

03068

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ANÁLISIS IN-VIVO DE LA PARTICIPACIÓN DE
PROLACTINAS EN EL PROCESO ANGIOGENICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A

ZULMA JANETH DUENAS GOMEZ

Asesora: Dra. CARMEN CLAPP

Campus UNAM-Juriquilla

1997

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra.
Carmen Clapp Jiménez, en el Centro de Neurobiología de la UNAM.*

*Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca
otorgada por el Gobierno de México, a través de la Secretaría de
Relaciones Exteriores.*

*El jurado calificador quedó integrado por las siguientes
personas:*

Dra. María Magdalena Giordano N.

Dra. Carmen Clapp

Dr. Gabriel Gutiérrez

Dra. Carmen Aceves

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

*Dedicada a toda mi familia,
especialmente a mis Padres.
mi Princesita y a la memoria
de mi tía.*

Indudablemente, al escribir mi tesis tuve dos momentos muy difíciles, el primero cuando tuve que comenzar a escribirla y el segundo, justo ahora, que debo escribir los agradecimientos, pues son tantas personas a las que de una u otra forma debo agradecer su contribución, apoyo y dedicación, que sería casi como escribir otra tesis.

Ante todo, quiero resaltar el apoyo no solo económico sino emocional que desde siempre me han ofrecido mis Padres y mis hermanos, ellos indiscutiblemente han sido piedra angular en cada una de las pequeñas metas que me he propuesto, pero sobre todo, por el optimismo con el supieron mantener la unidad familiar a pesar del tiempo, la distancia y las dificultades.

A la Dra. Carmen Clapp, mi mamá académica, a quien admiro y respeto profundamente, no solo por el apoyo que me ha ofrecido, sino por su esmerada entrega y dedicación a su profesión como Investigador y a su pequeño hogar: Gonzálo, Daniela y Lucía, a quienes también agradezco haberme permitido compartir tantos momentos relajantes y por ende, agradables.

A mis amigos, especialmente a Sarita, y a mis maestros, porque pese a la distancia, siguen siendo mis amigos y continúan enseñándome cosas.

A mi "naaa madrina": Luz Torner, quien desde el momento que llegué a este laboratorio, además de dedicar gran parte de su tiempo a enseñarme el 80% de las técnicas que hoy conozco y aplico, me brindó todo su apoyo y comprensión.

A mis amigos y compañeros de este y otros laboratorios: Citlali, Francisco y su familia, Salvador, Yazmín, , Gabriel, Alejandra ?, Jorge, Pavel, Gino, Emilio, Marco, Marrica, Hilda, Daniel, Antonio, y a todos los que en este momento se me escapan de la mente y a quienes seguramente después voy recordar.

A Gloria Hoyos y a Carlos, porque fueron mi primera familia en este país, y me brindaron todo su apoyo y comprensión, especialmente durante mi primer año de estancia.

A Anita, por ser una verdadera amiga, incondicional y sincera, y con quien por el solo hecho de ser extranjera como yo, compartimos cosas que con los

demás no podíamos compartir. Gracias a ti, a tu familia, a Mauricio y un gran amigo: Stephan..

Al Dr. Rafael Romero Piñeros, por apoyarme desde que me conoció, facilitar mi viaje a este país, y no olvidarse de mi.

A Fabio Mayorga, porque gracias a él, conocí este lugar.

A la Fundación Universitaria de Boyacá, por el apoyo económico que me brindó durante mi primer año de estancia en este país, y por darme la oportunidad de regresar a formar parte de su gran familia Universitaria.

A los Drs. Fernando Barrios y Gabriel Gutiérrez, por facilitarme el trabajo con el procesamiento de las imágenes.

A todo mi comité evaluador, especialmente a la Dra. Carmen Aceves y al Dr. Mauricio Díaz M..

A México, a su gente, a la UNAM, por haberme dado la oportunidad de disfrutar cada momento de mi estancia.

A mis amigos Colombianos en México, porque compartimos pedacitos de nuestra Patria, cada vez que nos reunimos.

En fin, a TODOS...los presentes, los ausentes, los locos y los soñadores.....

ANÁLISIS IN VIVO DE LA PARTICIPACION DE PROLACTINAS EN EL PROCESO ANGIOGÉNICO

INTRODUCCION

- 1. Antecedentes generales.***
 - a) Angiogénesis.***
 - b) Regulación de la angiogénesis.***
- 2. Antecedentes inmediatos***
 - a) Prolactinas: nuevos factores reguladores de la angiogénesis.***
 - b) Prolactina 16K.***
 - c) Presencia endógena de prolactinas con efectos sobre la angiogénesis.***
 - d) Regulación autócrina de la angiogénesis por PRLs .***

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

HIPOTESIS

OBJETIVOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

- 1. Materiales***
 - a) Animales.***
 - b) bFGF.***
 - c) Anticuerpos.***
 - d) Prolactinas.***
- 2. Metodos***
 - a) Obtención de PRL 16K de rata.***
 - b) Obtención y purificación de anticuerpos.***

- c) *Bioensayo de angiogénesis.*
- d) *Procesamiento de córneas.*
- e) *Análisis y fotografía.*

RESULTADOS

1. *Bioensayo de la córnea de la rata.*
2. *Caracterización de anticuerpos.*
3. *Efecto de anticuerpos sobre la neovascularización de la córnea de la rata.*

DISCUSION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION

1. Antecedentes generales

1.1. Angiogénesis

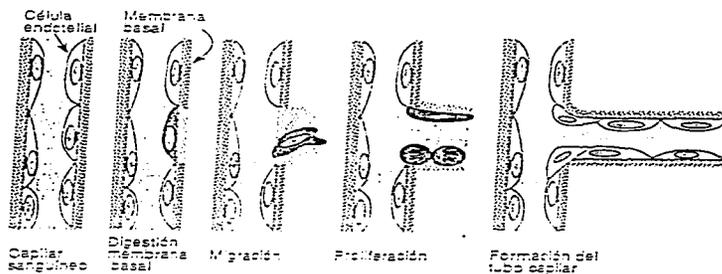
El endotelio está formado por una monocapa de células que limitan la luz de los vasos sanguíneos. El proceso durante el cual suceden los eventos de formación de una nueva red vascular a partir de las células endoteliales pre-existentes, se denomina **ANGIOGENESIS O NEOVASCULARIZACION** (1-5). Este proceso es esencial durante las etapas embrionaria y fetal para el crecimiento y diferenciación de los tejidos. En el adulto la angiogénesis se circunscribe a procesos dentro del ciclo reproductivo femenino y a la reparación y cicatrización de tejidos. Por otra parte, la angiogénesis es determinante de ciertas patologías como son: la retinopatía diabética, la gingivitis, la psoriasis, el escleroma, la artritis reumatoide y las neoplasias, enfermedades que se caracterizan por la hiperproliferación anormal de vasos sanguíneos (1-7).

La formación de capilares es inducida por una gran variedad de agentes reguladores que actúan en una serie ordenada de eventos. En el proceso angiogénico se han diferenciado cuatro fases secuenciales:

- 1- la degradación de la membrana basal que recubre al capilar. Esta ocurre por acción de enzimas proteolíticas secretadas por las células endoteliales, células tumorales, por macrófagos, etc.,
- 2- la proliferación de las células endoteliales.

- 3- la migración y asociación del endotelio en estructuras tubulares; y
 4- la diferenciación final del endotelio capilar mediante la producción de una nueva membrana basal (5-16) Fig. 1.

Etapas de la angiogénesis



b) Regulación de la angiogénesis

En la regulación de la angiogénesis participan diversos tipos celulares que generalmente están presentes en la vecindad del capilar. Células tales como macrófagos, fibroblastos y en su caso particular las células tumorales son capaces de modular el proceso de angiogénesis a través de mecanismos parácrinos que involucran la acción de factores capaces de afectar la función del endotelio. Por otra parte, las mismas células endoteliales son capaces de producir y secretar factores que regulan su función de forma autócrina (6-15,22). Aunque la regulación de la angiogénesis es fundamentalmente local, el proceso angiogénico puede a su vez involucrar a las hormonas. En la circulación se encuentran varias hormonas y péptidos con efectos regulatorios sobre la angiogénesis.

aunque su acción hormonal sobre el control de dicho proceso está poco dilucidado (17-20).

La mayor parte de los agentes con efectos sobre la angiogénesis pertenecen a la familia de los factores de crecimiento y tienen la capacidad de modular en forma directa, pero también indirecta, la función del endotelio (1-5,22-24). Dentro de la regulación indirecta, se incluyen aquellos factores con efectos quimiotácticos y mitogénicos sobre las células que regulan parácrinamente la angiogénesis. Por ejemplo, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) sólo es angiogénico *in vivo* a través de promover la quimiotáxis de macrófagos hacia la nueva estructura capilar, y estimular el que estas células inmunes secreten factores angiogénicos.(21-32)

Existe una gran variedad de polipéptidos angiogénicos y antiangiogénicos directos. Dentro de los principales factores angiogénicos se incluyen el factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que actúan directamente sobre el endotelio estimulando las diversas fases de la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*. Otros factores angiogénicos incluyen al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), al factor de crecimiento epidermal (EGF), a la angiogenina, al factor de crecimiento transformante α (TGF α), etc., todos ellos potentes mitógenos directos del endotelio (7, 25-35).

La regulación negativa del fenómeno angiogénico también está ampliamente representada. Entre los péptidos antiangiogénicos más

importantes se encuentra la trombospondina (TSP), el factor antiangiogénico derivado del cartilago, el factor natriurético atrial (ANF), y la protamina. Estos péptidos son capaces de inhibir directamente la proliferación y migración del endotelio, así como el proceso angiogénico integral observado *in vivo* (28-40).

