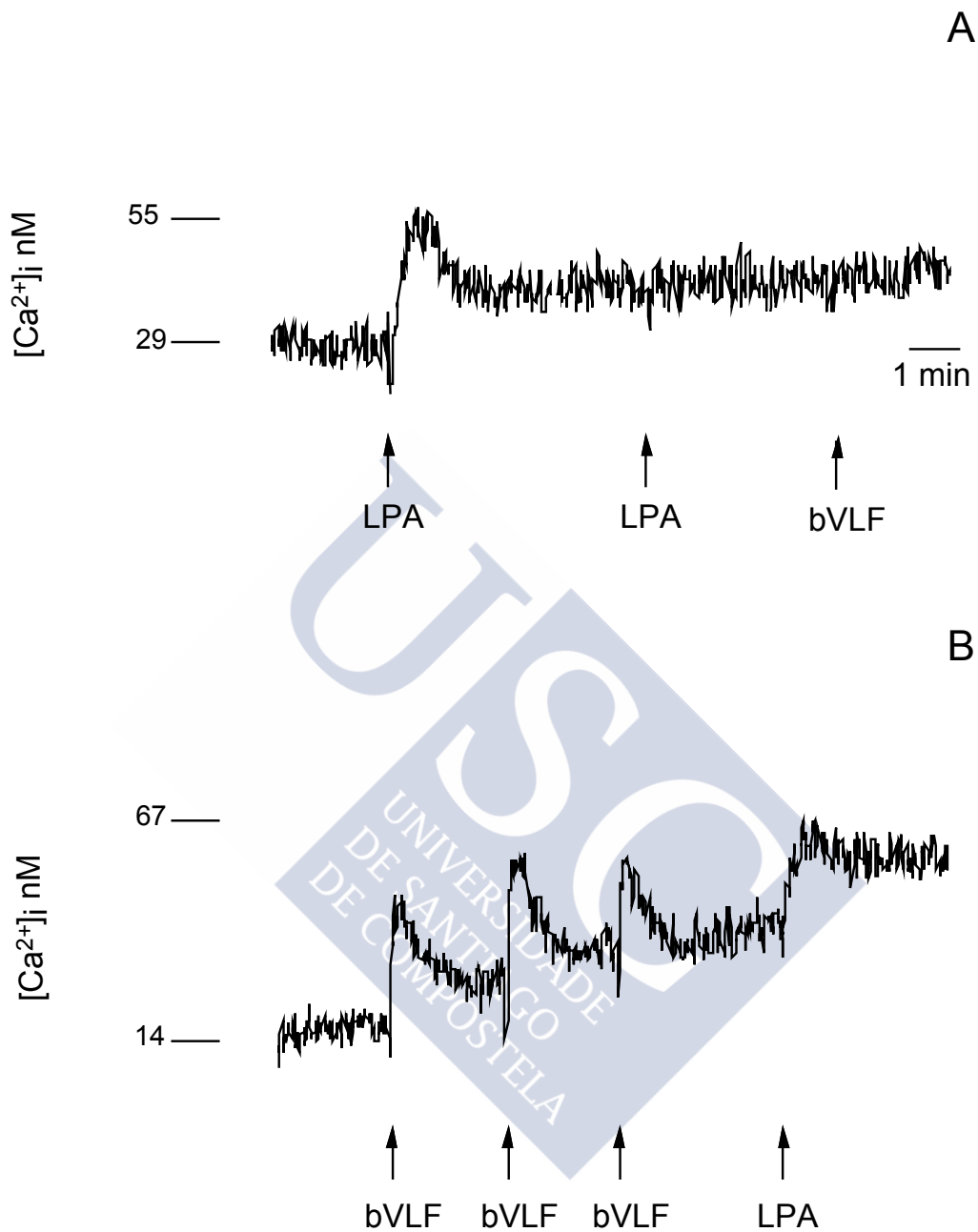
Con objeto de evaluar la implicación de la PI-PLC, se estudió la generación de los inosítoles fosfato tras la estimulación de las células con el bVLF (12.5 µg/ml), el LPA (5 µg/ml) y el FBS (10%, v/v) (116). Como se muestra en la Figura 42, el bVLF no induce un aumento significativo de la producción de inosítoles totales, mientras que si observamos un aumento tras la estimulación con LPA o FBS.

### **3.4.- Generación de cAMP en células hRPE.**

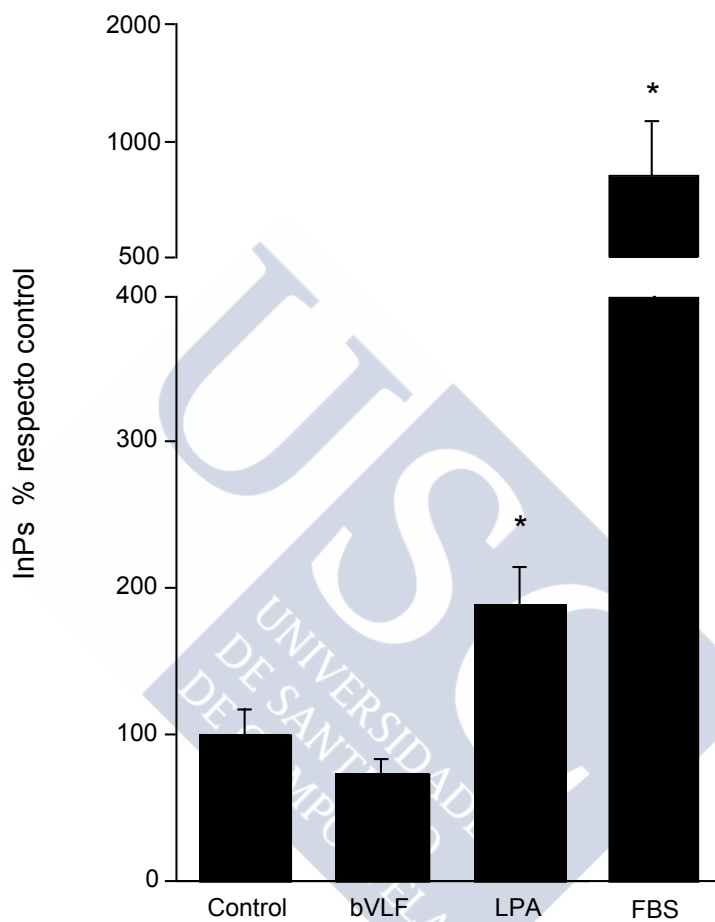
Con objeto de evaluar la implicación de la vía del AC/PKA, se estudió la generación de cAMP tras la estimulación de las células hRPE con el bVLF (12.5 µg/ml) y otros estímulos como el LPA (5 µg/ml) y forskolina (1 µM). Como se muestra en la Figura 43, al contrario de lo que ocurre en el caso de la forskolina que induce un aumento significativo de la producción de cAMP, la movilización de Ca<sup>2+</sup> en respuesta al bVLF no requiere la generación previa de cAMP, sino que por el contrario inhibe de forma significativa la producción basal del mismo.



**Figura 40.- Efecto inhibitorio del PMA sobre la respuesta de calcio intracelular al bVLF en células HRPE.** La elevación del calcio en respuesta al bVLF (2.5  $\mu$ g/ml) se determinó en: A) Células control; B) En células tratadas de forma aguda con PMA (1  $\mu$ M, 5 min preincubación); C) En células en las que la PKC ha sido "down" regulada por tratamiento prolongado con PMA (1  $\mu$ M, 24 h incubación). La movilización de calcio inducida por el bVLF fue inhibida completamente tras la activación de la PKC en células control. Cuando esta enzima se eliminó tras el tratamiento crónico con PMA, la administración aguda de PMA no tuvo efectos sobre el aumento de calcio en la respuesta al bVLF.

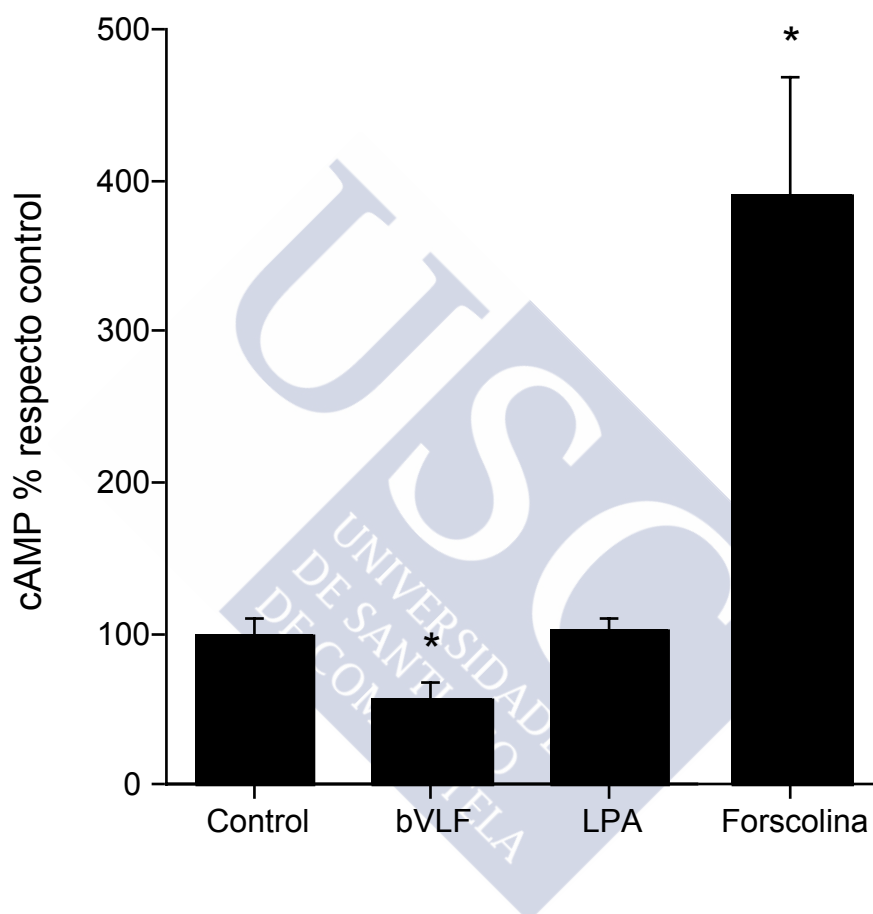


**Figura 41.- Desensibilización cruzada entre las respuestas del LPA y el bVLF en células hRPE.** A) La adición secuencial del LPA induce desensibilización homóloga del receptor del LPA, y la desensibilización heteróloga del receptor del bVLF. B) La adición secuencial del bVLF no induce una desensibilización de la respuesta de calcio, ni tampoco afecta la respuesta al LPA. Las dosis utilizadas en los experimentos fueron: LPA (1  $\mu$ g/ml); bVLF (2.5  $\mu$ g/ml).



**Figura 42.- Efecto del bVLF sobre la generación de inositoles totales en células hRPE.**

Las células se marcaron durante 24 h en medio suplementado con *mio* [2-<sup>3</sup>H] inositol (2  $\mu$ Ci/ml) y se estimularon con bVLF (12.5  $\mu$ g/ml), LPA (5.0  $\mu$ g/ml) y FBS (10%, v/v), en presencia de LiCl (10 mM). La reacción se detuvo con ácido tricloroacético, y los inositoles totales se extrajeron como se describe en Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje sobre el valor control (sin estímulo) (media  $\pm$  SE).



**Figura 43.- Efecto del bVLF sobre la generación de cAMP en células hRPE.** Las células se incubaron con IBMX (1mM) durante 20 min a 37 °C, tras lo cual se estimularon con el bVLF (12.5 µg/ml), LPA (5 µg/ml) y forskolina (1µM) manteniendo la concentración de IBMX, los niveles de cAMP se analizaron como se describe en Métodos. Los resultados se expresan como porcentaje sobre el valor control (sin estímulo) (media ± EE).

### **3.5.- Caracterización de la señal de transducción inducida por el bVLF en células hRPE.**

Se evaluó el efecto de la toxina pertúsica (PTX, pertussis toxin) sobre la respuesta de calcio para el bVLF. La Figura 44B muestra la respuesta del bVLF (2.5 µg/ml) en células hRPE preincubadas con PTX (100 ng/ml) durante 2 h. Se pudo constatar la inhibición de la respuesta de movilización de calcio inducida por el bVLF. La proteína implicada en la transducción de la señal parece ser del tipo sensible a PTX, que no acopla a PI-PLC. Con objeto de comprobar la posible activación en células hRPE de la misma ruta que se ve activada en los fibroblastos EGFR-T17 se utilizó el inhibidor específico de la DAG-K, R59022 (96). Como se muestra en la Figura 44D, la preincubación en presencia de este inhibidor (10 µM, 30 min) causó una inhibición de la respuesta de calcio inducida por el bVLF (2.5 µg/ml). Además el pretratamiento con D609 (10 µM, 5min) un inhibidor específico de la PC-PLC, inhibió la respuesta de calcio del bVLF (Figura 44C) (97). Todos estos resultados respaldan la idea de que el bVLF está activando en las células hRPE la misma cascada de señalización intracelular que activa en las células EGFR-T17. La activación de la PC-PLC a través de una proteína sensible a PTX, estimula la formación del DAG el cual es transformado a PA a través de la DAG-K. El PA actúa directamente sobre los depósitos intracelulares de calcio, depósitos no sensibles a  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . A diferencia de la vía activada en las EGFR-T17, en las hRPE la movilización de calcio intracelular activa una entrada capacitativa del calcio desde el medio extracelular.