Recientemente ha sido descrito un nuevo grupo de factores pertenecientes a la familia de las prolactinas con efectos sobre la angiogénesis (41-49). Las prolactinas son péptidos derivados de un único gen con efectos locales y sistémicos muy diversos que incluyen la regulación de funciones inmunológicas, reproductivas, la osmorregulación, el crecimiento y la diferenciación celular. Por otra parte, los miembros de esta familia presentan diferencias estructurales en su mayor parte consecuencia de modificaciones postraduccionales tales como fosforilación, glicosilación, desamidación, agregación y proteólisis (50-55). Fig. 2

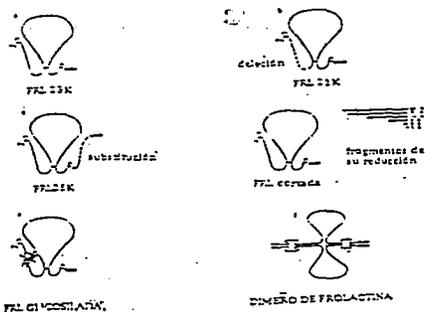


Fig. 2. Variaciones moleculares de prolactina. Diagrama esquemático mostrando algunas de las modificaciones estructurales observadas o propuestas en la molécula de la prolactina.

Trabajos realizados en el laboratorio han demostrado la existencia de fragmentos de prolactina con masas moleculares de 14 y 16 kDa capaces de inhibir la angiogénesis, a través de acciones directas sobre la proliferación y adhesión endotelial (41-49). Por otra parte, dos proteínas la proliferina y la proteína relacionada con proliferina, consideradas como miembros de la familia de las prolactinas por compartir una alta homología en sus secuencias primarias, afectan la angiogénesis. La proliferina (PL) estimula, mientras que la proteína relacionada (PRPL) inhibe la migración de las células endoteliales y la neovascularización in vivo. Ambas proteínas son producidas y secretadas a la circulación por la placenta en diferentes etapas de la gestación, y se ha correlacionado esta diferente secreción con la estimulación inicial, y la posterior restricción, de la angiogénesis que ocurre normalmente en la placenta (29,40,50).

2. Antecedentes inmediatos

a) **Prolactinas: nuevos factores reguladores de la angiogénesis**

El descubrimiento de la angiogénesis como un nuevo campo de acción para las prolactinas tuvo lugar recientemente y se derivó de estudios encaminados a analizar el mecanismo de acción de los estrógenos para inducir tumores adenohipofisarios secretores de prolactina o prolactinomas (51-59). Se observó que estos tumores recibían irrigación de una arteria que provenía directamente de la carótida interna y no exclusivamente del sistema portal hipotálamo-hipofisario, como ocurre en el tejido normal (60,61). Esto implicaba que dichos tumores podrían escapar del control inhibitorio que el hipotálamo ejerce sobre el número y

secreción de las células hipofisarias que producen prolactina conocidos como lactotropos. En vista de esto, se propuso que la irrigación sanguínea directa a la hipófisis podría contribuir al mecanismo mediante el cual la administración de estrógenos induce la formación de prolactinomas (58-64). Con el objeto de identificar a los posibles agentes involucrados en la formación de los nuevos vasos sanguíneos a consecuencia del tratamiento con estrógenos, se exploraron como candidatos a las PRLs y con tal propósito, se realizaron ensayos de proliferación con células endoteliales derivadas de capilares de cerebro bovino utilizando a la PRL completa y al fragmento amino terminal de 16 kDa de prolactina, también denominado como PRL 16K. (47-50,52).

En estos ensayos se observó, sorpresivamente, que la proliferación celular se inhibía cuando se utilizaba el fragmento 16K y no se modificaba bajo el tratamiento con la PRL completa (45-50). Este representaba un nuevo efecto, dentro de los descritos para las prolactinas.

b) Prolactina 16K

La PRL 16K resulta de la modificación proteolítica de la forma molecular predominante de prolactina. La prolactina predominante posee 23 kDa de masa molecular y tres puentes disulfuro que forman dos asas laterales y una asa intermedia de mayor tamaño.

La PRL 16K ha sido generada por digestión proteolítica de una preparación pura de PRL 23K obtenida de la hipófisis de la rata, con extractos enzimáticos obtenidos de los tejidos blanco de esta hormona

(41-46). Dicho procesamiento proteolítico se inicia con el corte de la PRL de 23 kDa (PRL 23K) entre los aminoácidos tirosina 145 y leucina 146 (43-47). La reducción posterior de los puentes disulfuro de la PRL cortada genera dos fragmentos: uno amino-terminal de 16 kDa que corresponde a la PRL 16K, y otro carboxilo-terminal de 7 kDa (40-47). Fig.3. La PRL 16K también ha sido generada mediante la mutagénesis dirigida del ADN complementario que codifica para la PRL humana. Mediante manipulación génica se introdujo en este ADN complementario, un codón de terminación entre los aminoácidos Serina y Lisina¹²⁴. Además fue intercambiada la Cisteína⁵⁸ por Serina para prevenir la formación incorrecta de puentes disulfuro (58). El fragmento 16K, ha sido ampliamente estudiado y se ha observado que ejerce, aunque con menor potencia, muchos de los efectos biológicos de la PRL 23K. (43-55). Sin embargo, como antes se mencionó, el principal interés sobre la PRL 16K se deriva de su efecto antiangiogénico recientemente descrito.

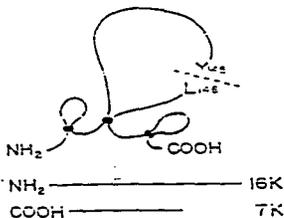


Fig. . Prolactina cortada. Esquema mostrando la estructura de la prolactina cortada. El sitio de corte se representa con una línea punteada y ocurre entre la tirosina (Y) 145 y la leucina (L) 146 presentes en el asa mayor. En la porción inferior de la figura se esquematizan los fragmentos de 16 y 7 kDa de peso molecular (16K y 7K) que resultan de la reducción de la PRL cortada.

En ensayos realizados *in vitro* e *in vivo*, la PRL 16K inhibe la angiogénesis (43-52). La prolactina 16K es capaz tanto de inhibir la proliferación basal, como de abatir la proliferación estimulada por bFGF de células endoteliales en cultivo. Este efecto inhibitorio se observó incluso después de la administración del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual es un potente estimulante de la proliferación celular. En ambos casos la inhibición de la proliferación fue dependiente de la dosis de PRL 16K administrada (49). Además, en cultivos de células endoteliales bovinas en matrices de colágeno, la PRL 16K inhibió la adhesión celular impidiendo la formación de estructuras tubulares semejantes a capilares (44-46). Estas acciones directas de la PRL 16K sobre el endotelio parecen traducirse en una inhibición del proceso integral de la angiogénesis observado *in vivo* (44-46). Este efecto se demostró mediante el modelo de angiogénesis de la membrana corialantoidea del embrión del pollo (CAM). Embriones de pollo fueron incubados y las CAMs tratadas por 48 horas con implantes conteniendo a la PRL16K. La red capilar que rodeaba los implantes disminuyó considerablemente. En contraste con la PRL 16K, la PRL 23K no tuvo efecto sobre la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* (43-46, 49).

En franco apoyo a los efectos de la PRL 16K sobre la función endotelial se han identificado sitios de unión específicos para este fragmento hormonal saturables y de alta afinidad en membranas aisladas de células endoteliales derivadas de capilares de cerebro bovino (49). Estos sitios de unión difieren funcionalmente de los receptores descritos para la PRL 23K. Estos últimos comprenden tres tipos a saber, corto mediano y largo, definidos por el tamaño de su dominio intracitoplásmico

fig.4. Los 3 receptores descritos para PRL pertenecen genéricamente a la familia de receptores para citocinas, dentro de los cuales se incluyen a la hormona de crecimiento y a las interleucinas (50-69).

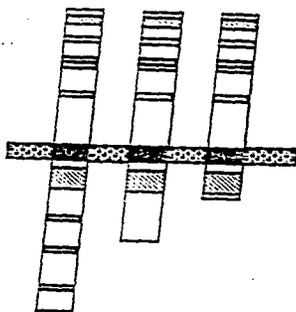


Fig. 4. Representación esquemática de la estructura de los receptores de PRL. Se comparan los diferentes dominios que componen cada una de las isoformas: largo, corto y mediano. Los dominios transmembranarales se muestran en oscuro. Las regiones rayadas corresponden a los sitios de identidad mayor al 68%. Las secciones sombreadas corresponden a sitios con identidad moderada.

El hecho de que efectos selectivos de la PRL 16K sean mediados por receptores específicos, sugiere el que este fragmento de prolactina pudiese representar un nuevo factor de regulación del proceso angiogénico. La posible participación fisiológica de PRLs en la regulación de la angiogénesis, se apoya en la detección de prolactinas endógenas capaces de afectar la angiogénesis (67-73).

c) Presencia endógena de prolactinas con efectos sobre la angiogénesis

El sitio más conocido de producción y secreción de hormonas de la familia de las prolactinas es la hipófisis anterior (70-75). Sin embargo, se

sar que el gen de la prolactina se expresa en diversos tejidos extrahipofisarios a saber la glándula mamaria, el sistema inmune, el cerebro, el útero etc. (72-80).

La presencia de formas proteolíticamente modificadas de PRL, y en particular de la PRL 16K se han documentado en la hipófisis, el cerebro y la circulación (74-86). Asimismo, las enzimas capaces de cortar a la PRL y generar a la PRL 16K se encuentran en varios de sus órganos blanco, por ejemplo en la glándula mamaria, en la próstata y en el riñón (55,67,81).

Recientemente se determinó en el Sistema Nervioso Central una nueva región productora de fragmentos de prolactina con efectos angiogénicos: el Sistema Hipotálamo-Neurohipofisario (74,80-82). Este sistema está constituido por neuronas localizadas en los núcleos del hipotálamo anterior: el supraóptico y el paraventricular y sus proyecciones neurohipofisarias fig. 5.

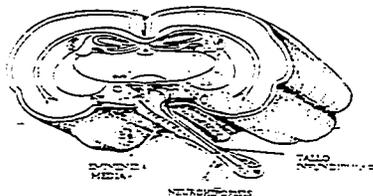


Fig.5. Esquema del Sistema Hipotálamo Neurohipofisario. Se muestra el corte coronal a nivel de los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON), y se muestran las proyecciones principales de las neuronas magnocelulares hacia la neurohipófisis

Este es un sistema neuroendócrino secretor de las hormonas vasopresina y oxitocina, aunque también se ha demostrado en él la expresión y secreción de un amplio número de péptidos con acciones regulatorias (77, 80-82). En apoyo a la producción local de PRLs por este sistema se observó que los núcleos paraventricular y supraóptico aislados y que extractos neurohipofisarios contienen PRLs de 23 y 14 kDa. Estas PRLs fueron identificadas en base a sus determinantes antigénicos y a su actividad biológica en bioensayos específicos (48-50, 76). Más aún, y a diferencia de lo que se observa en la hipófisis anterior, en la neurohipófisis la PRL de 14 kDa es la forma molecular predominante (49, 73).

La PRL 14K, parece compartir epítopes con la PRL 16K y además posee efectos antiangiogénicos similares. Medios condicionados con neurohipófisis en cultivo, enriquecidos con la prolactina 14K, inhiben la proliferación de las células endoteliales en cultivo y ese efecto se neutraliza con anticuerpos anti prolactina 16K. (48-50, 52). También se observó que las prolactinas neurohipofisarias provenientes de los núcleos paraventricular y supraóptico son secretadas al medio de cultivo de explantes neurohipofisarios mediante un mecanismo calcio dependiente (Ca^{+2}) y que dichas PRLs se pueden localizar en vesículas de secreción en las terminales neuronales (48). Estos hallazgos han llevado a proponer al sistema hipotálamo neurohipofisario, como una fuente capaz de liberar prolactinas con propiedades antiangiogénicas a la circulación. Dadas las características neuroendócrinas de este sistema, esta posibilidad podría ser real. En franca concordancia con esta conclusión, se encontró

que una proteína de 14 kDa con inmunoreactividad de prolactina esta presente en la circulación de la rata (47-52).

d) Regulación autócrina de la angiogénesis por PRLs

Si bien es posible que PRLs regulen hormonalmente la angiogénesis, como se mencionó anteriormente la regulación de este proceso es predominantemente local (74-83). Se sabe que dentro de esta regulación local, las células endoteliales producen y secretan muchos de los factores que regulan su función, a saber el bFGF, el VEGF y la trombospondina (74-79). En este sentido, resultados obtenidos recientemente, permiten proponer el que PRLs podrían regular autócrinamente la angiogénesis. Se ha observado que el gen de la prolactina se expresa en células endoteliales (52). Más aún, las células endoteliales durante su fase proliferativa secretan al medio de cultivo proteínas con inmunoreactividad y bioactividad de PRL (52.). Finalmente, diversos anticuerpos policlonales y monoclonales anti-prolactina inhiben la proliferación basal y estimulada por el bFGF de las células endoteliales en cultivo (43-50). Estos hallazgos permitieron proponer que las células endoteliales producen y secretan prolactinas capaces de estimular la proliferación celular.

Teniendo en cuenta que PRLs ejercen acciones sobre la angiogénesis y que dichas PRLs están presentes en la circulación y que además son secretadas por las células endoteliales, se puede concebir la hipótesis de que las PRLs endógenas pudiesen participar en la regulación fisiológica de la angiogénesis.

FALTA PAGINA

No. 15

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En este proyecto nos propusimos analizar la posible participación de las PRLs en la regulación fisiológica de la angiogénesis. Específicamente determinamos si PRLs con efectos antiangiogénicos podrían contribuir a la inhibición de la angiogénesis que ocurre en forma natural en ciertos tejidos.

Una de las estrategias para explorar esta posibilidad, fue identificar un modelo experimental de angiogénesis in vivo en el que de forma natural no existiera vascularización, en este sistema intentaríamos inducir angiogénesis mediante la administración de anticuerpos específicos capaces de capturar PRLs con efectos antiangiogénicos. Para que dicho modelo fuera operativo tendríamos que obtener evidencias de que las PRLs son capaces de actuar en él inhibiendo la formación de vasos sanguíneos inducida por agentes angiogénicos. El modelo in vivo de angiogénesis de la córnea de la rata reúne estas características.

De esta manera, en el presente trabajo se analizó la posible participación de PRLs endógenas en la inhibición del proceso angiogénico de la córnea de la rata.

Los modelos más utilizados para el estudio in vivo del proceso angiogénico son el de la membrana corioalantoidea del embrión del pollo, y el de la córnea de la rata (82-97). La membrana corioalantoidea del embrión de pollo presenta limitaciones para la evaluación de la respuesta

angiogénica que se derivan del grado basal de angiogénesis que ocurre normalmente en esta membrana y que refleja la activa neovascularización que ocurre en el período embrionario y fetal (83-89). Al respecto, la córnea de la rata, presenta claras ventajas ya que este tejido, por estar constituido de un estroma completamente avascular, la respuesta angiogénica obtenida es claramente observable (83, 95-101) y depende exclusivamente de su activación a consecuencia del abordaje experimental (82, 85, 89, 102, 105). En este modelo, la inducción de nuevos vasos sanguíneos requiere que el estímulo sea captado por las células endoteliales de la vasculatura de la coroides. Las células endoteliales de los vasos que irrigan este tejido migran dentro del espacio subepitelial entre el epitelio corneal y las células del estroma, formando un número de "brotes" largos todos dirigidos hacia la superficie de estimulación angiogénica (97, 89, 99-107). Más aún, dada la ausencia de angiogénesis en ella, la córnea constituye un buen modelo para estudiar la posible participación de PRLs en la inhibición natural de la angiogénesis que ocurre en el adulto.

Con la idea de estudiar la participación de prolactinas en la inhibición de la angiogénesis que ocurre normalmente en la córnea, determinamos si el bloqueo de dichas PRLs con anticuerpos policlonales y monoclonales específicos induce angiogénesis en este tejido. Por otra parte en este bioensayo determinamos también si la PRL 16K inhibe la angiogénesis inducida por bFGF.

HIPOTESIS

***Prolactinas endógenas inhiben la angiogénesis
en condiciones fisiológicas.***

OBJETIVOS

- 1. Establecer e implementar el modelo de angiogén**
- 2. Analizar en la córnea de la rata:**
 - a) Si la PRL 16K inhibe el efecto estimulador del factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos (bFGF) sobre la formación de vasos sanguíneos.**
 - b) Si la administración de anticuerpos específicos, capaces de neutralizar la acción antiangiogénica de PRLs, induce la neovascularización.**

DISEÑO EXPERIMENTAL

Uno de los modelos in vivo utilizados para identificar procesos angiogénicos, es el de la córnea de la rata. Este modelo se facilita para este tipo de ensayos dado que la córnea es avascular y en respuesta a estímulos angiogénicos en implantes locales se generan vasos sanguíneos que la invaden y son observados fácilmente.

1. Materiales

a) Animales:

Se utilizarán ratas macho Wistar entre 200 - 250 g de peso.

b) bFGF

El bFGF recombinante humano (FIBLAST®-SCIOS) que se utilizó fue donado gentilmente por la Dra. D. Judith A. Abraham.

c) Anticuerpos anti-PRL

c.1) Policlónicos

- Antiseros anti-PRL 23 y 16K de rata fueron generados en conejo y las IgG respectivas aisladas mediante los métodos descritos (Arámburo et. al.).

c.2) Monoclonales

*- Dirigidos contra PRL de rata:
- Anticuerpo monoclonal generado contra la PRL 23K (INN-rPRL-1), donado por el Dr. Peter Berger (Academia de Ciencias, Innsbruck, Austria).*

Dirigidos contra PRL humana:

- Anticuerpo monoclonal (IG-8) dirigido contra la prolactina 16K recombinante, donado por el Dr. Frederick Reinhart (Genzyme Corporation, Boston, Massachusetts, EUA).
- Anticuerpo monoclonal dirigido contra la PRL 23K, (INN-h368), donado por el Dr. Peter Berger.

d) Prolactinas:

d.1) rPRL 23K: estandar biológico donado por los Institutos de Salud de los Estados Unidos (NIH) y utilizada para generar los anticuerpos policlonales específicos y a la PRL 16K de rata.

d.2) rPRL 16K: generada en el laboratorio por proteólisis enzimática.

d.3) hPRL 16K: obtenida por mutagénesis dirigida y donada por el Dr. Martial (Universidad de Lieja, Lieja, Belgica).

2. METODOS

a) Obtención de PRL 16K de rata

La PRL 16K a utilizar como estándar y en la producción de anticuerpos específicos se obtuvo mediante la proteólisis de la PRL de rata (estandar B-6 del NIH) con una fracción lisosomal enriquecida con las enzimas específicas para cortar PRL de acuerdo al método descrito (42-47).