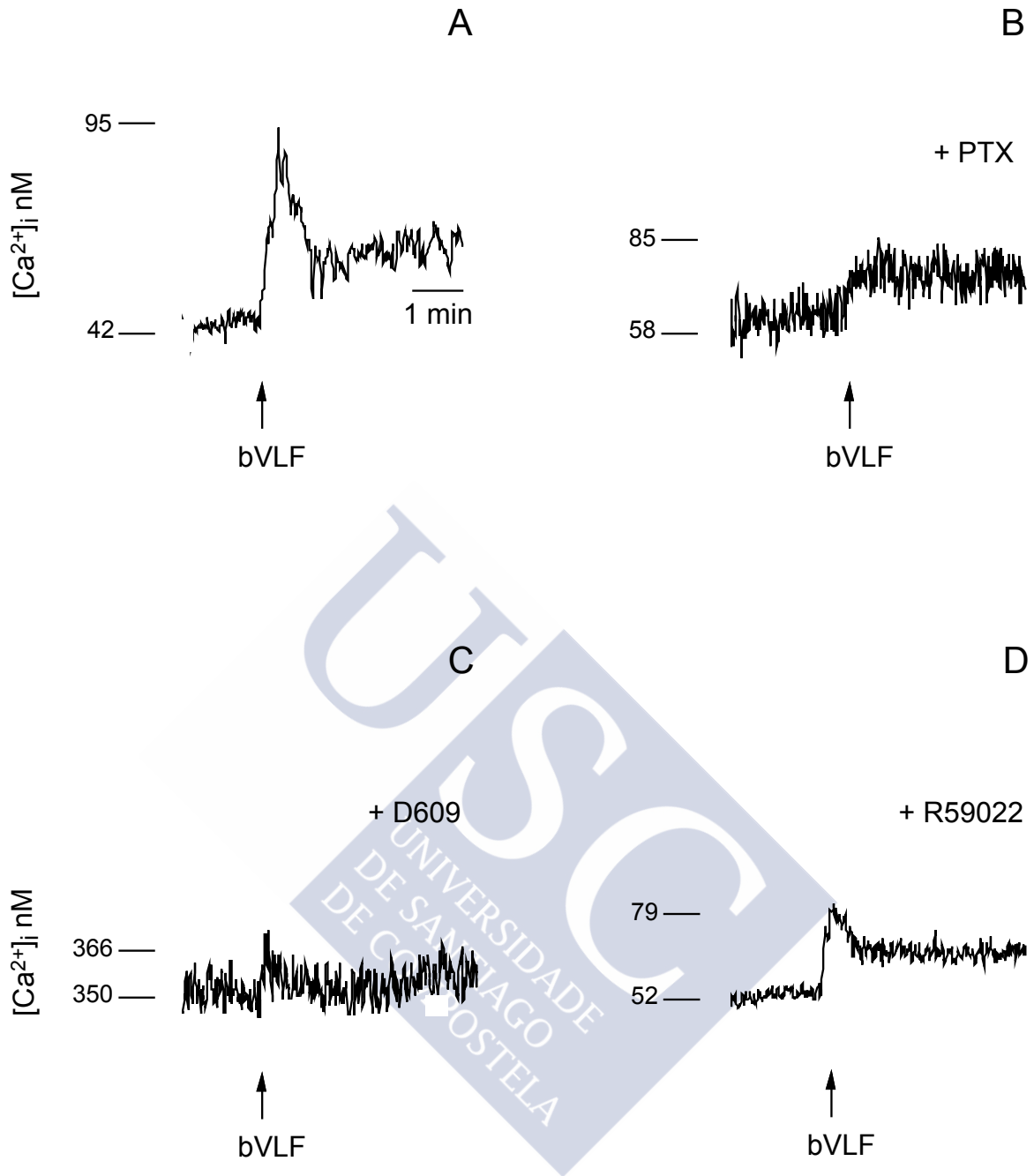
### **4.- EFECTO MITOGÉNICO DEL bVLF EN CÉLULAS hRPE.**

Uno de los puntos más importantes en este estudio se centró en el análisis del efecto mitogénico del bVLF sobre las células hRPE, ya que como se ha mencionado, la proliferación y la formación de nuevos vasos sanguíneos en la PDR está regulado por estas células y, por lo tanto, representan un punto crucial para esclarecer la secuencia de eventos bioquímicos que llevan al desarrollo de este tipo de patologías. La Figura 45A muestra un claro efecto de inhibición ejercido por el bVLF sobre las células hRPE. Este efecto resultó ser dosis dependiente, obteniéndose hasta un 40% de inhibición para dosis de 10 µg/ml a los 3 días de estimulación. Efecto que llegó al 50% tras los 6 días de estimulación para

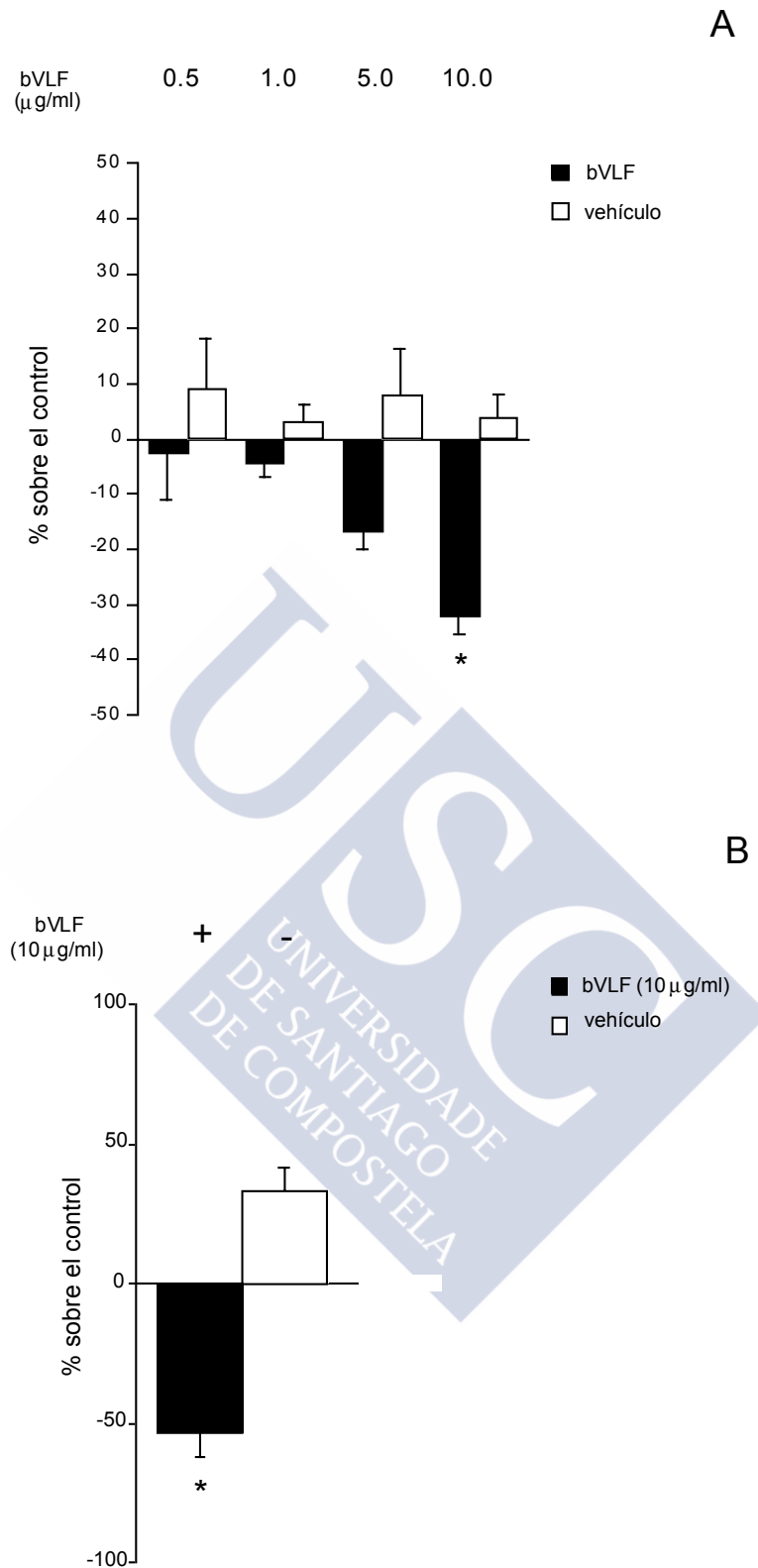
una dosis de bVLF de (10 µg/ml). Este efecto se observó incluso para células estimuladas con la combinación de FBS (10%, v/v) + bVLF (10 µg/ml), efecto que fue más patente tras los 6 días de estimulación (Figura 46).

#### **5.- PAPEL DEL bVLF COMO POTENCIADOR/INHIBIDOR DEL EFECTO MITOGENICO ACTIVADO POR FACTORES DE CRECIMIENTO PEPTÍDICOS.**

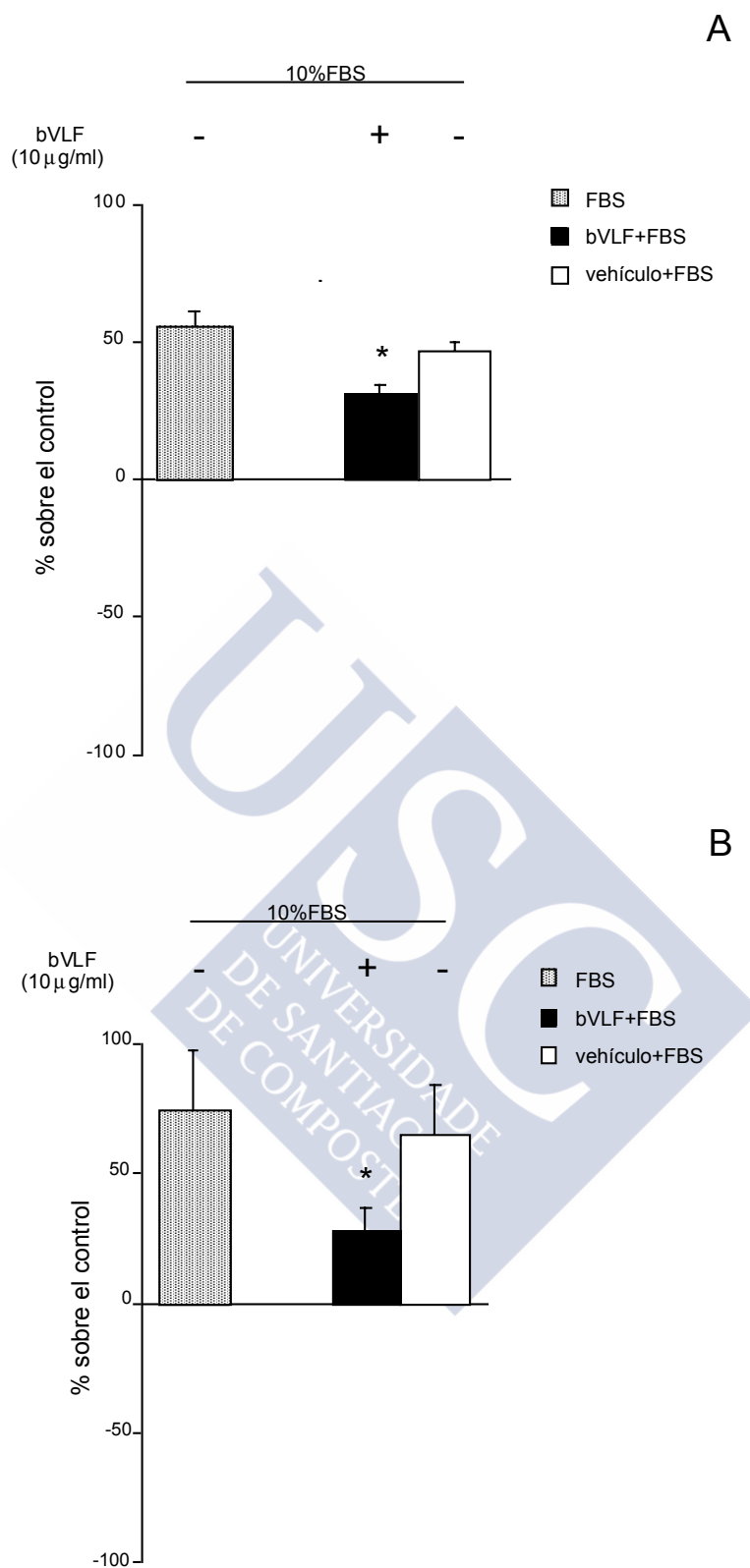
A lo largo de estos últimos años, surge el concepto de que los procesos proliferativos alterados en el ojo aparecen como consecuencias de un desequilibrio preexistente entre los factores estimulatorios y factores inhibitorios (6,117). Ante los resultados de inhibición obtenidos para el bVLF sobre la acción mitogénica del FBS, se optó por estudiar el efecto que ejercería este factor sobre diferentes factores de crecimiento implicados en los procesos proliferativos del ojo. En la Figura 47 se puede observar como la inhibición ejercida por el bVLF (10 µg/ml) se mantuvo para las dosis maximales utilizadas de EGF (100 nM), FGF (1 nM) (Figura 48), IGF-I (25 µg/ml) (Figura 49), y PDGF (20 µg/ml) (Figura 50). Este efecto se pudo observar tras los tres días de estimulación incrementándose tras los seis días postestimulación. No se observó efecto inhibitorio significativo para el caso del HGF (50 µg/ml) ni a los tres ni a los seis días de estimulación (Figura 51).



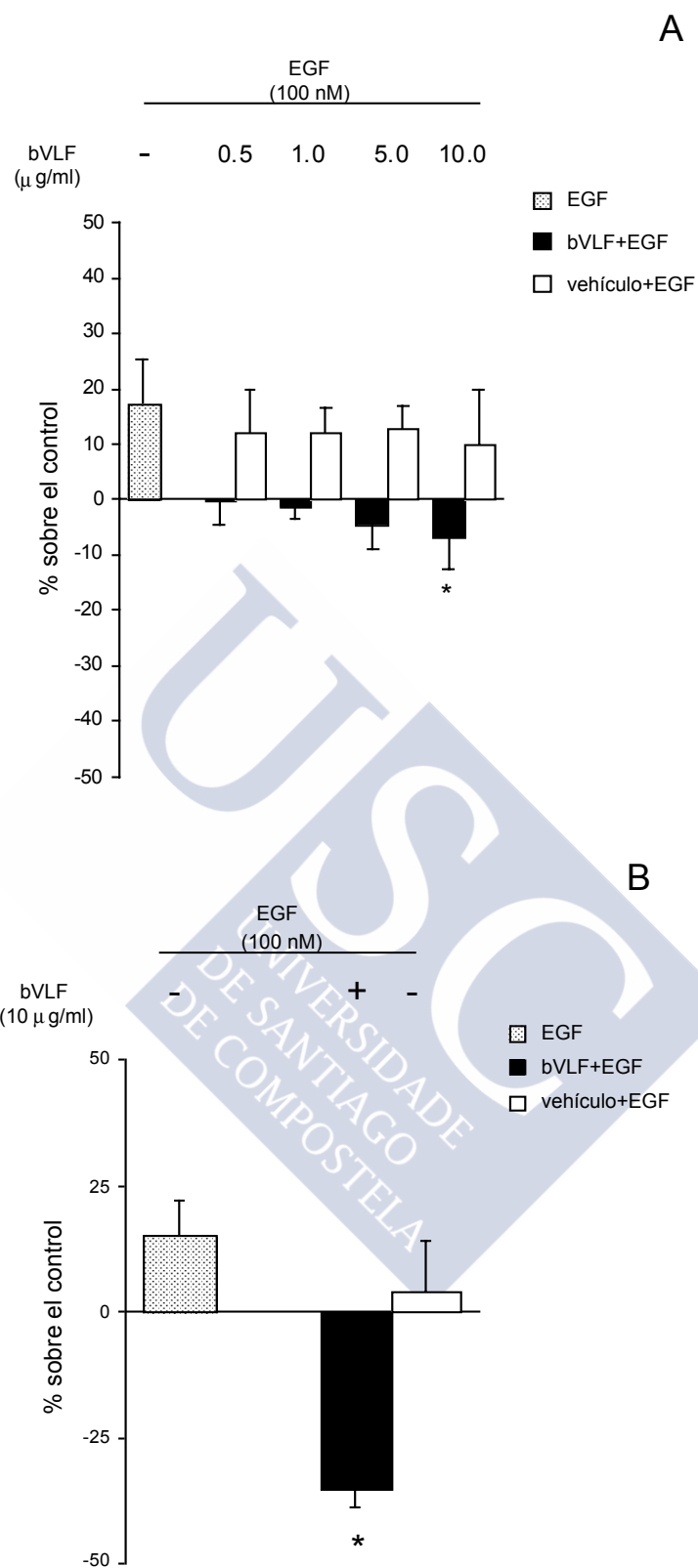
**Figura 44.- Efecto de la PTX, el inhibidor de la DAGK(R59022) y el inhibidor de la PC-PLC (D609) en la movilización de  $Ca^{2+}$  inducida por el bVLF en células hRPE.** A) Las células hRPE fueron estimuladas con el bVLF (2.5  $\mu$ g/ml) (células control). B) Células hRPE pretratadas con PTX (100 ng/ml, 2 h). C) Células pretratadas con el inhibidor de la PI-PLC, D609 (10  $\mu$ M, 5 min) las cuales fueron estimuladas con el bVLF (2.5  $\mu$ g/ml). D) Células pretratadas con el inhibidor de la DAG-K, R59022 (1  $\mu$ M, 30 min). Como la inhibición de la DAG-K provoca acumulo de DAG, los experimentos se realizaron en presencia de un inhibidor de la PKC, la estaurosporina (1  $\mu$ M), para evitar interferencias.