Glándulas mamarias de ratas lactantes fueron extraídas y homogenizadas (politron 10-35 Beckman Instrumentos, Estados Unidos.) en un amortiguador de Tris 0.1 M - sacarosa 0.25 M (pH 7.4). El homogenado se sometió a centrifugaciones sucesivas (600 Xg, 3.300 Xg y 25.000 Xg). Este sedimento precipitado a 25.000 Xg se lavó, resuspendió en un amortiguador de Tris 0.1 M, (pH 7.4) y se almacenó a -70 °C. La concentración de proteína en dicho sedimento se determinó mediante el método de Bradford (43, 48).

La prolactina de rata se incubó con la fracción subcelular de la glándula mamaria (50 µg de PRL/20ug de proteína de la fracción) en un amortiguador de Citrato-fosfatos 0.1 M (pH 3.4), durante 3 horas a 37°C en agitación constante. Bajo estas condiciones toda la PRL 23K es procesada hacia la variante cortada. Dado que las otras proteínas presentes en el extracto están unidas a membranas, éstas se separan de la PRL cortada mediante centrifugación.

La PRL cortada se concentró y se redujo con 2-β-mercaptoetanol 200 mM y posteriormente se neutralizó con Na₂HPO₃. Los fragmentos de 16 y 7 kDa de la prolactina se separaron en una columna de Sephadex G-50-150, empleando como amortiguador-de elución bicarbonato de amonio 0.1 M que contiene 2-mercaptoetanol 200mM pH 7.8. Las fracciones colectadas se analizaron mediante electroforesis y las que contengan el fragmento de 16 K se dializaron a 4°C para remover el mercaptoetanol. Finalmente las fracciones se alicuotearon y conservaron a -70°C. La pureza y concentración de las fracciones de PRL 16K se determinó mediante electroforesis en presencia de SDS y densitometría.

b) Obtención y purificación de anticuerpos

Los anticuerpos fueron generados siguiendo el método reportado (Arámburo et.al). Se preparó una emulsión del inmunógeno mezclando 100 μg de la muestra de PRL con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund (por animal) y se inyectó en el ganglio poplíteo de conejos Nueva Zelanda blancos. Posteriormente se inocularon refuerzos los días 30, 60, y 90 por vía intradérmica (dorso del animal), inyectando 50 μg de la hormona emulsificada con adyuvante incompleto de Freund. Se tomaron muestras de sangre los días 15, 45, 75 y 105. Las respuestas inmunes de los animales se analizaron mediante Radioinmunoanálisis (RIA). Los RIAs fueron establecidos marcando PRL 23K (estándar para yodación, NIH) y PRL 16K con ^{125}I y desplazando estas proteínas unidas a los antisueros respectivos, con concentraciones crecientes de PRL 23K y 16K. Los títulos de los anticuerpos específicos se analizaron en los diferentes sangrados. El último sangrado se obtuvo por punción cardíaca.

Obtenidos los anticuerpos, el aislamiento de las inmunoglobulinas (IgG) se hizo a través de una columna de inmovilización construida con sefarsosa acoplada a proteína A, de acuerdo al método reportado (48). El montaje de la columna se realizó en buffer de fosfatos 0.1 M pH 8. Cada uno de los sueros se dejó incubando en la columna durante 2 horas. Posteriormente se lavó la columna con el mismo buffer y se tomaron lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro, para tenerlas como referencia de la cantidad basal de proteínas. Las IgG se despegaron con amortiguador ácido acético 0.1 M / NaCl 0.15 M. Las fracciones se

colectaron en tubos con amortiguador básico para neutralizar. De acuerdo a las lecturas de absorbancia, se colectaron las fracciones con IgG y se dializaron y concentraron (20-30µg/µl). Posteriormente se valoraron las propiedades de unión al antígeno respectivo y la especificidad de cada grupo de IgG mediante Western blot.

c) Bioensayo de angiogénesis

Se estableció en el laboratorio de acuerdo al método reportado (40). Las sustancias a bioensayar se incluyeron en el polímero 2-poli-hidroxil etilmetacrilato o Hydron (lot. # 90005, Interferon Sciences, Inc., New Brunswick, N.J.). Las muestras se prepararon bajo condiciones estériles disolviendo el polímero en etanol al 95% (12% p/v) a temperatura ambiente. Volúmenes iguales de Hydron y de muestra fueron combinados en superficies estériles y mantenidos a 40°C. Cada implante se cortó en 8 partes de aproximadamente 0.5 mm².

Con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon - 104) y utilizando una aguja hipodérmica con bisel de 27x13 mm se hizo un saco en el estroma de la córnea, sin atravesarla, del tamaño de la punta del bisel, a una distancia aproximada de 1mm del límite entre la esclerótica y la cornea (íimbo) del ojo. Una vez hecho el saco, se colocó 1/8 del implante hasta el fondo del saco con la ayuda de unas pinzas finas, dejando el borde exterior libre para que el saco sellara nuevamente.

d) Procesamiento de córneas

Seis días después de hecho el implante, se sacrificaron las ratas y se procedió a extraer los ojos para fijarlos en paraformaldehído 4%, glutaraldehído 1.5% en PBS 0.1 M, pH 7.2-7.4 durante 1 hora. A continuación se diseccionaron las córneas y se tiñeron en presencia de 0.05% de diaminobencidina y 0.01% de peróxido de hidrógeno en PBS 1M (31), que al reaccionar con la peroxidasa de los eritrocitos da una coloración café donde estos se localizan, permitiendo así, visualizar la red capilar. Posteriormente se realizó la deshidratación del tejido, incubando por dos periodos de 15 minutos cada uno, en alcoholes de diferentes grados de dilución (60%, 70%, 80%, 90% y 100%) y finalmente con xilol. Las córneas se montaron sobre porta-objetos cubiertos con resina (permount) y un cubre-objetos.

e) Análisis y fotografía

Las fotos de las preparaciones se tomaron con un sistema fotográfico acoplado al microscopio estereoscópico (Nikon-Fx-45 WA) bajo ampliaciones 1x y 3x. Se descartaron todas aquellas córneas que al momento de ser analizadas carecían de implantes y aquellas en las que la vascularización abarcaba indiscriminadamente toda la córnea.

Las imágenes de las córneas observadas al estereoscopio fueron adquiridas y digitalizadas en una computadora Macintosh y evaluadas mediante el programa de análisis de imágenes (Image INH). Se estableció un área fija de 2mm² circunscrita a la zona del implante y se realizó la cuantificación de las respuestas determinando la absorbancia del área establecida. Esta incrementó en presencia de vascularización.

Las diferencias encontradas entre los diferentes grupos se evaluaron mediante la aplicación de pruebas estadísticas apropiadas (ANOVA, t-student, X^2), seguidas de comparaciones post-hoc.

Se establecieron como criterios para evaluar las respuestas de angiogénesis positivas:

- 1. que los vasos sanguíneos estuvieran en la zona del implante y en franca predominancia con respecto a los localizados en las zonas de la córnea distantes a dicho implante.*
- 2. que los valores de absorbancia positivos correspondieran cuando menos al doble de los valores obtenidos para los respectivos controles utilizados.*

RESULTADOS

1. Bioensayo en córnea de rata

El bioensayo se validó a través de su capacidad de detectar respuestas angiogénicas cuyo grado fuese en función de la dosis administrada de bFGF. Asimismo se determinó que las respuestas angiogénicas no específicas fueran consistentes en los grupos testigo utilizados. Así la aplicación del implante solo (hydron), permitió descartar la posibilidad de un artefacto a consecuencia del polímero mismo o del procedimiento quirúrgico fig. 6a. En forma similar, la aplicación de implantes conteniendo albúmina de suero bovino (ASB) en concentraciones comparables a las dosis altas de las proteínas problema no aumentó significativamente la incidencia de angiogénesis. En todos los casos la incidencia de angiogénesis no específica osciló entre un 10-15% (fig.6).

En contraposición a los testigo, la administración de diferentes dosis de bFGF indujo neovascularización en el 90% - 100% de los casos a partir de la dosis de 125 ng de FGF (Fig.6). El grado de la respuesta angiogénica medido a través de la absorbancia del área capilar mostró diferencias en función de las distintas concentraciones del bFGF. Las figuras 6a y 6b ilustran diferencias significativas observadas tanto con respecto a los grupos testigo, como entre diferentes dosis utilizadas de bFGF. Los resultados del análisis estadístico se muestran al pie de la figura. Estos resultados validan la capacidad y confiabilidad del ensayo para

determinar y cuantificar efectos angiogénicos. En la figura 7 se ilustran casos representativos de las respuestas obtenidas.

Evaluación del grado de angiogénesis producida por diferentes dosis de bFGF

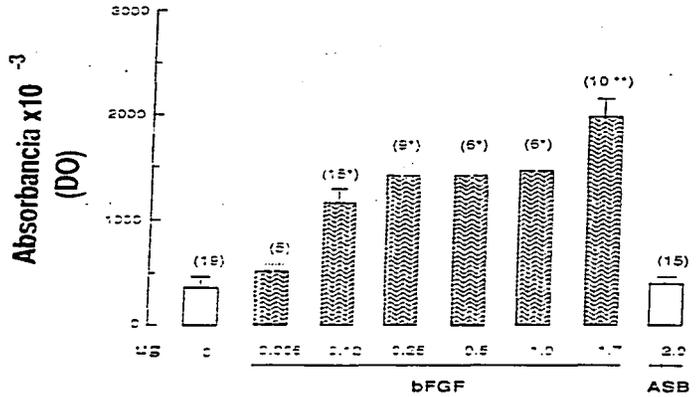


Figura . Análisis densitométrico de la respuesta angiogénica de la córnea producida por dosis crecientes de bFGF. Las unidades de densidad óptica (DO) se determinaron en una área (2.3mm) circunscrita a los implantes. Estos valores fueron comparados contra una curva de normalización densitométrica. Las barras representan el promedio de absorbancia en las áreas corneales analizadas para cada uno de los grupos control (ASB) y experimentales. También se ilustra el error estándar. Los números sobre las barras indican el número de casos cuantificados. F,7.7=47.1 ANOVA, post.hoc.Scheffe *P<0.0001, ** P<0.0278 vs. grupo testigo.

Incidencia de angiogénesis en respuesta a diferentes dosis de bFGF

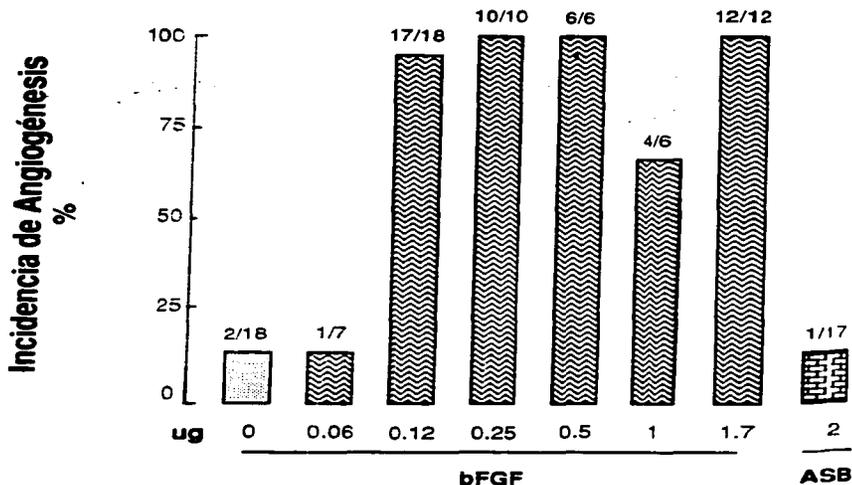
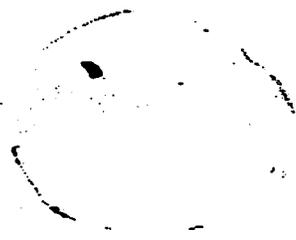


Figura 1. Número de respuestas positivas de angiogénesis como porcentaje del total de casos analizados (% de incidencia de angiogénesis) en respuesta a diferentes dosis de bFGF. ASB representa el grupo testigo tratado con albúmina sérica bovina. Los números sobre las barras indican el cociente entre el número de casos positivos y el número total de casos analizados.

**RESPUESTAS ANGIOGÉNICAS
REPRESENTATIVAS DEL EFECTO DE
DIFERENTES DOSIS DE bFGF**



0.0 ug



0.065 ug



0.125 ug



0.500 ug



1.00 ug



1.70 ug

Figura : Efecto angiogénico inducido por diferentes dosis de bFGF. Casos representativos que muestran respuestas dependientes de la dosis colocada.

2. Efecto de la PRL 16K sobre la estimulación de la angiogénesis inducida por bFGF.

Teniendo en cuenta que fragmentos moleculares de PRL de 16 y de 14 kDa inhiben la angiogénesis in vitro observada en efectos directos sobre la migración, asociación y proliferación de las células endoteliales, y que estos efectos in vitro parecen traducirse en una inhibición del proceso integral observado in vivo, procedimos a determinar si las PRLs, específicamente la PRL 16K, inhibe la formación de nuevos vasos en la córnea. Esta demostración reforzaría la posible acción de PRLs sobre el control de la angiogénesis en este tejido. Con tal propósito determinamos el efecto de este fragmento de PRL sobre la vascularización inducida por 125 ng de bFGF. En dos experimentos independientes y en confirmación a los resultados antes mencionados (fig.8) el bFGF indujo angiogénesis en el 100% de los los casos analizados. La administración conjunta de bFGF con PRL 16K (3 µg) disminuyó en un 25% el número de respuestas positivas de angiogénesis (fig. 8). No sólo se demostró una inhibición en el número de respuestas angiogénicas sino también en el grado de angiogénesis de las respuestas observadas. La figura 9 muestra casos representativos que ilustran el que la PRL 16K disminuyó el área capilar inducida por bFGF. Estas diferencias fueron significativas cuando se promedió la absorbancia asociada a los capilares de grupos independientes los datos estadísticos se muestran al pie de la figura 9.

En apoyo a la especificidad de este efecto la PRL 23K diluída y concentrada en forma similar a la PRL 16K, no mostró ningún efecto. Más

Efecto de PRL 16K sobre el grado de angiogénesis inducida por FGF

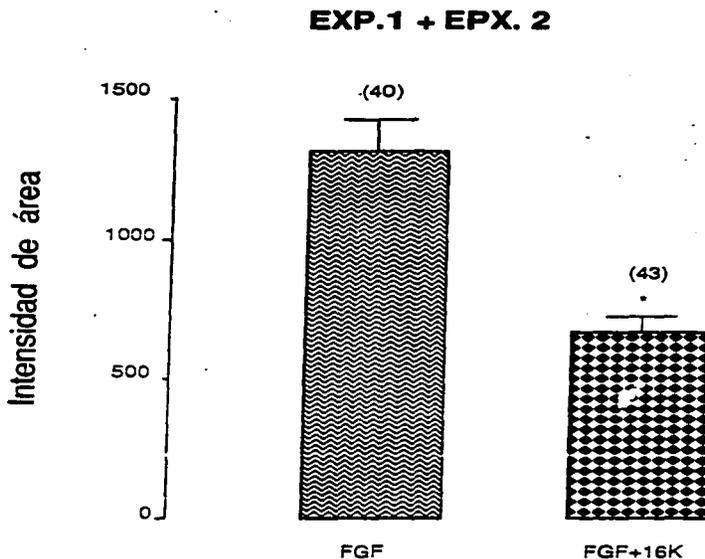
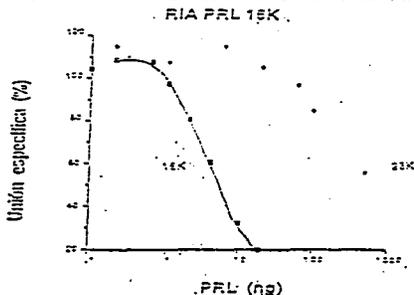


FIGURA . . Cuantificación del efecto de rPRL 16K sobre la angiogénesis inducida por bFGF en la córnea de las ratas sumando todos los casos de los dos experimentos hechos. * $P < 0.0001$ vs. FGF.

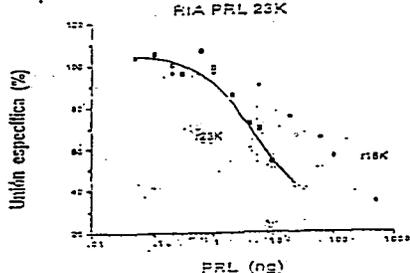
a) Antisueros anti PRLs de rata

La presencia de anticuerpos en los sueros se valoró mediante los radioinmunoanálisis respectivos. Ambos antisueros presentaron títulos altos de anticuerpos específicos. El anti PRL 23K mostró un título óptimo de trabajo de 1:10.000 al tiempo que el anti PRL 16K fue de 1:5000. Los RIAs específicos mostraron que ambos antisueros reconocen a las PRLs con una EC 50 de 2 ng. (figs. 10,11).

Caracterización de anticuerpos policlonales anti PRL 16K de rata



Caracterización de anticuerpos policlonales anti PRL 23K de rata



**RESPUESTAS ANGIOGENICAS
REPRESENTATIVAS EN RESPUESTA A
DIFERENTES ANTICUERPOS ANTI PRL**

POLICLONALES



**Preimmune
(8 ug)**



**Anti r23K IgG
(7ug)**



**Ascitis
(6ug)**

MONOCLONALES



Anti h23K



Anti h16K



Anti r23K

aún resultados preliminares con PRL 16K humana recombinante también inhibieron la respuesta angiogénica del bFGF.

Estos hallazgos indican que la neovascularización de la córnea puede ser inhibida por PRLs y por lo tanto apoyan la posibilidad de que las PRLs contribuyan a la falta de angiogénesis en dicho tejido. Esta posibilidad fue sometida a prueba mediante el uso de anticuerpos anti PRL poli y monoclonales. Además, algunas evidencias acerca de la posible participación de las PRLs en la regulación fisiológica de la angiogénesis son la presencia de receptores para el fragmento 16K en el endotelio, y en la presencia de PRLs con efectos directos sobre la angiogénesis en la adenohipófisis, en la neurohipófisis, en la circulación y en el endotelio.

Estos resultados corroboran el efecto antiangiogénico de la PRL 16K sobre el proceso integral de la angiogénesis observado *in vivo*. Más aún, estos hallazgos son consistentes con la posibilidad de que PRLs similares a la 16K participen en la inhibición natural del fenómeno y que por tanto se asocien y/o representen a las capturadas por los anticuerpos capaces de producir angiogénesis. Asimismo, el anticuerpo monoclonal dirigido contra la PRL 16K humana si bien fue el más efectivo para incrementar la incidencia de angiogénesis, no reconoce a la PRL 16K de rata al menos en la técnica empleada de Western blot. Será importante determinar si la ausencia de reconocimiento de este anticuerpo por la PRL 16K de rata se mantiene bajo condiciones más parecidas a las del bioensayo *vgr.*, cuando la estructura tridimensional de la PRL no esté alterada, por ejemplo realizando pruebas de radioinmunoanálisis o de Elisa, en las cuales no existe la desnaturalización proteica subsecuente a los Western blots.