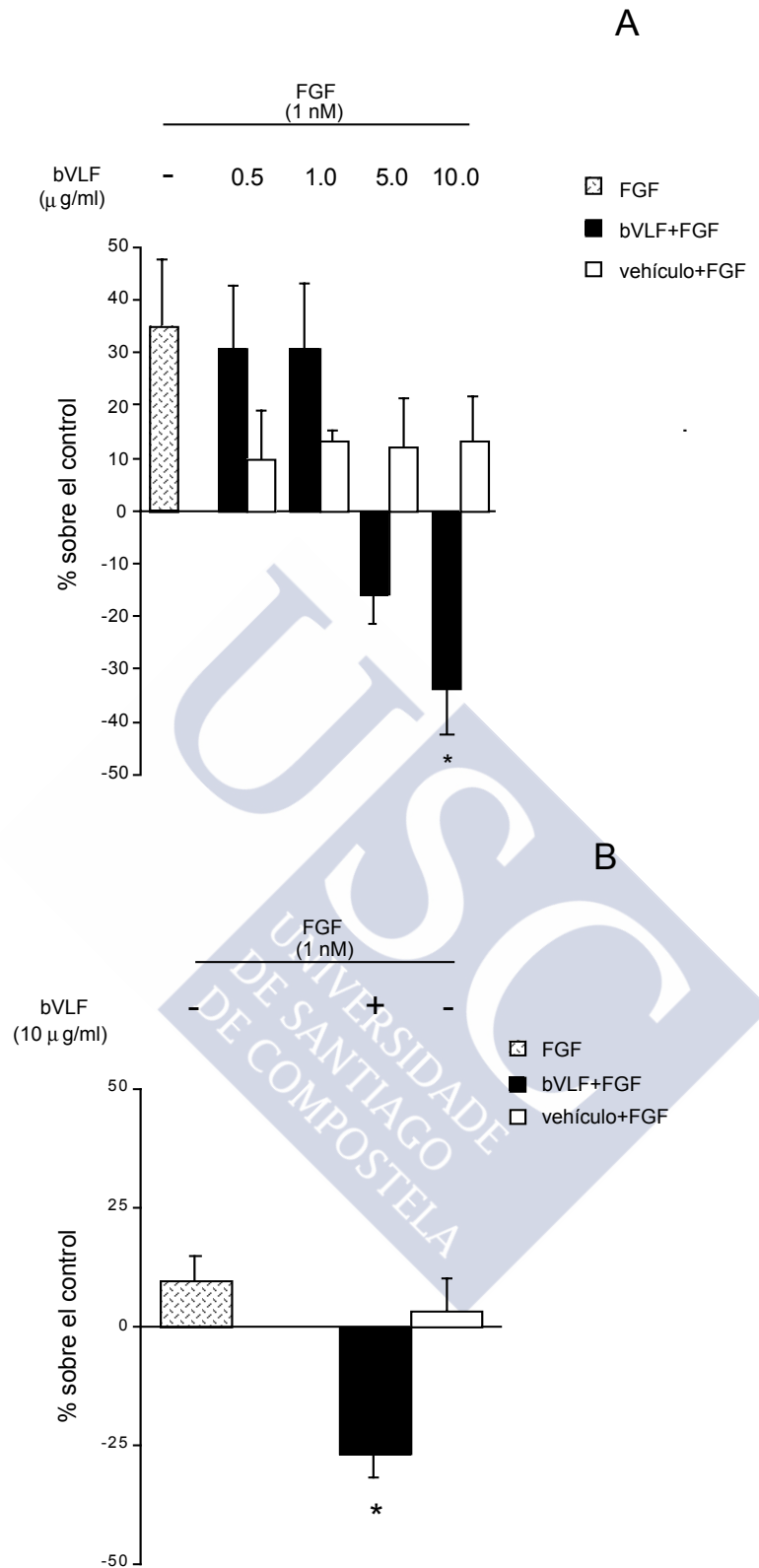
**Figura 45.- Dosis respuesta para el efecto del bVLF en células hRPE.** Las células fueron estimuladas tras 24 h de serodeprivación con diferentes dosis del bVLF, así como las cantidades equivalentes del vehículo (MeOH). El recuento celular se realizó a los 3 días de estimulación (A), así como a los 6 días tras el estímulo con la dosis maximal del bVLF (10 µg/ml) (B). Los resultados están expresados como porcentaje sobre el control (sin estímulo) (media ± E.E.) (\*,  $p < 0.05$ )



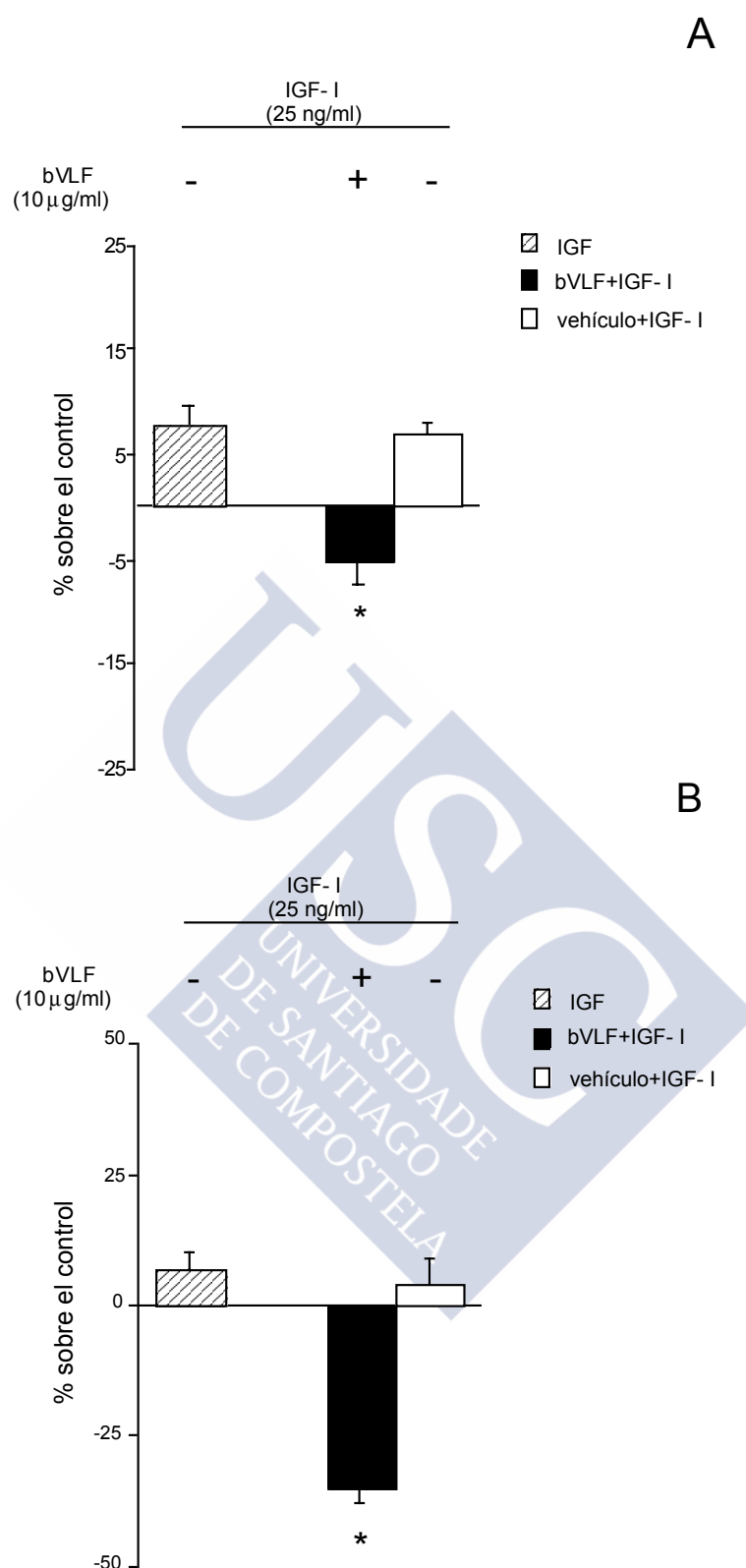
**Figura 46.- Acción del bVLF sobre el efecto mitogénico del FBS en células hRPE.** Con objeto de evaluar el posible papel inhibitor del bVLF sobre la acción proliferativa tras 24 h de serodeprivación con FBS (0%) y la combinación de FBS (10%) + bVLF (10 µg/ml) así como de FBS (10%) + vehículo (MeOH). El recuento celular se realizó a los 3 días (A) y a los 6 días (B) de la estimulación y los resultados se expresan como porcentaje sobre el control (media ±E.E.) (\*,  $p < 0.05$ )



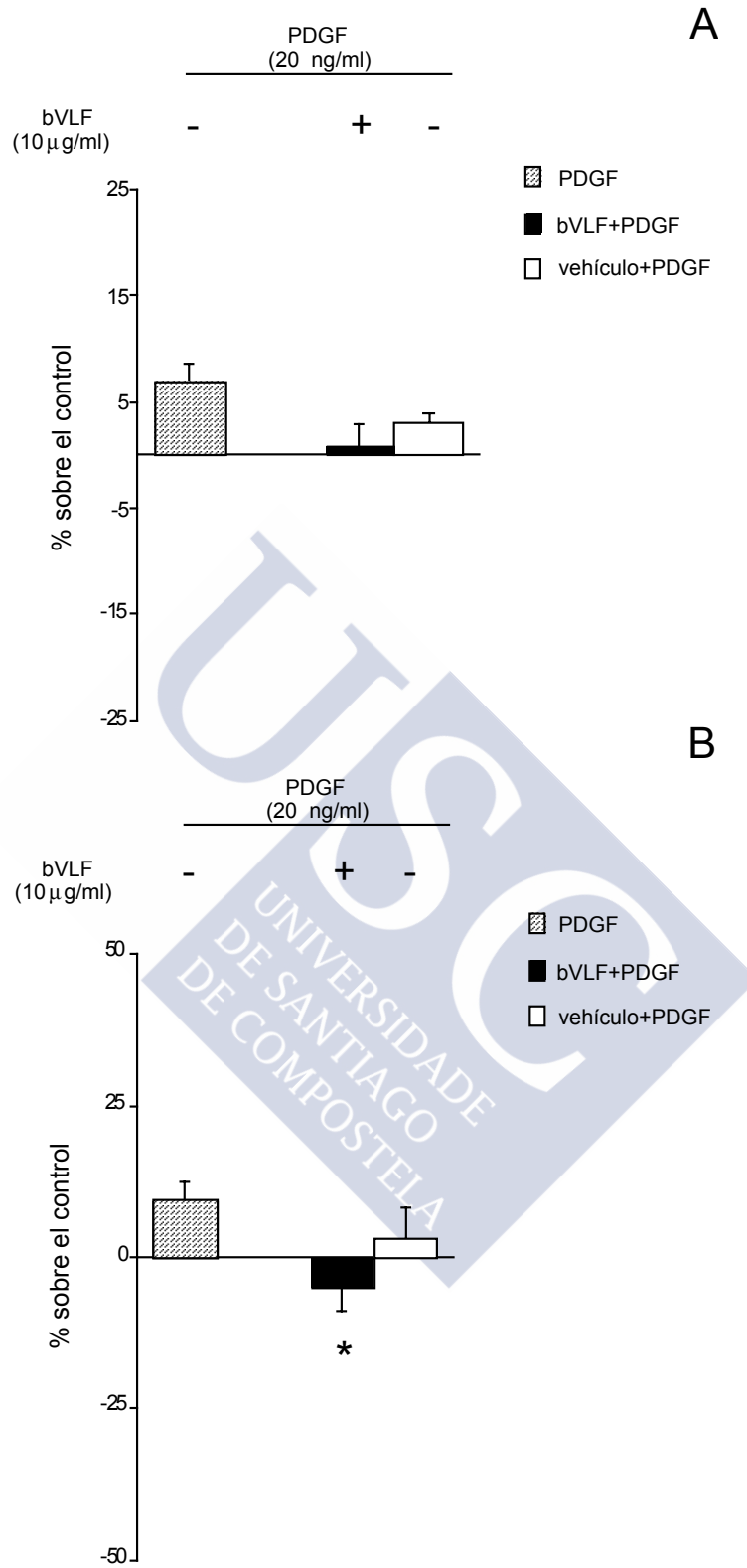
**Figura 47.- Acción del bVLF sobre el efecto mitogénico del EGF en células hRPE.** Las células se estimularon con la combinación de EGF 100 nM + bVLF (10 µg/ml) así como con el vehículo (MeOH) tras 24 h de serodeprivación. El recuento celular se realizó a los 3 días (A) y a los 6 días (B) de la estimulación. Los resultados se expresan como porcentaje sobre el control (media ±E.E.) (\*,  $p < 0.05$ ).