Efecto de PRL 16K sobre el grado de angiogénesis inducida por FGF

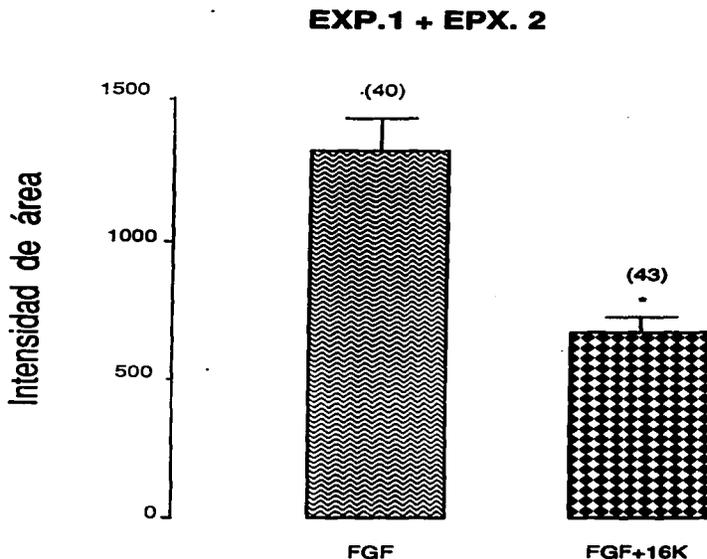


FIGURA . . Cuantificación del efecto de rPRL 16K sobre la angiogénesis inducida por bFGF en la córnea de las ratas sumando todos los casos de los dos experimentos hechos. * $P < 0.0001$ vs. FGF.

b) IgG policlonaies anti PRLs de rata

Para aumentar la concentración y pureza de los anticuerpos anti PRLs y poder aplicarlos directamente en la córnea de la rata, se procedió a purificar las IgGs de los antisueros generados. Dichas IgGs se utilizaron en rangos de 12 a 10 ug por implante, similares a las cantidades utilizadas por otros autores en este ensayo (95,97,100,105,114,116). La inmunoactividad específica de estas IgGs se confirmó mediante Western blot. Las IgGs de ambos antisueros reconocieron tanto a la PRL 23K como a la 16K, no así a una concentración equivalente de albúmina de suero bovino (figs.10,11). Por otra parte, las IgGs aisladas en forma similar del suero preinmune de estas conejas no reconocieron a dichas PRLs (Figs.10,11).

c) Anticuerpos monoclonales

Todos los anticuerpos monoclonales usados fueron previamente caracterizados como específicos para PRLs por los respectivos donantes.

En este estudio corroboramos su inmunorreactividad con las PRLs de rata mediante Western blots (fig.12). Particularmente, nos interesó determinar si aquellos generados contra la hormona humana reconocían a las PRLs de la rata, dadas las diferencias estructurales que existen entre las PRLs de ambas especies (55,80,86). Observamos que el anticuerpo anti rPRL (INN1) reconoce tanto a la rPRL 23K como a la 16K, y que los dos anticuerpos monoclonales anti PRL humana (368 y 1G8) reaccionan con la PRL 23K pero no con la PRL 16K de rata (fig.12).

Caracterización de anticuerpos anti PRL monoclonales

A. Anti rPRL 23K (INN-1)

B. Anti hPRL 23K (368)

C. Anti hPRL 16K (IG-8)

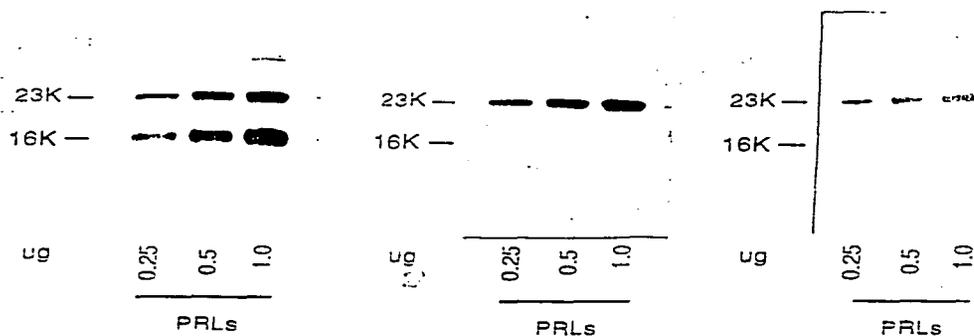


FIGURA 6. Western blots de mezclas de diversas concentraciones de PRL 23K y 16K de rata marcados con anti PRL monoclonales (1:5000) de rata (A) y humanos (B y C).

3. Efecto de anticuerpos anti PRLs de ratón sobre la neovascularización en la córnea de la rata

Se implantaron córneas con IgG aisladas de los anticuerpos anti PRL 23K y 16K y se evaluó su efecto sobre la incidencia de angiogénesis, definida ésta, como el porcentaje de respuestas positivas de angiogénesis en relación al total de casos analizados. La administración de anticuerpos anti PRL 23K (7µg) aumentó significativamente la incidencia de angiogénesis (38.3%) por sobre la angiogénesis basal (13.6%) en respuesta al vehículo solo (Hydron) o a la observada (9.5%) en respuesta a las IgGs (8µg) preinmunes aisladas de la misma coneja (fig.13).

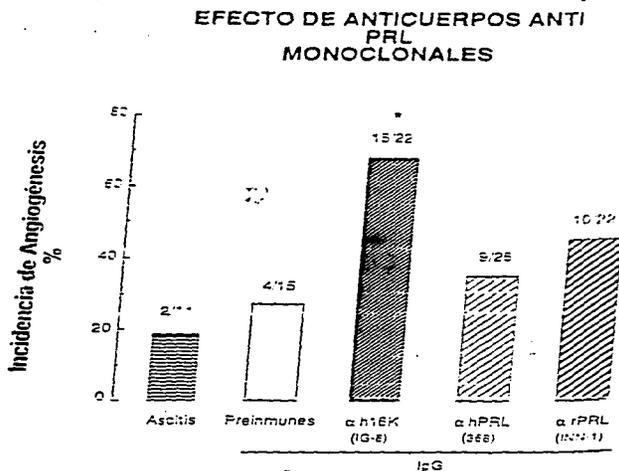


Figura . Número de respuestas positivas de angiogénesis como porcentaje del total de casos analizados (% de incidencia de angiogénesis) en respuesta a anticuerpos monoclonales anti prolactinas. Los números sobre las barras indican el número de casos positivos con respecto al total de casos analizados. X = 6.1.c.f-1 *P< 0.01 vs. IgG preinmunes.

La administración de anticuerpos anti PRL16K incrementó también el número de respuestas positivas de angiogénesis (20.8%) si bien dicho aumento no fue significativo, la administración de los anticuerpos monoclonales anti PRL se asoció en apoyo a la especificidad y a la validación de estos efectos, con una tendencia a incrementar la incidencia de angiogénesis (fig.14) El efecto más claro lo mostró el anticuerpo monoclonal anti PRL 16K humana donde el aumento sobre la incidencia de angiogénesis (68%) fue significativo (26%) por sobre el nivel de IgGs preinmunes de ratón (fig.14). Con los otros dos anticuerpos monoclonales el aumento no fue muy significativo (fig. 14). La figura 15 muestra casos representativos que ilustran el grado de angiogénesis de las respuestas positivas inducidas por los anticuerpos anti PRLs.

Efecto de Anticuerpos anti PRL Policionales

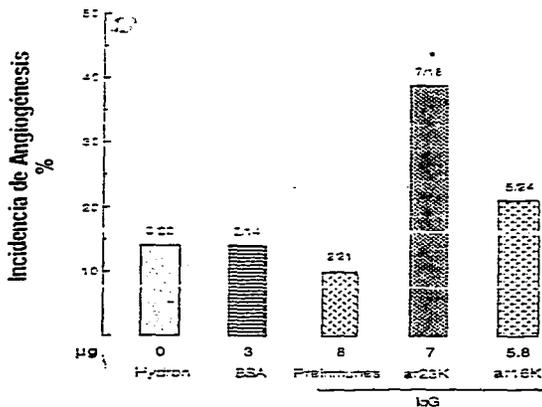


Figura 14. Número de respuestas positivas de angiogénesis como porcentaje del total de casos analizados (% de incidencia de angiogénesis) en respuesta a anticuerpos policlonales anti prolactina. Los números sobre las barras indican el número de casos positivos con respecto al total de casos analizados. * $X^2 = 2.0$, $P < 0.05$ vs IgG preinmunes.

El hecho de que la administración de anticuerpos anti PRL incremente el número de respuestas angiogénicas en la córnea de la rata, apoya la posibilidad de que la captura de PRLs endógenas por dichos anticuerpos se asocie con una estimulación del proceso angiogénico. La especificidad de este efecto de los anticuerpos se apoya en la falta de efecto al utilizar concentraciones similares de IgGs preimmunes tanto poli como monoclonales, así como en la falta de efecto de concentraciones similares de una proteína no específica (ASB). Estudios están en proceso para validar la efectividad del efecto de dichos anticuerpos en presencia de PRLs exógenas inhibidoras.

Así, estos hallazgos pueden sugerir la posibilidad de que PRLs endógenas con efectos inhibidores sobre la angiogénesis pudieran estar contribuyendo a determinar la ausencia de vascularización observada en la córnea. Este punto será retomado en la parte correspondiente a la discusión.

DISCUSION

El objetivo de este estudio fue analizar la posible participación de PRLs en la regulación fisiológica de la angiogénesis. Esta hipótesis se encuentra sustentada en diversas evidencias experimentales que basicamente incluyen por una parte, la demostración de que ciertos miembros de la familia de las PRLs inhiben el proceso angiogénico (45,52,73), y por otra, el que estas PRLs con efectos antiangiogénicos estan presentes endógenamente (52).