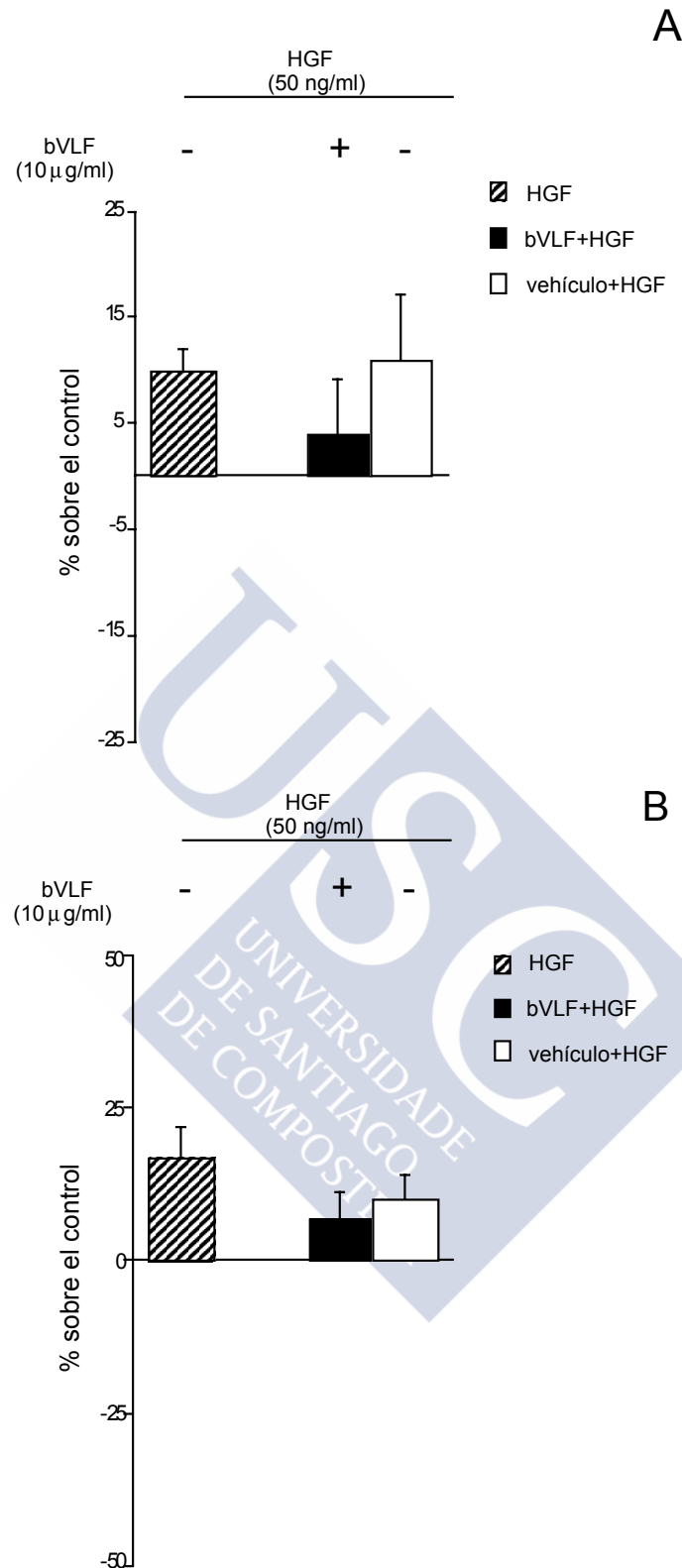
**Figura 48.- Acción del bVLF sobre el efecto mitogénico del FGF en células hRPE.** Las células se estimularon con la combinación de FGF (1 nM) + bVLF (10 µg/ml) así como con el vehículo (MeOH), tras 24 h de serodeprivación. El recuento celular se realizó a los 3 días (A) y a los 6 días (B) de la estimulación. Los resultados se expresan como porcentaje sobre el control (media ±E.E.) (\*,  $p < 0.05$ )



**Figura 49.- Acción del bVLF sobre el efecto mitogénico del IGF en células hRPE.** Las células, previamente serodeprivadas 24 h, se estimularon con la combinación de IGF (25 ng/ml) + bVLF (10 µg/ml) así como con el vehículo (MeOH), bajo las mismas condiciones. El recuento celular se realizó a los 3 días (A) y a los 6 días (B) de la estimulación. Los resultados se expresan como porcentaje sobre el control (media  $\pm$  E.E.) (\*,  $p < 0.05$ ).



**Figura 50.- Acción del bVLF sobre el efecto mitogénico del PDGF en células hRPE.** Las células, previamente serodeprivadas 24 h con FBS (0%), se estimularon con la combinación de PDGF (20 ng/ml) + bVLF (10 µg/ml), así como con el vehículo (MeOH), bajo las mismas condiciones de serodeprivación. El recuento celular se realizó a los 3 días (A) y a los 6 días (B) de la estimulación y los resultados se expresan como porcentaje sobre el control (media ±E.E.) (\*, p<0.05).



**Figura 51.- Acción del bVLF sobre el efecto mitogénico del HGF en células hRPE.** Las células, previamente serodeprivadas 24 h con FBS (0%), se estimularon con la combinación de HGF (50 ng/ml) + bVLF (10 µg/ml), así como con el vehículo (MeOH), bajo las mismas condiciones. El recuento celular se realizó a los 3 días (A) y a los 6 días (B) de la estimulación. Los resultados se expresan como porcentaje sobre el control (media ±E.E.) (\*,  $p < 0.05$ ).





## **Discusión**



En trabajos preliminares nuestro grupo detectó la presencia de un factor, con potente actividad movilizadora de calcio intracelular en muestras de vítreo humano obtenidas de vitrectomías realizadas en pacientes con PDR (118). Este factor activa la movilización de calcio intracelular, en células EGFR-T17, alcanzando valores máximos de  $[Ca^{2+}]_i$  a los 5-6 segundos tras la estimulación decayendo a los 50-60 segundos a niveles infrabasales para volver al nivel basal a los 100-120 segundos (24,98). En una primera aproximación se partió de la hipótesis de que el factor responsable de esta bioactividad fuese de naturaleza polipeptídica o proteica, como ocurre con la mayoría de los factores bioactivos. Sin embargo, se pudo constatar que la hipótesis de partida no era cierta a raíz de una serie de ensayos realizados incompatibles con un compuesto de naturaleza peptídica. El comportamiento de este factor se aproximaba más al de un factor de naturaleza lipídica aunque éste aparece ligado a la albúmina, la cual ejerce un papel de proteína de transporte. Una de las principales limitaciones durante el desarrollo de los ensayos de caracterización estructural de este factor fue la escasa cantidad de material de partida, limitación que viene impuesta por el uso de muestras quirúrgicas. Para solventar en lo posible la escasez de muestras, se realizaron trabajos con otros sistemas biológicos con el fin de identificar fuentes alternativas. Así, a partir de muestras de vítreo bovino, se consiguió purificar un lípido de características similares al descrito en muestras humanas que se utilizó como modelo experimental. En relación con este punto es necesario indicar que a diferencia del vítreo humano, el vítreo bovino (bV) induce una respuesta dual de movilización de calcio en la línea celular EGFR-T17. A pesar de que esta diferencia cuestionó inicialmente la validez de este modelo, el análisis detallado de esta respuesta mostró que era debida a la acción de dos factores de naturaleza química diferente: una primera señal de calcio producida por una sustancia de naturaleza aparentemente lipídica, seguida de una segunda señal que era inducida por un compuesto de naturaleza proteica. La purificación de estas dos sustancias se realizó de forma independiente, comprobándose que la primera señal era inducida por una sustancia de naturaleza lipídica, seguida de una segunda señal activada por un compuesto de naturaleza proteica. La sustancia responsable de la segunda señal fue identificada como dos isoformas del aFGF, uno de los GF descritos clásicamente en el vítreo (24). Nuestra atención se centró en el aislamiento de la sustancia responsable de la primera señal, por su similitud con el factor bioactivo

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 en gel de sílice, cromatografía de intercambio aniónico, nueva extracción en fase sólida y, finalmente, y HPLC. Se consiguió el aislamiento de un factor lipídico el cual fue denominado bVLF (bovine vitreous lipid factor). En un primer intento de identificar la familia a la cual pertenecía el bVLF, se realizaron una serie de ensayos para la caracterización bioquímica mediante una serie de tratamientos enzimáticos, y así establecer los requerimientos estructurales básicos para la bioactividad (24). La sensibilidad mostrada por la bioactividad a la fosfolipasa B, la fosfolipasa C y la fosfatasa alcalina, parecía sugerir la presencia de dos cadenas acilo en posiciones *sn1* y *sn2* de un esqueleto base de glicerol, una cabeza polar ligada a un grupo fosfato de la posición *sn3* del glicerol y, al menos, un grupo fosfato terminal. Además, el hecho de que la bioactividad se perdiese tras el tratamiento con pronasa y proteinasa K sugería la presencia de enlaces peptídicos, presumiblemente debido a la presencia de un péptido en la cabeza polar. Ante los datos enzimáticos obtenidos todo parecía indicar una gran similitud composicional del bVLF con los glicofosfatidilinosítoles de anclaje de proteínas (GPI, glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors), compuestos que presentan en su estructura una cadena proteica o peptídica unida a una etanolamina, que se liga a la proteína por un enlace amida con su grupo carboxilo terminal, y mediante un enlace fosfodiéster a la secuencia de azúcares, unida a su vez a un anillo inositol que conecta mediante un enlace fosfodiéster a la porción de diacilglicerol (30). Esta familia de compuestos participa en procesos de adhesión celular, interacciones célula-célula y se suponen mediadores de diferentes hormonas y factores de crecimiento (119). Sin embargo, se pudo constatar que la hipótesis de partida no era cierta a raíz de una serie de datos experimentales que mostraban una resistencia al tratamiento con la PI-PLC, descartando la presencia de inositol-1-PO<sub>4</sub>, así como una resistencia parcial a la desaminación con ácido nitroso, descartando así la presencia del grupo GLcNH<sub>2</sub> como elemento puente entre el *mio*-inositol-1-PO<sub>4</sub> y los restantes azúcares de la cabeza polar. Posteriores estudios permitieron determinar que el bVLF era un gangliósido:

- 1- En una primera aproximación, la sensibilidad mostrada por el bVLF a la PLB, así como los datos resultantes de la hidrólisis alcalina (MAH), parecían sugerir la presencia de dos cadenas acilo ligadas en

posiciones *sn1* y *sn2* de un esqueleto de glicerol. Sin embargo, esta estructura se descartó en base a los resultados negativos obtenidos en HPTLC con el revelante específico de enlaces ésteres, la hidroxilamina. Esta discrepancia se podría explicar en base a la falta de especificidad para la PLB a los tiempos de reacción utilizados.

2- Se descartó la existencia de grupos fosfatos en el bVLF. Aunque ensayos previos realizados con la fosfatasa alcalina mostraron la pérdida de la bioactividad del bVLF, los estudios en HPTLC realizados con el revelante específico de grupos fosfatos, azul de molibdeno, junto con los datos que se desprenden tras aplicar el método de Bartlett para la determinación colorimétrica de fósforo, permitieron descartar la presencia de este grupo en el bVLF. Los resultados obtenidos con la fosfatasa alcalina podrían ser consecuencia de la presencia de contaminantes enzimáticos.

3- Presencia de una base esfingoide en la estructura del bVLF, como se desprende de la tinción en HPTLC del bVLF con bencidina, específica de los esfingolípidos.

4- Presencia de azúcares en la molécula, lo que se deduce de los resultados obtenidos tras la tinción con orcinol.

5- Uno o varios ácidos siálicos presentes en la muestra, a juzgar por los resultados obtenidos con la tinción del bVLF con el resorcinol.

La determinación cualitativa de los diferentes componentes del bVLF (azúcares, ácidos grasos, bases esfingoides) se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). A partir de los diferentes análisis realizados se pudo confirmar el carácter de gangliósido de este compuesto y establecer los componentes estructurales básicos:

*Ácidos grasos.* Los ácidos grasos detectados fueron: hexadecanoico (C16:0); octadecanoico (C18:10,13), (C18:9 o C18:7), (C18:0), ecosanoico (C20:0) y docosanoico (C22:0). Se observó que el porcentaje de abundancia para cada uno de ellos fue de 44%, 78%, 89%, 100%, 56% y 44% respectivamente. Los valores de porcentaje son relativos con respecto al

ácido octadecanoico que se determinó como el más abundante en la muestra.

*Azúcares.* En este punto es necesario indicar que debido al fenómeno de mutarrotación junto con el solapamiento de los picos obtenidos en el cromatógrafo de gases, no se pudo realizar una correspondencia inequívoca de los picos de menor abundancia asociados a cada azúcar, y por lo tanto la cuantificación de los mismo. De los ensayos realizados se determinó la presencia de manosa, glucosa, galactosa y ácido siálico; así como la presencia de azúcares *N*-acetilados, aunque no se pudo realizar una determinación indudable entre la *N*-acetil-galactosamina o la *N*-acetil-glucosamina. Los datos obtenidos muestran una gran heterogeneidad para los azúcares componentes de la cabeza polar del bVLF.

*Bases esfingoides.* Ante la falta de disponibilidad de patrones, los análisis realizados permitieron comprobar la presencia de esta unidad estructural en el bVLF. Este tipo de ensayos permitió determinar tres tipos de bases esfingoides que junto con los ácidos grasos forman la parte apolar de esta molécula.

Los compuestos identificados en el vítreo humano patológico y en el vítreo bovino no parecen presentar similitud estructural. Las diferencias encontradas fueron: 1.- El compuesto humano se presenta ligado a la albúmina, mientras que el compuesto bovino está en forma libre. La albúmina aislada del vítreo bovino no presentó actividad movilizadora de calcio intracelular. 2.- El compuesto humano no es un gangliósido e incluso podemos afirmar que no es un glicolípido. Podemos postular que las diferencias encontradas entre ambos compuesto sean consecuencia del tipo de patología asociada. Durante los últimos años se han ido acumulando datos en la literatura sobre el papel potencial de determinadas clases de lípidos como activadores celulares. Concretamente, diferentes fosfolípidos simples, como el LPA, la S1P, la SPC, gangliósidos y compuestos emparentados que actúan induciendo entre otras respuestas biológicas, la movilización de calcio intracelular y la proliferación celular (77-82,87,89,90,92,93,120). Concretamente, los gangliósidos actúan en una gran variedad de procesos biológicos (121-136), incluyendo, entre otras respuestas biológicas, la movilización de calcio intracelular (137-141) y la apoptosis (142-145). También se ha descrito como estas moléculas son capaces de ejercer un papel como reguladores del efecto mitogénico

inducido por factores de crecimiento como el EGF (146,147), el PDGF (148-151) y el FGF (152-159).

En este punto nos propusimos esclarecer la vía de señalización utilizada para la movilización de calcio intracelular por el bVLF. Para esclarecer la ruta implicada, utilizamos dos tipos de células: la línea celular EGFR-T17 (fibroblastos) y el cultivo primario de células hRPE (células del epitelio pigmentario retiniano humano). En la línea celular EGFR-T17, se demostró que el aumento de la concentración de calcio intracelular inducida por el bVLF, es consecuencia de una liberación transitoria de calcio a partir de depósitos intracelulares, dado que en medio carente de calcio extracelular (quelatación con EGTA) no hay modificación de la respuesta, además tras bloquear las bombas ATPasas de los depósitos intracelulares de calcio (tratamiento con thapsigargina) se abole la respuesta inducida. Aparentemente, no existe una participación de calcio extracelular (ensayos con  $\text{Ni}^{2+}$ ), ni de una posible corriente de salida de calcio al medio extracelular, fenómeno que sí se registró para los ensayos realizados con el LPA. En una primera aproximación, se partió de la idea de que el bVLF podría estar actuando a través de un receptor de membrana, o bien, que accedería al interior celular gracias a su naturaleza lipídica donde activaría la movilización de calcio por una acción directa a nivel intracelular, como se ha descrito por ejemplo para algunos esfingolípidos (90,160). Ante la evidencia experimental obtenida, parece primar, sin embargo, la primera interpretación ya que no se observó una respuesta de movilización de calcio inducida por el bVLF tras el tratamiento con NEM, lo que implica la participación de una proteína a nivel de membrana plasmática que determina además una curva dosis respuesta. El sistema parece estar regulado por la PKC, ya que el tratamiento con PMA causó una completa inhibición de la respuesta la cual desaparece cuando la actividad endógena de la PKC es "down" regulada por tratamiento crónico con PMA. En conjunto, estos datos muestran inequívocamente que la acción del bVLF no se ejerce directamente a nivel intracelular, sino que sugiere una cadena de señalización transmembrana para que se produzca el acoplamiento estímulo externo respuesta intracelular.