Una estrategia para validar si el efecto antiangiogénico de las PRLs podría ocurrir en condiciones fisiológicas se apoya en la demostración de que el fragmento de 16 kDa de la PRL inhibe la angiogénesis in vivo, es decir en las condiciones fisiológicas más próximas.

A este respecto, en un estudio previo se demostró que la PRL 16K mas no la PRL completa de 23 kDa de peso molecular, inhibe la formación de capilares sanguíneos en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (CAM) (41). En esta membrana como en el resto del embrión la angiogénesis ocurre activamente y es determinante de su crecimiento y diferenciación.

En este estudio confirmamos el efecto inhibitorio in vivo de la PRL 16K utilizando otro modelo de angiogénesis, el de la córnea de la rata. Este ensayo, a diferencia del de la CAM, es un ensayo homólogo en el que utilizamos PRLs y anticuerpos anti PRLs de rata y humano. En el modelo de la córnea, por estar formada de un estroma totalmente avascular, la

obtención de una respuesta positiva se considera como una demostración convincente de una verdadera neovascularización (83, 87-98).

Dado que en el adulto existen tejidos completamente avasculares como son el cartilago y la córnea, y los eventos de neovascularización se encuentran inhibidos en la mayoría de los casos, exceptuando procesos de inflamación y/o reparación de tejidos o durante la regeneración del endometrio en la mujer, el modelo de la córnea de la rata podría ser tomado como ejemplo natural de una inhibición local de la angiogénesis, que pudiese ser extrapolado a lo que sucede localmente en el adulto. La razón por la cual se da esta avascularización se desconoce y se ha implicado en ello el aumento de factores inhibidores, o bien la disminución de factores estimuladores de la angiogénesis, o ambos.

En nuestro ensayo de angiogénesis en la córnea de la rata, la formación de vasos sanguíneos fue estimulada por la administración de un factor angiogénico muy bien caracterizado: el factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos o bFGF. De tal manera, nuestros resultados demostraron, por primera vez, que la PRL 16K de rata es capaz de antagonizar el efecto estimulador del bFGF sobre la formación de capilares in vivo. En apoyo a la especificidad del efecto, la PRL 23K de rata no inhibió la neovascularización inducida por el bFGF, y resultados preliminares muestran que la PRL 16K humana tiene el mismo efecto inhibitorio que la PRL 16K de rata.

Es probable que este antagonismo involucre una acción directa sobre el endotelio. Ya se demostró que in vitro, en cultivos de células

endoteliales sobre matrices de colágena, la PRL 16K inhibe cada una de las etapas de la angiogénesis (41). Además, el efecto inhibitorio de la PRL 16K es directo, y no antagónico a nivel del receptor de bFGF porque se observó que existen sitios de unión específicos, saturables y de alta afinidad para este fragmento en membranas aisladas de células endoteliales, y el bFGF no compitió por este sitio de unión (43).

Por otra parte, la cascada de señalización desencadenada por los receptores clásicos de PRL requieren la formación de un complejo dimérico entre los receptores y el ligando (80,85,104,113,116), hecho que implica el reconocimiento de dos sitios de unión en la hormona. Se ha demostrado que el mecanismo de acción de la PRL involucra la activación de proteínas de la familia de las tirosinas cinasas denominadas Janus (JAK) (50,54,80,107,115,) y de proteínas cinasas denominadas MAPK. Sin embargo, es poco lo que se sabe acerca de la transducción mediada por el receptor de la PRL 16K. Recientemente se ha reportado que la interacción de la PRL 16K con su receptor, inhibe la fosforilación y la consecuente activación de la MAPK en respuesta al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y que dicho evento es distal a la fosforilación del receptor a este factor de crecimiento presente en las células endoteliales. Además, sugieren que la activación de MAPK es esencial para la acción proliferativa de bFGF y VEGF y por tanto el bloqueo de dicha activación media el efecto antiangiogénico de la PRL 16K (53, 114,117).

Por otra parte, el efecto inhibitorio de la PRL 16K sobre la angiogénesis de la córnea es consistente con la propuesta de PRLs presentes en este tejido podrían contribuir a su avascularidad. La córnea

de la rata por tanto, se presenta como un modelo ideal para estudiar la posible participación de PRLs en la inhibición natural del proceso angiogénico.

La estrategia al respecto fue administrar anticuerpos anti PRL específicos, capaces de neutralizar la acción de las PRLs endógenas y presumiblemente con ello, producir angiogénesis. Para establecer la especificidad de los anticuerpos, tuvimos en cuenta dos criterios:

1. que los anticuerpos policlonales no reconocieran a otras proteínas inespecíficas, y
2. que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las PRLs humanas reconocieran a las PRLs de la rata.

Si bien, en este bioensayo el uso de estos anticuerpos tanto policlonales como monoclonales apoya la hipótesis de la presencia de PRLs endógenas que se encuentran de alguna forma inhibiendo la formación de vasos en la córnea, hecho que se demuestra por la tendencia a estimular la neovascularización claramente significativa en dos casos, éste no nos permite discernir el tipo de PRL que pudiese estar mediando este efecto. Dado que las proteínas en solución exponen epítopos que pueden ser identificados por sus anticuerpos de forma distinta a como los reconocen cuando la proteína está desnaturalizada, el reconocimiento en condiciones desnaturalizantes de un anticuerpo anti PRL 23K únicamente a su antígeno específico, no implica que no reconozca a la PRL 16K o a la PRL 14K. Además debido a la carencia de un anticuerpo dirigido contra la porción carboxilo terminal de la PRL 16K, es aún más difícil discernir a cual PRL están reconociendo estos anticuerpos.

Existen otras evidencias que podrían apoyar la posible participación de las PRLs en la regulación fisiológica de la angiogénesis como es la presencia de PRLs con efectos directos sobre la angiogénesis en la adenohipófisis, donde se ha identificado a la PRL 16K; en la neurohipófisis, enriquecida con la PRL 14K (48); en la circulación, donde se han detectado a estas dos variantes (48, 52.55.); y, finalmente, de acuerdo a observaciones recientes de nuestro laboratorio, se demuestra su producción por las células endoteliales (52).

Ahora bien, la demostración de la existencia de PRLs endógenas que pudiesen estar participando en el control inhibitorio de la vascularización de la córnea, implica necesariamente la identificación del origen de dichas PRLs. Si bien, en la circulación se ha identificado a las PRLs de 16 y 14 kDa, que tienen acciones directas sobre la angiogénesis, su acceso al ojo no es claro, y es menos factible. Sin embargo, a nivel local, se ha reportado la presencia de la PRL en las lágrimas, y que dosis altas de PRL incrementan la actividad de Na^+ , K^+ -ATPasas que influyen sobre la capacidad secretora de la glándula lacrimal, además de haber observado la presencia de proteínas tipo PRL inmunorreactivas, en las células acinares de la glándula lacrimal de humano, de rata y de conejo, pero las implicaciones fisiológicas de la producción local de PRL vgr. posibles acciones autócrinas y parácrinas, aún no se han investigado.

Por su parte, las células de los epitelios interno y externo de la córnea tienen como función principal la producción de la matrix extracelular que conforma la córnea y el mantenimiento de una correcta

permeabilidad, este último factor, contribuye y de termina la transparencia de la córnea (117-125), y pudiera ser probable que estas células estuviesen produciendo estas proteínas tipo PRL que son capturadas por los anticuerpos utilizados en este bioensayo.

Otra de las posibles fuentes productoras de PRLs podría ser la retina. La retina, produce factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que en condiciones patológicas, debido a que es un factor difusible, estimula la producción de vasos sanguíneos aún hacia las cámaras internas del ojo (119-123), y teniendo en cuenta que debe existir un equilibrio vascular, es posible, que sea la PRL uno de los probables mediadores de este balance.

Finalmente, una última posibilidad, aunque tal vez menos favorecida, es que dado que los vasos de donde proviene la neovascularización se localizan principalmente en la coroides, pudiera ser que pése a los bajos niveles de PRL circulante, ésta pudiese ser captada por el endotelio y procesada proteolíticamente a una variante antiangiogénica, o que sea la PRL producida por el endotelio la que tenga estos efectos. Sin embargo, pudiese ser que la PRL identificada en la glándula lacrimal tenga algún efecto sobre este mecanismo inhibitorio. Además, tampoco se descarta la posibilidad de que existan prolactinas en otros compartimentos del ojo como son el humor vítreo y el humor acuoso, o en los tejidos mismos (córnea, retina, iris), y sería interesante identificar la presencia o no de PRL en estos sitios, y de existir, intentar discernir su papel fisiológico.

CONCLUSIONES

1. El bioensayo de la córnea de la rata se estableció en el laboratorio como modelo experimental de angiogénesis in-vivo. Dicho modelo fue validado para detectar bajo condiciones operacionales satisfactorias que permiten valorar y cuantificar respuestas angiogénicas específicas en función de:

a) Niveles de angiogénesis bajos en los grupos testigo reproducibles en todos los experimentos.

b) Efectos dosis dependientes en respuesta a la acción de un factor angiogénico conocido (bFGF).

2. La PRL 16K de rata y humano inhibe la angiogénesis inducida por bFGF. Este hallazgo demuestra por primera vez in-vivo el efecto antagónico de dicha PRL sobre la acción estimuladora del bFGF y confirma hallazgos previos sobre su acción inhibidora de la angiogénesis in-vivo.

3. La administración de anticuerpos específicos policlonales y monoclonales anti PRLs de rata y humano se asoció con un aumento en la incidencia de angiogénesis. Este efecto parece ser específico en virtud de que concentraciones similares de anticuerpos preinmunes y de proteínas inespecíficas no modificaron la incidencia basal de angiogénesis.