Para determinar la señalización transmembrana inducida por el bVLF se ha tenido en cuenta las numerosas rutas activadas por otros lípidos bioactivos, como son el LPA, la S1P y la SPC que activan a receptores específicos acoplados a proteínas G (78,87,92). Así la respuesta de movilización de calcio intracelular inducida por el bVLF es bloqueada por la

preincubación de las células con PTX, lo que sugiere la implicación de una proteína G sensible a PTX, punto que parece confirmarse de forma indirecta considerando la inhibición observada sobre la generación de cAMP. En concordancia con este resultado, no se ha evidenciado un aumento en la generación de  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  tras la exposición de las células al bVLF, respuesta que si se obtuvo para el LPA y la S1P, ambos mediados por una proteína Gq con la posterior activación de una fosfolipasa C específica de fosfatidilinosoles (PI-PLC) (78,89). Teniendo esto en cuenta, parece contradictorio el hecho de que el U73122, que en un primer momento se describió como un inhibidor de la PI-PLC, bloquee completamente la acción del bVLF; sin embargo, trabajos posteriores han demostrado que este compuesto dista bastante de ser específico, siendo capaz de inhibir otras PLCs así como la PLD. Así los datos obtenidos con el U73122, serían también compatibles con la implicación de otras PLCs o incluso la PLD (161,162), originándose la respuesta de calcio a partir de rutas independientes de la generación de  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ . Para tratar de explicar la movilización de calcio inducida por el bVLF, cabe plantearse dos posibles rutas:

- 1- Activación de la PLD específica de fosfatidilcolina (PC-PLD), hidrólisis fosfatidilcolina (PC) y consiguiente generación de colina y ácido fosfatídico (PA).
- 2- Activación de la PC-PLC, generación de fosfocolina y DAG a partir de PC. El DAG generado se convertirá en PA por mediación de la DAG-K. El PA generado actuaría sobre depósitos de calcio intracelulares sensibles al mismo, aumentando la concentración citosólica de calcio (163).

A pesar de que el U73122 ha sido implicado en la inhibición de la PLD (162), la acción predominante de este compuesto, y la mejor caracterizada, es la inhibición de diferentes PLCs. Los datos obtenidos de los ensayos realizados en relación a la activación de la PLD descartan la participación de la PC-PLD. Otro dato experimental que apoya la participación de un sistema PC-PLC frente a la de una PC-PLD, viene dado por el efecto de la activación de la PKC en este sistema. La evidencia disponible sugiere que la PC-PLC y la PC-PLD están reguladas de forma diferente por la PKC (74,164-166). Mientras que esta enzima activaría la PC-PLD, su acción sobre la PC-PLC es claramente inhibitoria, tal como ocurre en este caso (74,164-167). Además, la preincubación de las células con inhibidores de PC-PLC y DAG-K causaron una inhibición total de la señal de calcio inducida por el bVLF. La

no acumulación de DAG intracelular parece apoyar la idea de que todo el DAG generado es transformado inmediatamente en PA por medio de la DAG-K. En general, los resultados sugieren que la señal de calcio es debida a un aumento de los niveles de PA y no a la conversión del PA a LPA, como se ha demostrado para otros sistemas (54). De hecho, la dinámica de generación del PA intracelular es paralela a la dinámica de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por el bVLF. En este sistema experimental, el PA es la señal responsable del aumento de calcio de depósitos no sensibles a  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  mas que una mera consecuencia de la elevación de calcio como se ha sugerido para otros sistemas (53).

Todos los datos obtenidos muestran que el bVLF actúa a través de un mecanismo de señalización diferente al utilizado por el LPA, y otros lípidos bioactivos (78,79,89,90,98). En base a los datos experimentales parece que la unión del ligando al receptor activa la PC-PLC a través de una proteína G sensible a PTX. La activación de la PC-PLC da lugar a la formación de fosfocolina y DAG. Este último es convertido rápidamente a PA por medio de una DAG-K asociada al complejo receptor-proteína G, sin activación aparente de la PKC. Se ha demostrado que la DAG-K está topológicamente restringida a la membrana plasmática y físicamente acoplada a este tipo de receptores (53). El PA actuaría sobre los depósitos intracelulares no sensibles a  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , activando los canales de calcio que produciría el aumento de la concentración de este ión en el citosol (Figura 52).

El sistema de señalización intracelular propuesto en las células EGFR-T17 para el bVLF es susceptible de ser regulado por la PKC, aunque este enzima no es activado por este factor. Este punto permite explicar la no activación del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ni la consecuente modificación del pHi tras la estimulación con el bVLF. Este fenómeno sí se observó para el LPA o la S1P en este sistema celular, lo cual es concordante con lo descrito previamente para otros sistemas celulares (168,169). Para estos lípidos, el calcio movilizado procede de depósitos sensibles a  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ , y consecuentemente la administración del LPA o la S1P activa la PKC a través del DAG generado.

Los resultados presentados demuestran además que la hiperpolarización de membrana es una “nueva” señal temprana activada por el bVLF en células EGFR-T17. Los mecanismos responsables por los cuales el bVLF induce esta hiperpolarización fueron delimitados, al menos en parte, por un análisis sistemático. Se vio que la hiperpolarización era debida a una corriente de salida, lo cual hacía pensar en la activación de corrientes

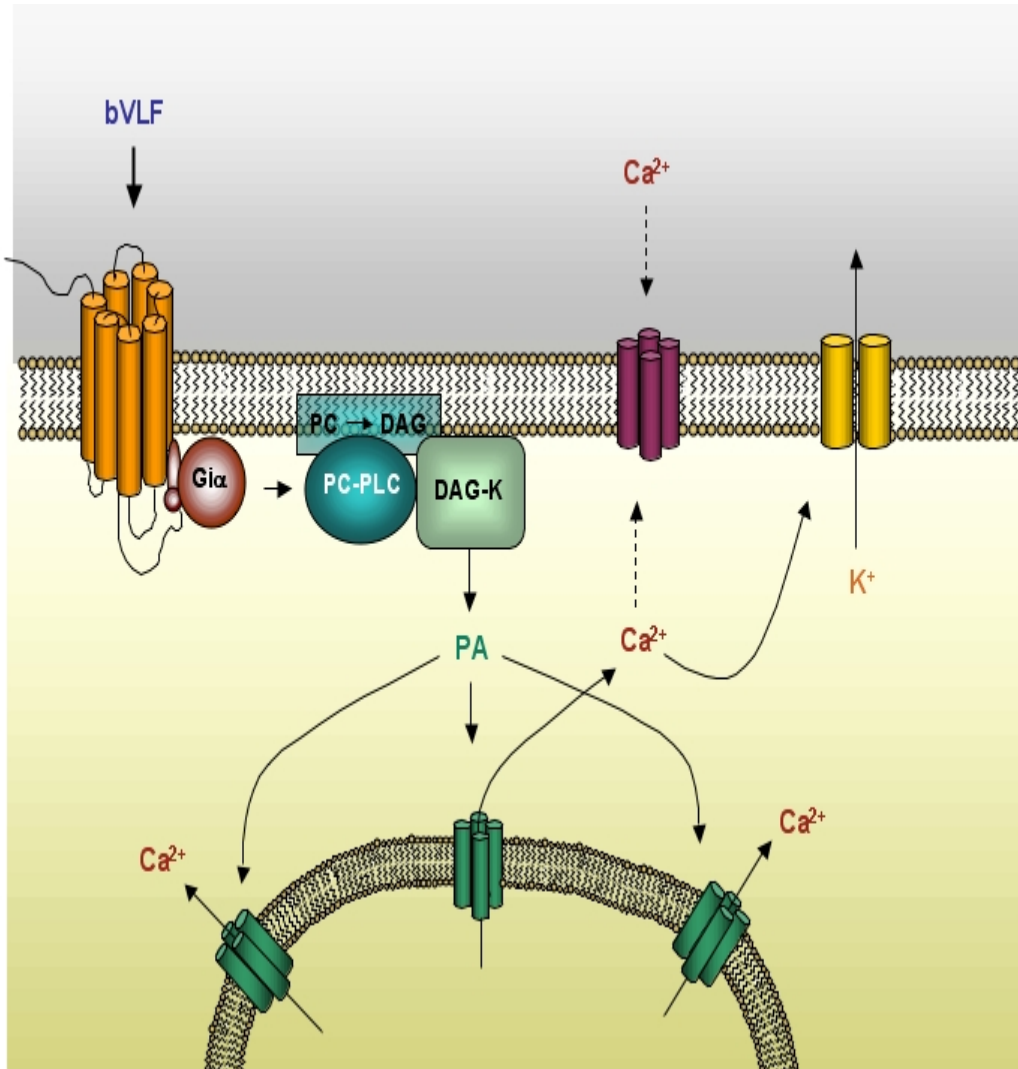
eléctricas en las que estuvieran implicada la salida de cationes, lo que parecía descartar la inhibición de la entrada de cationes como el  $\text{Na}^+$  al medio intracelular. Este punto se vio apoyado tras no observar ninguna modificación en la respuesta de hiperpolarización cuando las células se encontraban en medio libre de  $\text{Na}^+$ , lo que excluye la participación de sistemas de intercambio iónico como el  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  o el  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Por otra parte, los resultados obtenidos con altas concentraciones de  $\text{K}^+$  en el medio extracelular junto con la gramicidina, ionóforo de cationes monovalentes, sugiere la implicación de una corriente de  $\text{K}^+$ . Los ensayos electrofisiológicos, en los que el gradiente electroquímico para el  $\text{K}^+$  fue invertido, muestran como la corriente activada por el bVLF es invertida y por lo tanto aparece como una corriente de entrada. Otro dato experimental que apoya la activación de una corriente de  $\text{K}^+$ , viene dado por el efecto de la completa sustitución de  $\text{K}^+$  por  $\text{Cs}^+$  (inhibidor de canales de  $\text{K}^+$ ) en el medio intracelular lo cual abolió completamente la hiperpolarización inducida por el bVLF. Además, los estudios farmacológicos confirmaron la implicación de los canales de  $\text{K}^+$ . La quinina, un bloqueante de canales de  $\text{K}^+$ , resultó ser el inhibidor más potente seguido por la 4-aminopiridina, un agente bloqueante no específico de canales de  $\text{K}^+$  voltaje dependientes. Por otra parte, el papel del calcio como activador de la apertura de este tipo de canales se ve apoyada por la hiperpolarización activada por la ionomicina, así como la inhibición de la corriente activada tras la quelatación del calcio intracelular con BAPTA. De hecho, la dinámica de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  es paralela a la dinámica de hiperpolarización activada por el bVLF. En este sistema experimental, la hiperpolarización activada por el bVLF es debida a la activación de una corriente de salida a través de canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Los canales de  $\text{K}^+$  se abren en respuesta al incremento de las concentraciones de calcio intracelular regulando el potencial de membrana. Estos tipo de canales han sido clasificados como de alta (BKCa), intermedia (IKCa) y baja (SKCa) conductancia, en base a las diferencias de conductancia así como a las propiedades farmacológicas (104,106,170). La naturaleza de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por el bVLF fueron investigados por estudios farmacológicos. Los resultados negativos tras el tratamiento con apamina y D-tubocuramina, descartaron la implicación de los canales de  $\text{K}^+$  de baja conductancia (SKCa) (105,171). A pesar de que la caribdotoxina ha sido implicada en la inhibición de canales de  $\text{K}^+$  tanto de alta como de intermedia conductancia, la acción predominante de

esta toxina a bajas concentraciones es la inhibición de los canales de alta conductancia (104,105,171). Aunque el grado de inhibición obtenido tras el tratamiento con la iberiotoxina, inhibidor específico de canales de alta conductancia (105), descartan la participación de canales de intermedia conductancia. Otro dato experimental que apoya la participación de canales de alta conductancia, viene dado por el efecto de la 4-aminopiridina. La evidencia disponible sugiere que el bVLF activa canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  de alta conductancia.

Las uniones gap median las comunicaciones entre células en la mayoría de los tejidos y son fundamentales en la coordinación de varios procesos biológicos (172,173). Las uniones gap son esenciales para la difusión directa entre células vecinas de iones como el calcio, de pequeñas moléculas señal como el inositol trifosfato o los nucleótidos cíclicos, ejerciendo además un papel relevante en el acoplamiento eléctrico entre células (174,175). Existe evidencia que un incremento en los niveles de  $Ca^{2+}$  citoplasmático puede interrumpir el acoplamiento célula-célula (99,109,172). A pesar de la fuerte actividad movilizadora de calcio inducida por el bVLF, este factor no tiene efecto sobre el acoplamiento celular entre células EGFR-T17. Estos resultados descartan el papel del  $Ca^{2+}$  como regulador directo de las comunicaciones intercelulares bajo condiciones fisiológicas, hecho que se había sugerido previamente para el LPA en otro sistema celular (61). El efecto del 1-octanol sobre la comunicación intercelular podría explicarse por una modificación de la fluidez de la membrana o bien de las proteínas de membrana, lo que afectaría a la conformación de las conexinas.

La activación de esta cascada de transducción de señales no se ha seguido, en nuestro sistema experimental, de una actividad mitogénica ni de una capacidad de modulación sobre las respuestas de otros factores mitogénicos como el EGF o el FGF. Tampoco observamos efecto alguno del bVLF sobre la muerte celular, tanto en apoptosis como en necrosis. Hay que tener en cuenta que esta parte experimental se ha realizado sobre una línea celular muy concreta, los fibroblastos EGFR-T17, por su gran sensibilidad para el estudio de movimientos de calcio, pero no necesariamente representativa de las líneas celulares más involucradas en los procesos proliferativos en el ojo. En base a ello, se realizaron estudios utilizando como modelo las células hRPE al ser éstas una de las líneas celulares más implicadas en los procesos proliferativos alterados descritos en el ojo como la PDR (5,7).



**Figura 52.-** Modelo propuesto de señalización para el bVLF. La administración del bVLF induce la activación de la PC-PLC que hidroliza la PC de la membrana plasmática dando lugar a fosfocolina y DAG. El DAG generado es transformado en PA por una DAG-K acoplada al sistema. El PA es responsable directo de la liberación de calcio de los depósitos intracelulares no sensibles a  $Ins(1,4,5)P_3$ . No existe una activación de PKC por el DAG. En este sistema, el calcio es responsable de la activación de una corriente de  $K^+$  a través de canales de alta conductancia dependientes de calcio. La línea punteada indica la activación de una entrada capacitativa de calcio específica para las células hRPE.

En ojos sanos las células hRPE se encuentran fundamentalmente en fase estacionaria o con escasa capacidad mitogénica, por lo que un aumento de la(s) concentración(es) de factores de crecimiento como el FGF (176-178), el EGF (114,179), el VEGF (180-184), el PDGF (114,179), el IGF-1 (185), el HGF (186-188), el TNF $\alpha$  (189), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF, connective tissue growth factor) (190), el TGF $\beta$  (91,191,192), o el PEDF (pigment epithelium-derived factor) (117,180), es capaz de modificar el comportamiento de las hRPE y activar procesos como migración, mitosis y diferenciación celular. Se ha demostrado que los niveles de diferentes GF están elevados en las muestras de vítreos de pacientes con PDR (6,21,117,193-195). Sin embargo, no en todos los casos ha sido posible encontrar una correlación inequívoca entre los niveles de estos factores y la severidad de la patología (6,21,117,195-197), por lo que se deduce que los GFs no participan de forma directa en la iniciación de tales procesos. Además, la mayoría de los estudios realizados se han centrado en la determinación de factores de una forma individual, ignorando cualquier interrelación que pueda producirse con los demás GFs presentes en el vítreo. Entre las hipótesis que están emergiendo cabe destacar la idea que plantea que el desequilibrio entre factores estimulatorios e inhibitorios podría ser la causa para la iniciación de esta patología y no el aumento de un GF determinado (6,21,114,196). Por otra parte, cabe destacar el desconocimiento que existe actualmente en relación a la presencia de compuestos de bajo peso molecular, entre ellos los lípidos, así como el papel que desempeñan en el vítreo y su relación con esta patología. En base a ello, se optó por determinar el efecto del bVLF sobre cultivos primarios de células hRPE. Se ha demostrado que el aumento en la concentración de calcio intracelular inducida por el bVLF es consecuencia de una liberación de calcio a partir de depósitos intracelulares con participación de calcio extracelular, fenómeno que no se registró para los ensayos realizados en las células EGFR-T17. En una primera aproximación, se partió de la idea de que este compuesto podría estar activando la misma cascada de señalización descrita para las células EGFR-T17. Los datos experimentales obtenidos permitieron comprobar como el bVLF activa la misma ruta de señalización, en el cual el PA estaría activando la movilización de calcio de depósitos intracelulares insensibles a Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> a través de un sistema receptor/proteínas G/PC-PLC/DAG-K. Sin embargo, es importante destacar la entrada capacitativa de calcio como punto que marca una diferencia entre ambos sistemas, lo cual nos hizo pensar en

efectos biológicos diferentes. La activación de este sistema de señales no lleva a una actividad mitogénica en las células hRPE. Sin embargo, sí se observó un efecto significativo sobre la inhibición de la división celular especialmente sobre la respuesta mitogénica activada por diferentes GFs: FGF, EGF, PDGF e IGF. Por el contrario, el bVLF mostró un efecto inhibitorio discreto sobre el HGF que no llega a ser significativo para ninguno de los ensayos realizados. Estos factores regulan la capacidad mitogénica y migratoria en las células hRPE en los procesos de neovascularización observados en diversas patologías oculares, entre ellas la PDR (6). En general, las acciones celulares tienen lugar a través de la integración de un complejo entramado de señales intracelulares más que por la activación de rutas de señalización aisladas. Por ejemplo, ensayos realizados *in vitro* en las células RPE muestran cómo la combinación de ciertos GFs, como el PDGF y el bFGF, tiene un efecto sinérgico sobre la capacidad mitogénica de las células RPE, aunque no para todos ellos (114). La combinación de factores como IGF-I+TGF $\beta$ , IGF-1+VEGF, PDGF+TGF $\beta$ , VEGF+TGF $\beta$  o bFGF+TGF $\beta$  ejerce un claro papel de inhibición sobre la síntesis de DNA en esta línea celular (114). En general, estas interacciones complejas entre los GFs representan un mecanismo importante que regula y modula la especificidad y la magnitud de las respuestas celulares tanto en condiciones normales como en situaciones patológicas (198). Por lo que nos propusimos esclarecer el papel del bVLF como modulador de la respuesta mitogénica trabajando con una combinación completa de factores, como es el FBS. Los datos obtenidos muestran un claro efecto de inhibición del bVLF sobre la capacidad de división celular activada por los diferentes factores de crecimiento que forman parte del suero. Estos datos muestran inequívocamente que el bVLF ejerce un papel inhibitorio sobre la capacidad mitogénica de diferentes GFs en las células hRPE. En conjunto, uno de los conceptos más importantes que ha surgido de este trabajo ha sido la determinación de un factor inhibitorio de la proliferación celular de características lipídicas en muestras de vítreo no patológico, lo que apoya la idea de que cualquier alteración en el balance entre factores de tipo inhibitorio y de tipo proliferativo daría paso de un entorno inhibitorio a uno estimulador conduciendo a procesos proliferativos alterados.

La identificación de este tipo de lípidos, con potente actividad celular podría tener importantes e inesperadas implicaciones en la patofisiología de los fenómenos proliferativos alterados a nivel del vítreo y la retina. Quedan aún muchos puntos que necesitan ser aclarados, tales como la presencia de

este factor en muestras humanas, sus niveles en condiciones normales y patológicas, así como la determinación de modificaciones estructurales de la misma que puedan estar asociadas al tipo de patología. Ello permitiría determinar si los desordenes proliferativos son promovidos por una sobreestimulación producida por los GFs o por una insuficiencia de factores inhibitorios.







## **Conclusiones**



## CONCLUSIONES

Se ha conseguido la caracterización parcial de un gangliósido bioactivo a partir de muestras de vítreo bovino, no descrito hasta este momento en el vítreo. Se ha caracterizado el mecanismo de señalización intracelular para la movilización de calcio, que implica la activación de una proteína de membrana acoplada a una fosfolipasa C específica de fosfatidilcolina (PC-PLC) a través de una proteína G sensible a PTX. La activación de la PC-PLC da lugar a la generación de fosfocolina y diacilglicerol (DAG) a partir de la fosfatidilcolina. El DAG generado es convertido en ácido fosfatídico (PA) por una diacilglicerol quinasa (DAG-K), siendo el PA responsable de la liberación de calcio de depósitos intracelulares no sensibles a inositol trifosfato. Se ha conseguido caracterizar la corriente de  $K^+$  activada por este factor que aparece asociada con la movilización de calcio dependiente del PA. Se ha determinado su papel como posible modulador de la respuesta mitogénica activada por factores de crecimiento en las células de epitelio pigmentario retiniano humano. Este efecto no se observó en los fibroblastos EGFR-T17, en los que el bVLF no tiene efecto mitogénico ni inhibidor alguno. En general, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis que baraja la idea de la existencia de factores inhibitorios que regulan, bajo un delicado equilibrio con los factores de crecimiento, los procesos proliferativos en el ojo. De esta forma, el aumento de los niveles de uno o más factores de crecimiento, o bien, niveles insuficientes de factores inhibitorios, podrían desplazar el balance de un entorno inhibitorio a uno favorecedor para la proliferación.





## **Bibliografía**



## BIBLIOGRAFÍA

1. **Kim JO, Cotlier E** 1976 Phospholipid distributions and fatty acid composition of lysophosphatidylcholine and phosphatidylcholine in rabbit aqueous humor, lens and vitreous. *Exp Eye Res* 22:569-576
2. **Macleod D** 1995 Vítreo y trastornos vitreoretinianos. In: D.Spaldton, R.Hitchings and, P.Hunter (eds). *Atlas de oftalmología clínica*. Madrid:2-24
3. **O'Malley C** 1990 Cuerpo vítreo. In: D.Vaughan and T.Asbury (ed). *Oftalmología general*. México:147-158
4. **Sebag J.** 1994 El vítreo. In: W.Hart (ed). *Fisiología del ojo*. Madrid:270-349
5. **Barry P** 1997 The management of Diabetic disease. In: J.Pickup and G.Williams (ed). *Textbook of Diabetes*.Blackwell Science, Osford:47.1-47.18
6. **Pfeiffer A, Spranger J, Meyer-Schwickerath R, Schatz H** 1997 Growth factor alterations in advanced diabetic retinopathy: a possible role of blood retina barrier breakdown. *Diabetes* 46 Suppl 2:S26-S30
7. **Boulton M, Gregor Z, McLeod D, Charteris D, Jarvis-Evans J, Moriarty P, Khaliq A, Foreman D, Allamby D, Bardsley B** 1997 Intravitreal growth factors in proliferative diabetic retinopathy: correlation with neovascular activity and glycaemic management. *Br J Ophthalmol* 81:228-233
8. **Wiedemann P** 1992 Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. *Surv Ophthalmol* 36:373-384
9. **Sharp PS** 1995 The role of growth factors in the development of diabetic retinopathy. *Metabolism* 44:72-75
10. **Baird A, Culler F, Jones KL, Guillemin R** 1985 Angiogenic factor in human ocular fluid. *Lancet* 2:563
11. **Caruelle D, Groux-Muscatelli B, Gaudric A, Sestier C, Coscas G, Caruelle JP, Barritault D** 1989 Immunological study of acidic fibroblast growth factor (aFGF) distribution in the eye. *J Cell Biochem* 39:117-128
12. **Sivalingam A, Kenney J, Brown GC, Benson WE, Donoso L** 1990 Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 108:869-872
13. **Kim SJ, Park K, Rudkin BB, Dey BR, Sporn MB, Roberts AB** 1994 Nerve growth factor induces transcription of transforming growth factor-beta 1 through a specific promoter element in PC12 cells. *J Biol Chem* 269:3739-3744
14. **Hardwick C, Feist R, Morris R, White M, Witherspoon D, Angus R, Guidry C** 1997 Tractional force generation by porcine Muller cells: stimulation by growth factors in human vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2053-2063
15. **Luna JD, Chan CC, Derevjani NL, Mahlow J, Chiu C, Peng B, Tobe T, Campochiaro PA, Viores SA** 1997 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* 49:268-280

16. **Spranger J, Meyer-Schwickerath R, Klein M, Schatz H, Pfeiffer A** 1995 [TNF-alpha level in the vitreous body. Increase in neovascular eye diseases and proliferative diabetic retinopathy]. *Med Klin (Munich)* 90:134-137
17. **Limb GA, Hollifield RD, Webster L, Charteris DG, Chignell AH** 2001 Soluble TNF receptors in vitreoretinal proliferative disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1586-1591
18. **Briggs MC, Grierson I, Hiscott P, Hunt JA** 2000 Active scatter factor (HGF/SF) in proliferative vitreoretinal disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:3085-3094
19. **Connor TB, Jr, Roberts AB, Sporn MB, Danielpour D, Dart LL, Michels RG, de Bustros S, Enger C, Kato H, Lansing M, .** 1989 Correlation of fibrosis and transforming growth factor-beta type 2 levels in the eye. *J Clin Invest* 83:1661-1666
20. **Spranger J, Meyer-Schwickerath R, Klein M, Schatz H, Pfeiffer A** 1995 TNF-alpha level in the vitreous body. Increase in neovascular eye diseases and proliferative diabetic retinopathy. *Med Klin (Munich)* 90:134-137
21. **Schultz GS, Grant MB** 1991 Neovascular growth factors. *Eye* 5:170-180
22. **Thoreson WB, Ryan JS, Shi C, Kelly ME, Bryson EJ, Toews ML, Ediger TL, Chacko DM** 2002 Lysophosphatidic acid receptor signaling in mammalian retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2450-2461
23. **Thoreson WB, Khandalavala BN, Manahan RG, Polyak IA, Liu JL, Chacko DM** 1997 Lysophosphatidic acid stimulates proliferation of human retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res* 16:698-702
24. **Camina JP, Casabiell XA, Perez FR, Lage M, Casanueva FF** 1998 Isolation of a bioactive Ca(2+)-mobilizing complex lipid from bovine vitreous body. *Biochem Biophys Res Commun* 244:696-700
25. **Pandiella A, Beguinot L, Velu TJ, Meldolesi J** 1988 Transmembrane signalling at epidermal growth factor receptors overexpressed in NIH 3T3 cells. Phosphoinositide hydrolysis, cytosolic Ca<sup>2+</sup> increase and alkalization correlate with epidermal-growth-factor-induced cell proliferation. *Biochem J* 254:223-228
26. **Casabiell X, Pandiella A, Casanueva FF** 1991 Regulation of epidermal-growth-factor-receptor signal transduction by cis-unsaturated fatty acids. Evidence for a protein kinase C-independent mechanism. *Biochem J* 278 ( Pt 3):679-687
27. **Perez FR, Casabiell X, Camina JP, Zugaza JL, Casanueva FF** 1997 cis-unsaturated free fatty acids block growth hormone and prolactin secretion in thyrotropin releasing hormone stimulated GH3 cells by perturbing the function of plasma membrane integral proteins. *Endocrinology* 138:264-272
28. **Wiedemann P, Weller M** 1988 The pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy. *Acta Ophthalmol Suppl* 189:3-15
29. **Camina JP, Casanueva FF** 2000 Vitreous-derived lipid factor: a new eye related growth factor? *Recent Res Devel Endocrinol.*:145-154
30. **Ferguson M, Williams A** 1988 Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem* 57:285-320
31. **Pratt JC, Gaulton GN** 1993 Multifunctional roles of glycosyl-phosphatidylinositol lipids. *DNA Cell Biol* 12:861-869

32. **Mark C Field and Anant K Menon** 1992 Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol membrane protein anchors. In: D.Rickwood and B.D.Hames (ed). Lipid Modification of proteins a practical approach.:155-190
33. **Guther ML, Masterson WJ, Ferguson MA** 1994 The effects of phenylmethylsulfonyl fluoride on inositol-acylation and fatty acid remodeling in African trypanosomes. J Biol Chem 269:18694-18701
34. **Bartlett G** 1959 Phosphorus assay in column chromatography. J Biol Chem 234:466-468
35. **Previato JO, Jones C, Xavier MT, Wait R, Travassos LR, Parodi AJ, Mendonca-Previato L** 1995 Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of Trypanosoma cruzi Y-strain. J Biol Chem 270:7241-7250
36. **Bernard Fried** 1991 Biological/Biomedical applications of liquid chromatography IV. In: Jack Cazes (ed). Handbook of thin layer chromatography.:593-624
37. **Morris Kates** 1986 Separation of lipid mixtures. Techniques of lipidology. Isolation analysis and identification of lipids. Amsterdam. New York. Oxford:187-274
38. **Alexander P** 1990 Glycosides of hidroxy fatty acids. In: Morris Kates (ed). Handbook of lipid research.:463-484
39. **Leverly SB, Toledo MS, Straus AH, Takahashi HK** 1998 Structure elucidation of sphingolipids from the mycopathogen Paracoccidioides brasiliensis: an immunodominant beta-galactofuranose residue is carried by a novel glycosylinositol phosphorylceramide antigen. Biochemistry 37:8764-8775
40. **Association of official analytical chemists A** 1984 Official methods of analysis., 14th edn
41. **Carter HE, Gaver RC** 1967 Branched-chain sphingosines from Tetrahymena pyriformis. Biochem Biophys Res Commun 26:886-891
42. **Michael AJ Ferguson** 1992 Chemical and enzymic analysis of glycosylphosphatidylinositol anchors. In: Hooper N.M.and Turner A.J. (ed). Lipid Modification of proteins. A practical Approach. Oxford:191-230
43. **Velu TJ, Beguinot L, Vass WC, Willingham MC, Merlino GT, Pastan I, Lowy DR** 1987 Epidermal growth factor dependent transformation by a human EGF receptor proto oncogene. Science 238:1408-1410
44. **Velu TJ, Beguinot L, Vass WC, Zhang K, Pastan I, Lowy DR** 1989 Retroviruses expressing different levels of the normal epidermal growth factor receptor: biological properties and new bioassay. J Cell Biochem 39:153-166
45. **Zhang BX, Zhao H, Loessberg P, Muallem S** 1992 Activation of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump during agonist stimulation of pancreatic acini. J Biol Chem 267:15419-15425
46. **Lopez R, Gouras P, Brittis M, Kjeldbye H** 1987 Transplantation of cultured rabbit retinal epithelium to rabbit retina using a closed-eye method. Invest Ophthalmol Vis Sci 28:1131-1137
47. **Capponi A PLWSaP** 1986 Use of intracellular calcium and membrane potential fluorescent indicators in neuroendocrine cells. Methods in enzymology 124.:116-135

48. **Capeans C, Pineiro A, Pardo M, Carneiro C, Blanco MJ, Vinuela JM, Sanchez SM, Dominguez F** 2001 Role of inhibitors of isoprenylation in proliferation, phenotype and apoptosis of human retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239:188-198
49. **Arslan P, Di Virgilio F, Beltrame M, Tsien RY, Pozzan T** 1985 Cytosolic Ca<sup>2+</sup> homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* 260:2719-2727
50. **Berridge MJ, Downes CP, Hanley MR** 1982 Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem J* 206:587-595
51. **Perez FR, Casabiell X, Camina JP, Zugaza JL, Casanueva FF** 1997 cis-unsaturated free fatty acids block growth hormone and prolactin secretion in thyrotropin-releasing hormone-stimulated GH3 cells by perturbing the function of plasma membrane integral proteins. *Endocrinology* 138:264-272
52. **Jordi Folch ML, and G H Sloane Stanley** 1957 A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497-509
53. **van Blitterswijk WJ, Hilkmann H, de Widt J, van der Bend RL** 1991 Phospholipid metabolism in bradykinin-stimulated human fibroblasts. II. Phosphatidylcholine breakdown by phospholipases C and D; involvement of protein kinase C. *J Biol Chem* 266:10344-10350
54. **Orlati S, Porcelli AM, Hrelia S, Lorenzini A, Rugolo M** 1998 Intracellular calcium mobilization and phospholipid degradation in sphingosylphosphorylcholine-stimulated human airway epithelial cells. *Biochem J* 334:641-649
55. **Rink TJ, Tsien RY, Pozzan T** 1982 Cytoplasmic pH and free Mg<sup>2+</sup> in lymphocytes. *J Cell Biol* 95:189-196
56. **Boyer M j, Hedley D W** 1994 Measurement of intracellular pH. *Methods Cell Biol* 41:135-148
57. **Alfonso A, Botana MA, Vieytes MR, Botana LM** 1994 Functional characterization of the Na(+)-H+ exchanger in rat mast cells: crosstalks between different kinase pathways. *Eur J Pharmacol* 267:289-296
58. **Thomas JA, Buchsbaum RN, Zimniak A, Racker E** 1979 Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry* 18:2210-2218
59. **Amlal H, Paillard M, Bichara M** 1994 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport pathways in cells of medullary thick ascending limb of rat kidney. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> conductance and K<sup>+</sup>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>(H<sup>+</sup>) antiport. *J Biol Chem* 269:21962-21971
60. **Pandiella A, Magni M, Lovisolo D, Meldolesi J** 1989 The effect of epidermal growth factor on membrane potential. Rapid hyperpolarization followed by persistent fluctuations. *J Biol Chem* 264:12914-12921
61. **Postma FR, Jalink K, Hengeveld T, Bot AG, Alblas J, de Jonge HR, Moolenaar WH** 1996 Serum-induced membrane depolarization in quiescent fibroblasts: activation of a chloride conductance through the G protein-coupled LPA receptor. *EMBO J* 15:63-72

62. **Camina JP, Diaz-Rodriguez E, Harks EG, Theuvenet AP, Ypey DL, Casanueva FF** 2003 Lipid factor (bVLF) from bovine vitreous body evokes in EGFR-T17 cells a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> current associated with inositol 1,4,5-trisphosphate-independent Ca<sup>2+</sup> mobilization. *J Cell Physiol* 195:108-118
63. **Harks EG, de Roos AD, Peters PH, de Haan LH, Brouwer A, Ypey DL, van Zoelen EJ, Theuvenet AP** 2001 Fenamates: a novel class of reversible gap junction blockers. *J Pharmacol Exp Ther* 298:1033-1041
64. **de Roos AD, van Zoelen EJ, Theuvenet AP** 1996 Determination of gap junctional intercellular communication by capacitance measurements. *Pflugers Arch* 431:556-563
65. **Kreipe H, Wacker HH, Heidebrecht HJ, Haas K, Hauberg M, Tiemann M, Parwaresch R** 1993 Determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphomas by monoclonal antibody Ki-S5 directed against a formalin-resistant epitope of the Ki-67 antigen. *Am J Pathol* 142:1689-1694
66. **Pons A, Timmerman P, Leroy Y, Zanetta JP** 2002 Gas-chromatography/mass-spectrometry analysis of human skin constituents as heptafluorobutyrate derivatives with special reference to long-chain bases. *J Lipid Res* 43:794-804
67. **G Dawson, and C C Sweeley** 1971 Mass spectrometry of neutral, mono- and disialoglycosphingolipids. *Lipid Research* 12:56-64
68. **Previato JO, Gorin PA, Mazurek M, Xavier MT, Fournet B, Wieruszsk JM, Mendonca-Previato L** 1990 Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 265:2518-2526
69. **D E Vance, C C Sweeley** 1967 Quantitative determination of the neutral glycosyl ceramides. *Lipid Research* 8:621-630
70. **Byron KL, Babnigg G, Villereal ML** 1992 Bradykinin-induced Ca<sup>2+</sup> entry, release, and refilling of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. Relationships revealed by image analysis of individual human fibroblasts. *J Biol Chem* 267:108-118
71. **Law GJ, Pachter JA, Thastrup O, Hanley MR, Dannies PS** 1990 Thapsigargin, but not caffeine, blocks the ability of thyrotropin-releasing hormone to release Ca<sup>2+</sup> from an intracellular store in GH4C1 pituitary cells. *Biochem J* 267:359-364
72. **Riordan J, and B Vallee** 1972 Reactions with N-Ethylmaleimide and p-mercuribenzoate. In: C Hirs and S Timasheff (ed). *Enzyme structure*. Academic Press, New York:449-457
73. **Berridge MJ** 1987 Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 56:159-193
74. **Nishizuka Y** 1992 Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614
75. **Okuyama H, and K Monde** 1996 Identification of an ornithine-containing lipid from *Cytophaga johnsonae* Stainer strain. *Chem Phys lipids* 83:169-173
76. **Hovis JG, Stumpo DJ, Halsey DL, Blackshear PJ** 1986 Effects of mitogens on ornithine decarboxylase activity and messenger RNA levels in normal and protein kinase C-deficient NIH-3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 261:10380-10386
77. **Moolenaar WH** 1995 Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem* 270:12949-12952

78. **Mills GB, Moolenaar WH** 2003 The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 3:582-591
79. **Moolenaar WH** 2000 Development of our current understanding of bioactive lysophospholipids. *Ann N Y Acad Sci* 905:1-10
80. **Xie Y, Gibbs TC, Meier KE** 2002 Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator. *Biochim Biophys Acta* 1582:270-281
81. **Fang X, Schummer M, Mao M, Yu S, Tabassam FH, Swaby R, Hasegawa Y, Tanyi JL, LaPushin R, Eder A, Jaffe R, Erickson J, Mills GB** 2002 Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta* 1582:257-264
82. **Ye X, Ishii I, Kingsbury MA, Chun J** 2002 Lysophosphatidic acid as a novel cell survival/apoptotic factor. *Biochim Biophys Acta* 1585:108-113
83. **Sprang SR** 1997 G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* 66:639-678
84. **Singer WD, Brown HA, Sternweis PC** 1997 Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu Rev Biochem* 66:475-509
85. **Ribeiro CM, Putney JW** 1996 Differential effects of protein kinase C activation on calcium storage and capacitative calcium entry in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 271:21522-21528
86. **Ribeiro CM, Reece J, Putney JW** 1997 Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3T3 cells. An intact cytoskeleton is required for agonist-induced Ca<sup>2+</sup> signaling, but not for capacitative calcium entry. *J Biol Chem* 272:26555-26561
87. **Takuwa Y, Takuwa N, Sugimoto N** 2002 The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities. *J Biochem (Tokyo)* 131:767-771
88. **Fukushima N, Chun J** 2001 The LPA receptors. *Prostaglandins* 64:21-32
89. **Spiegel S, Milstien S** 2003 Exogenous and intracellularly generated sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways. *Biochem Soc Trans* 31:1216-1219
90. **Spiegel S, Milstien S** 2003 Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:397-407
91. **Esser P, Heimann K, Bartz-Schmidt KU, Fontana A, Schraermeyer U, Thumann G, Weller M** 1997 Apoptosis in proliferative vitreoretinal disorders: possible involvement of TGF-beta-induced RPE cell apoptosis. *Exp Eye Res* 65:365-378
92. **Xu Y, Xiao YJ, Zhu K, Baudhuin LM, Lu J, Hong G, Kim KS, Cristina KL, Song L, Williams S, Elson P, Markman M, Belinson J** 2003 Unfolding the pathophysiological role of bioactive lysophospholipids. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3:23-32
93. **Meyer Zu HD, Himmel HM, Jakobs KH** 2002 Sphingosylphosphorylcholine-biological functions and mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* 1582:178-189

94. **Sakane F, Yamada K, Imai S, and Kanoh H** 1969 Porcine 80K-Da diacylglycerol kinase is calcium-binding and calcium/phospholipid-dependent enzyme and undergoes calcium-dependent translocation. *J Biol Chem* 266:7096-7100
95. **Sakano S, Takemura H, Yamada K, Imoto K, Kaneko M, Ohshika H** 1996 Ca<sup>2+</sup> mobilizing action of sphingosine in Jurkat human leukemia T cells. Evidence that sphingosine releases Ca<sup>2+</sup> from inositol trisphosphate- and phosphatidic acid-sensitive intracellular stores through a mechanism independent of inositol trisphosphate. *J Biol Chem* 271:11148-11155
96. **de Chaffoy de Courcelles DC, Roevens P, Van Belle H** 1985 R 59 022, a diacylglycerol kinase inhibitor. Its effect on diacylglycerol and thrombin-induced C kinase activation in the intact platelet. *J Biol Chem* 260:15762-15770
97. **Macrez-Lepretre N, Morel JL, Mironneau J** 1996 Effects of phospholipase C inhibitors on Ca<sup>2+</sup> channel stimulation and Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores evoked by alpha 1A- and alpha 2A-adrenoceptors in rat portal vein myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 218:30-34
98. **Camina JP, Casabiell X, Casanueva FF** 1999 Inositol 1,4,5-trisphosphate-independent Ca(2+) mobilization triggered by a lipid factor isolated from vitreous body. *J Biol Chem* 274:28134-28141
99. **Kumar NM, Gilula NB** 1996 The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388
100. **Kanemitsu MY, Lau AF** 1993 Epidermal growth factor stimulates the disruption of gap junctional communication and connexin43 phosphorylation independent of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-sensitive protein kinase C: the possible involvement of mitogen-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* 4:837-848
101. **Lovisolio D, Bonelli G, Baccino FM, Peres A, Alonzo F, Munaron L** 1992 Two currents activated by epidermal growth factor in EGFR-T17 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1104:73-82
102. **Haylett D G, Jenkinson D H** 1990 Calcium-activated potassium channels. In: *Niegel S C (ed). Potassium channels: structure, classification, function and therapeutic potential.* Ellis Horwood Limited, England:70-86
103. **Ishii TM, Maylie J, Adelman JP** 1997 Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *J Biol Chem* 272:23195-23200
104. **Kaczorowski GJ, Garcia ML** 1999 Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Chem Biol* 3:448-458
105. **Kaczorowski GJ, Knaus HG, Leonard RJ, McManus OB, Garcia ML** 1996 High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J Bioenerg Biomembr* 28:255-267
106. **Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP** 1998 Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8:321-329
107. **Bruzzone R, White TW, Paul DL** 1996 Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238:1-27
108. **Hill CS, Oh SY, Schmidt SA, Clark KJ, Murray AW** 1994 Lysophosphatidic acid inhibits gap-junctional communication and stimulates phosphorylation of connexin-43 in WB cells: possible involvement of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 303 ( Pt 2):475-479

109. **Spray DC, Bennett MV** 1985 Physiology and pharmacology of gap junctions. *Annu Rev Physiol* 47:281-303
110. **Frelin C, Vigne P, Ladoux A, Lazdunski M** 1988 The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. *Eur J Biochem* 174:3-14
111. **Nanda A, Grinstein S** 1991 Protein kinase C activates an H<sup>+</sup> (equivalent) conductance in the plasma membrane of human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10816-10820
112. **Gerlier D, Thomasset N** 1986 Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 94:57-63
113. **Albanese C, D'Amico M, Reutens AT, Fu M, Watanabe G, Lee RJ, Kitsis RN, Henglein B, Avantaggiati M, Somasundaram K, Thimmapaya B, Pestell RG** 1999 Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. *J Biol Chem* 274:34186-34195
114. **Kaven CW, Spraul CW, Zavazava NK, Lang GK, Lang GE** 2000 Growth factor combinations modulate human retinal pigment epithelial cell proliferation. *Curr Eye Res* 20:480-487
115. **Proulx S, Guerin SL, Saless C** 2003 Effect of quiescence on integrin alpha5beta1 expression in human retinal pigment epithelium. *Mol Vis* 9:473-481
116. **Heth CA, Marescalchi PA** 1994 Inositol trisphosphate generation in cultured rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:409-416
117. **Spranger J, Osterhoff M, Reimann M, Mohlig M, Ristow M, Francis MK, Cristofalo V, Hammes HP, Smith G, Boulton M, Pfeiffer AF** 2001 Loss of the antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease. *Diabetes* 50:2641-2645
118. **Pombo C, Bokser L, Casabiell X, Zugaza J, Capeans M, Salorio M, Casanueva FF** 1996 Partial characterization of a putative new growth factor present in pathological human vitreous. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234:155-163
119. **McConville MJ, Menon AK** 2000 Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids (review). *Mol Membr Biol* 17:1-16
120. **Zhu K, Baudhuin LM, Hong G, Williams FS, Cristina KL, Kabarowski JH, Witte ON, Xu Y** 2001 Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4. *J Biol Chem* 276:41325-41335
121. **Stewart RJ, Boggs JM** 1993 A carbohydrate-carbohydrate interaction between galactosylceramide-containing liposomes and cerebroside sulfate-containing liposomes: dependence on the glycolipid ceramide composition. *Biochemistry* 32:10666-10674
122. **Hakomori S, Handa K, Iwabuchi K, Yamamura S, Prinetti A** 1998 New insights in glycosphingolipid function: "glycosignaling domain," a cell surface assembly of glycosphingolipids with signal transducer molecules, involved in cell adhesion coupled with signaling. *Glycobiology* 8:xi-xix
123. **Iwabuchi K, Yamamura S, Prinetti A, Handa K, Hakomori S** 1998 GM3-enriched microdomain involved in cell adhesion and signal transduction through carbohydrate-carbohydrate interaction in mouse melanoma B16 cells. *J Biol Chem* 273:9130-9138

124. **Kojima N, Hakomori S** 1991 Synergistic effect of two cell recognition systems: glycosphingolipid-glycosphingolipid interaction and integrin receptor interaction with pericellular matrix protein. *Glycobiology* 1:623-630
125. **Kojima N, Hakomori S** 1991 Cell adhesion, spreading, and motility of GM3-expressing cells based on glycolipid-glycolipid interaction. *J Biol Chem* 266:17552-17558
126. **Wang Xq, Sun P, Paller AS** 2003 Ganglioside GM3 inhibits matrix metalloproteinase-9 activation and disrupts its association with integrin. *J Biol Chem* 278:25591-25599
127. **Rosner H** 2003 Developmental expression and possible roles of gangliosides in brain. *Prog Mol Subcell Biol* 32:49-73
128. **Schengrund CL, Mummert CM** 1998 Exogenous gangliosides. How do they cross the blood-brain barrier and how do they inhibit cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 845:278-284
129. **Kohla G, Stockfleth E, Schauer R** 2002 Gangliosides with O-acetylated sialic acids in tumors of neuroectodermal origin. *Neurochem Res* 27:583-592
130. **Mendez-Otero R, Santiago MF** 2003 Functional role of a specific ganglioside in neuronal migration and neurite outgrowth. *Braz J Med Biol Res* 36:1003-1013
131. **Kolter T, Doering T, Wilkening G, Werth N, Sandhoff K** 1999 Recent advances in the biochemistry of glycosphingolipid metabolism. *Biochem Soc Trans* 27:409-415
132. **Nagai Y** 1995 Functional roles of gangliosides in bio-signaling. *Behav Brain Res* 66:99-104
133. **Hakomori S** 1990 Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem* 265:18713-18716
134. **Tsuji S, Kojima N, Hitoshi S** 1996 New evidence for the occurrence of a glycolipid-mediated signal transduction system. *J Lipid Mediat Cell Signal* 14:289-294
135. **Kreutter D, Kim JY, Goldenring JR, Rasmussen H, Ukomadu C, DeLorenzo RJ, Yu RK** 1987 Regulation of protein kinase C activity by gangliosides. *J Biol Chem* 262:1633-1637
136. **Seishima M, Takagi H, Okano Y, Mori S, Nozawa Y** 1993 Ganglioside-induced terminal differentiation of human keratinocytes: early biochemical events in signal transduction. *Arch Dermatol Res* 285:397-401
137. **Yatomi Y, Igarashi Y, Hakomori S** 1996 Effects of exogenous gangliosides on intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and functional responses in human platelets. *Glycobiology* 6:347-353
138. **Ledeen RW, Wu G** 2002 Ganglioside function in calcium homeostasis and signaling. *Neurochem Res* 27:637-647
139. **Vasylevskaya VV, Bochkov VN, Prokazova NV, Tkachuk VA** 1992 Characteristics and regulation of ganglioside-induced elevation of free cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> in human blood platelets. *Biochim Biophys Acta* 1127:221-225
140. **Slomiany BL, Liu J, Fekete Z, Yao P, Slomiany A** 1992 Modulation of dihydropyridine-sensitive gastric mucosal calcium channels by GM1-ganglioside. *Int J Biochem* 24:1289-1294

141. **Isasi SC, Bianco ID, Fidelio GD** 1995 Gangliosides raise the intracellular Ca<sup>2+</sup> level in different cell types. *Life Sci* 57:449-456
142. **Cavallini L, Venerando R, Miotto G, Alexandre A** 1999 Ganglioside GM1 protection from apoptosis of rat heart fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 370:156-162
143. **Kristal BS, Brown AM** 1999 Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 274:23169-23175
144. **Malisan F, Testi R** 2002 GD3 ganglioside and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585:179-187
145. **Ariga T, Jarvis WD, Yu RK** 1998 Role of sphingolipid-mediated cell death in neurodegenerative diseases. *J Lipid Res* 39:1-16
146. **Song W.X., Vacca M.F., Welti R., Rintoul D.A.** 2004 Effects of ganglioside GM3 and De-N-acetyl GM3 on epidermal growth factor receptor kinase activity and cell growth. *J Biol Chem* 266:10174-10181
147. **Alves F, Borchers U, Keim H, Fortte R, Olschimke J, Vogel WF, Halfter H, Tietze LF** 2002 Inhibition of EGF-mediated receptor activity and cell proliferation by HK1-ceramide, a stable analog of the ganglioside GM3-lactone. *Glycobiology* 12:517-522
148. **Sachinidis A, Kraus R, Seul C, Meyer zu Brickwedde MK, Schulte K, Ko Y, Hoppe J, Vetter H** 1996 Gangliosides GM1, GM2 and GM3 inhibit the platelet-derived growth factor-induced signalling transduction pathway in vascular smooth muscle cells by different mechanisms. *Eur J Cell Biol* 71:79-88
149. **Guan Z, Stokes BT, Van Brocklyn J, Yates AJ** 1992 Gangliosides inhibit platelet-derived growth-factor-stimulated increases in intracellular calcium in Swiss 3T3 cells. *Biochim Biophys Acta* 1136:315-318
150. **Yates AJ, VanBrocklyn J, Saqr HE, Guan Z, Stokes BT, O'Dorisio MS** 1993 Mechanisms through which gangliosides inhibit PDGF-stimulated mitogenesis in intact Swiss 3T3 cells: receptor tyrosine phosphorylation, intracellular calcium, and receptor binding. *Exp Cell Res* 204:38-45
151. **Oblinger JL, Boardman CL, Yates AJ, Burry RW** 2003 Domain-dependent modulation of PDGFRbeta by ganglioside GM1. *J Mol Neurosci* 20:103-114
152. **Meuillet E, Cremel G, Dreyfus H, Hicks D** 1996 Differential modulation of basic fibroblast and epidermal growth factor receptor activation by ganglioside GM3 in cultured retinal Muller glia. *Glia* 17:206-216
153. **Meuillet E, Cremel G, Hicks D, Dreyfus H** 1996 Ganglioside effects on basic fibroblast and epidermal growth factor receptors in retinal glial cells. *J Lipid Mediat Cell Signal* 14:277-288
154. **Miljan EA, Bremer EG** 2002 Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci STKE* 160:RE15
155. **Bremer EG, Schlessinger J, Hakomori S** 1986 Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 261:2434-2440
156. **Spiegel S, Fishman PH** 1987 Gangliosides as bimodal regulators of cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:141-145

157. **Spiegel S, Panagiotopoulos C** 1988 Mitogenesis of 3T3 fibroblasts induced by endogenous ganglioside is not mediated by cAMP, protein kinase C, or phosphoinositides turnover. *Exp Cell Res* 177:414-427
158. **Rampersaud AA, Oblinger JL, Ponnappan RK, Burry RW, Yates AJ** 1999 Gangliosides and growth factor receptor regulation. *Biochem Soc Trans* 27:415-422
159. **Katoh-Semba R, Facci L, Skaper SD, Varon S** 1986 Gangliosides stimulate astroglial cell proliferation in the absence of serum. *J Cell Physiol* 126:147-153
160. **Kim S, Lakhani V, Costa DJ, Sharara AI, Fitz JG, Huang LW, Peters KG, Kindman LA** 1995 Sphingolipid-gated Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores of endothelial cells is mediated by a novel Ca(2+)-permeable channel. *J Biol Chem* 270:5266-5269
161. **Mogami H, Lloyd MC, Gallacher DV** 1997 Phospholipase C inhibitor, U73122, releases intracellular Ca<sup>2+</sup>, potentiates Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-mediated Ca<sup>2+</sup> release and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem J* 324 ( Pt 2):645-651
162. **Freeman EJ, Chisolm GM, Tallant EA** 1995 Role of calcium and protein kinase C in the activation of phospholipase D by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys* 319:84-92
163. **English D** 1996 Phosphatidic acid: a lipid messenger involved in intracellular and extracellular signalling. *Cell Signal* 8:341-347
164. **Billah MM, Anthes JC** 1990 The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem J* 269:281-291
165. **Exton JH** 1997 New developments in phospholipase D. *J Biol Chem* 272:15579-15582
166. **Martinson EA, Trilivas I, Brown JH** 1990 Rapid protein kinase C-dependent activation of phospholipase D leads to delayed 1,2-diglyceride accumulation. *J Biol Chem* 265:22282-22287
167. **Nishizuka Y** 1988 The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334:661-665
168. **Liaw YS, Yang PC, Yu CJ, Kuo SH, Luh KT, Lin YJ, Wu ML** 1998 PKC activation is required by EGF-stimulated Na(+)-H<sup>+</sup> exchanger in human pleural mesothelial cells. *Am J Physiol* 274:L665-L672
169. **Kanaya N, Murray PA, Damron DS** 2001 Propofol increases myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity and intracellular pH via activation of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in rat ventricular myocytes. *Anesthesiology* 94:1096-1104
170. **Haylett DG, Jenkinson DH** 1990 Calcium-activated potassium channels. In: In: *Niegel SC e (ed). England: Ellis Horwood Limited.:70-86*
171. **Castle NA, Haylett DG, Jenkinson DH** 1989 Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci* 12:59-65
172. **Bruzzo R, White TW, Paul DL** 1996 Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 238:1-27
173. **Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC** 2003 Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 83:1359-1400

174. **Sherman A, Rinzel J** 1991 Model for synchronization of pancreatic beta-cells by gap junction coupling. *Biophys J* 59:547-559
175. **Sherman A, Rinzel J, Keizer J** 1988 Emergence of organized bursting in clusters of pancreatic beta-cells by channel sharing. *Biophys J* 54:411-425
176. **Yan RT, Wang SZ** 2000 Differential induction of gene expression by basic fibroblast growth factor and neuroD in cultured retinal pigment epithelial cells. *Vis Neurosci* 17:157-164
177. **Meitinger D, Hunt DM, Shih DT, Fox JC, Hunt RC** 2001 Vitreous-induced modulation of integrins in retinal pigment epithelial cells: effects of fibroblast growth factor-2. *Exp Eye Res* 73:681-692
178. **Sakuragi M, Tomita H, Abe T, Tamai M** 2001 Changes of phagocytic capacity in basic fibroblast growth factor-transfected iris pigment epithelial cells in rats. *Curr Eye Res* 23:185-191
179. **Hecquet C, Lefevre G, Valtink M, Engelmann K, Mascarelli F** 2002 Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelial cells: ERK and RPE cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3091-3098
180. **Kim SY, Mocanu C, Mcleod DS, Bhutto IA, Merges C, Eid M, Tong P, Luty GA** 2003 Expression of pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in sickle cell retina and choroid. *Exp Eye Res* 77:433-445
181. **Schlingemann RO, van Hinsbergh VW** 1997 Role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in eye disease. *Br J Ophthalmol* 81:501-512
182. **Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, Yeo KT** 1994 Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118:445-450
183. **Aiello LP, Wong JS** 2000 Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Kidney Int Suppl* 77:S113-S119
184. **Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, .** 1994 Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331:1480-1487
185. **Spraul CW, Kaven C, Amann J, Lang GK, Lang GE** 2000 Effect of insulin-like growth factors 1 and 2, and glucose on the migration and proliferation of bovine retinal pigment epithelial cells in vitro. *Ophthalmic Res* 32:244-248
186. **Yanagihara N, Miura Y, Moriwaki M, Shiraki K, Imamura H, Kaida M, Miki T** 2001 Hepatocyte growth factor promotes epithelial morphogenesis and occludin linkage to the cytoskeleton in cultured retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239:619-627
187. **Jin M, Chen Y, He S, Ryan SJ, Hinton DR** 2004 Hepatocyte growth factor and its role in the pathogenesis of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:323-329
188. **Liou GI, Matragoon S, Samuel S, Behzadian MA, Tsai NT, Gu X, Roon P, Hunt DM, Hunt RC, Caldwell RB, Marcus DM** 2002 MAP kinase and beta-catenin signaling in HGF induced RPE migration. *Mol Vis* 8:483-493

189. **Jin M, He S, Worpel V, Ryan SJ, Hinton DR** 2000 Promotion of adhesion and migration of RPE cells to provisional extracellular matrices by TNF-alpha. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:4324-4332
190. **Hinton DR, He S, Jin ML, Barron E, Ryan SJ** 2002 Novel growth factors involved in the pathogenesis of proliferative vitreoretinopathy. *Eye* 16:422-428
191. **Lee SC, Kim SH, Koh HJ, Kwon OW** 2001 TGF-betas synthesized by RPE cells have autocrine activity on mesenchymal transformation and cell proliferation. *Yonsei Med J* 42:271-277
192. **Priglinger SG, Alge CS, Neubauer AS, Kristin N, Hirneiss C, Eibl K, Kampik A, Welge-Lussen U** 2004 TGF-beta2-induced cell surface tissue transglutaminase increases adhesion and migration of RPE cells on fibronectin through the gelatin-binding domain. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:955-963
193. **Folkman J, Shing Y** 1992 Angiogenesis. *J Biol Chem* 267:10931-10934
194. **Khan ZA, Chakrabarti S** 2003 Growth factors in proliferative diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 4:287-301
195. **Davis MI, Wilson SH, Grant MB** 2001 The therapeutic problem of proliferative diabetic retinopathy: targeting somatostatin receptors. *Horm Metab Res* 33:295-299
196. **Elfervig LS, Elfervig JL** 2001 Proliferative diabetic retinopathy. *Insight* 26:88-91
197. **Danis RP, Ciulla TA, Criswell M, Pratt L** 2001 Anti-angiogenic therapy of proliferative diabetic retinopathy. *Expert Opin Pharmacother* 2:395-407
198. **Kirchhof B, Sorgente N** 1989 Pathogenesis of Proliferative Vitreoretinopathy. In: Straub W (ed). *Proliferative Vitreoretinopathy*.:1-53