BIBLIOGRAFIA

1. *Klagsbrun, M. and Folkman, J. (1985) Growth factors. Chapter 37.*
2. *Folkman, J. (1984) Lab. Investigation 51: 601-604.*
3. *Folkman, J. (1985) Adv. Cancer Res. 43: 175-199.*
4. *Liotta, L.A., Steeg, P.S. and Stetler Stevenson, W.G. (1991) Cell: 64: 327-336.*
5. *Folkman, J. and Haudenschild, C. (1980) Nature 288: 551-556.*
6. *Folkman, J. Scientific American. Septiembre de 1996*
7. *Folkman, J. Scientific American. (1976) 234: 59-73.*
8. *Auerbach, W. and Auerbach R. (1994) Pharmac. Ther. 63: 265-311*
9. *Beck, Laurence., D'amore, Patricia. The FASEB: 11. April (1997)(.*
10. *Sage, Helene. Trends in Cell Biology: 7 May (1997).*
11. *Stromblad, Staffan., Cheresh, David. Trends in Cell Biology: 6 December (1996).*
12. *Friesel, Rbert., Maciag, Thomas., The FASEB Journal: 9. July (1995).*
13. *Brooks, Peter., Cancer and Metastasis Reviews: 15: 187-194. (1996).*
14. *Folkman, Judah., Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital., Boston. 333. No. 26.(1995).*
15. *Barregay, E.J., Journal Molecular of Medicine. 73: 333-346. (1995).*
16. *Polverini, P.J., Crit.Rev. Oral. Biol. Med. 6(3): 230-247. (1995).*
17. *Hu De-En, Yozo., Yasui, Kiyoshi., et. al., British Journal of Pharmacology 118:1584-1591. (1996).*
18. *Majewski, Slawomir Marczak Maria., et. al., The Journal of Investigative Dermatology. 106. No. 5. May. (1996).*
19. *Kohn Elise. C., Alessandro, Ricardo., et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:1307-1311. February (1995).*
20. *Olson, Karen, A., Fett, James W., et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:442-446. January (1995).*
21. *Ingber, Donald E., Prusty, Deepa., et. al., J. Biomechanics., 28:12, 1471-1484. (1995).*

22. D'amato, Robert J., Loughnan, Michael S., et.al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:4082-4085, April (1994).
23. Cross, M., Dexter, Michael T., *Cell.* **64**:271-280. January. (1991).
24. Sholley, Milton M., Ferguson, Gilda P., et.al. *Laboratory Investigation.* **51**. No.6. (1984).
25. Folkman, Judah., Shing, Yuen., *The Journal of Biological Chemistry.* **267.**, (1992).
26. Risau, Werner., Flamme, Ingo., *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **11**:73-91. (1995).
27. D'amore, Patricia., Thompson, Robert., *Anu. Rev. Physiol.* **49**:453-464., (1987).
28. Linzer, Daniel., Lee, Se-Jin., et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:4356-4359. (1985).
29. Massagué, Joan., Hata, Akiko. et. al., *Trends in Cell Biology.* **7**. May. (1997).
30. Ziche, Marina., Magliano, Domenico., et.al., *Laboratory Investigation.*, **76**. No.4. (1997).
31. Sporn Michael B., Roberts, Anita. *Nature.*, **332**. March. (1988).
32. Bradham, Douglass M., Igarashi, Atsuyuki., et. al., *The Journal of Cell Biology.* **114**. 6., September (1991).
33. Johnson, Daniel E., Williams, Lewia T., *Advances in Cancer Research.* **60**. (1993)
34. Olson, Karen., Fett, James., et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**. January (1995).
35. Bowen-Pope, Daniel F., Ross, Russell., *The Journal of Biological Chemistry.* **257**. Mayo. (1982).
36. Folkman, Juda., Klagsbrun, Michael., et. al., *American Journal of Patology.* **130**. (February 1988).
37. Yayon, Avner., Klagsbrun, Michael., *Cancer and Metastasis Reviews.* **9**:191-202. (1990).
38. Weich, Hebert A., Iberg, Niggl., et. al., *Journal of Cell Biochemistry.* **47**. (1991).
39. Bobik, A., Campbell, Jule., *Pharmacological Reviews.* **4.**, (1993).
40. Taylor, Stephanie, Folkman, Judah., *Nature.* **297**. (1982).
41. Clapp, C., Martial, J.A., Guzmán, R.C., Rentier-Delrue, F. and Weiner, R. I. (1993) *Endocrinology* **133**: 1292-1298.
42. Ferrara, N., Clapp, C. and Weiner, R. (1991) *Endocrinology* **129**: 896-900.
43. Clapp, C., Sears, P. S., Russell, D., Richards, J., Levay-Young, B. & Nicoll, C. S. (1988). *Endocrinology* **122**: 2892-2898.

44. Clapp, C. & Weiner, R. J. (1992). *Endocrinology* **130**: 1380-1386.
45. Clapp, C., Sears, P. & Nicoll, C. S. (1989) *Endocrinology* **125**: 1054-1059.
46. Clapp, C. (1987) *Endocrinology* **121**: 2055-2064.
47. Clapp, C., Torner, L., Gutiérrez-Ospina, G., Alcántara, E. López, G. F., Nagano, M., Kelly, P., Mejía, S., Morales, M., and Martínez de la Escalera, G. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 10384-10388.
48. Torner, L., Mejía, S., López, F., Quintanar, A., Martínez de la Escalera, G., and Clapp, C. (1995) *Endocrinology* **136**: 5454-5460.
49. López-Gómez, F. J., Torner, L., Mejía, S., Martínez de la E. G., and Clapp, C. (1995) *Endocrine* **3**: 573-578.
50. C. Clapp., F.J. López., G. Nava., J. Macotela., E. Acosta., L. Torner., Z. Dueñas.A. Corbacho., A. Arroyo and G. Martínez de la Escalera. (Junio de 1996) 10th International Congress of endocrinology. San Francisco. U.S.A.
51. Mejía, Salvador., Morales, M.A., et. al., *Neuroendocrinology* **66**, 2. (1997).
52. Corbacho, Rodríguez., Macotela, Y., et. al., "Synthesis and secretion of prolactin-like proteins in endothelial cells". Poster sesion **PO3-116**. *Endocrine Meeting 1997*.
53. D'angelo, Gisela., Struman, Ingrid., et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**., July., (1995).
54. Sinha, Yagya, N., *Endocrine Rev.* (1995) **16**: 354.
55. Sinha, Yagya, N., *TEM*, Vol.3., 3. (1992).
56. Lewis, Urban, J., *Ann. Rev. Physiol.* **46**., (1984).
57. Whitaker, Michael., Klee, George., et. al. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* **58**., 5., (1983).
58. Mena, F., Hummelt, G., et. al., *Endocrinology* **130**., 6 (1992).
59. Oetting, William. Tuazon, Polygena, T., et. al., *The Journal of Biological Chemistry.* **261**, (1986).
60. Neill, Jimmy., Nagy, Gyorgy M., *The Physiology of Reproduction. Second Edition. Chapter 33.* (1994).
61. Kathleen, Elias A., Weiner, Richard., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, July (1984).
62. Martínez de la Escalera, G., Weiner, Richard., *Endocrine Reviews.*, **13**. (1992).
63. Papavasiliou, Stathis S., Brue, Thierry, et. al., *Neuroendocrinology.* **62**. (1995).
64. Arey, Brian J., Freeman, Maerc E., *Endocrinology.* **124**. (1989).
65. Freemark, M., Edery, M. et. al. *Journal of Endocrinology.* **144**. (1995).

66. Leite-de-Moraes, M C., Touraine, P., et. al. *Journal of Endocrinology*. **147**. (1995).
67. Clevenger, Charles., Torigoe, Toshihiko., et. al., *The Journal of Biological Chemistry*. **269**. (1994).
68. Hallgeir, Rui., Lebrun, Jean-Jacques., et. al., *Endocrinology* **135**. (1994).
69. Fuh, Germaine., Colosio, Peter., et. al., *The Journal of Biological Chemistry*. **268**. (1993).
70. Crumeyrolle-Arias, Michele., Latouche, Jacqueline., et. al., *Neuroendocrinology*., **57**. (1993).
71. Buck, Katrin., Vanek, Mirka., et. al., *Endocrinology*. **130**. (1992).
72. Rui, Hallgeir., Djeu, Julie Y., et. al., *The Journal of Biological Chemistry*. **267**.33. (1992).
73. Kelly, Paul., Djiane, Jean., et. al. *Endocrine Reviews* **12**: 235-250. (1991)
74. Clapp, Carmen., Martinez de la Escalera., Gonzalo., NIPS, Vol **12**:40-46. (1997) In Press.
75. Harlan, Richard., Scammell, Jonathan., *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **39** (1991).
76. Yuan-Li, Lee-Yu., *P.S.E.B.M.* **215**. (1997).
77. Nira, Ben-Jonathan., Mershon, John L., et. al., *Endocrine Reviews*. **17**. (1996).
78. Lkhider, Mustapha., Delpal, Serge., et al., *Endocrinology* **137**. (1996).
79. *Endocrinology*. **135**. Editorial. (1994).
80. Goffin, Vincent., Shiverick, T., et. al., *Endocrine Reviews*. **17**. (1996).
81. Mastro, Rebecca., Dannies, Priscilla., *Endocrinology*. **136**. (1995).
82. Nomuras, Motohiro., Yamagishi, Sho-ichi., et. al., *The Journal of Biological Chemistry*. **270**. (1995).
83. Auerbach Robert., Auerbach, Wanda., et. al., *Pharmacology Ther.* **51**. (1991).
84. Appleton, Ian., Brown, Nicola J., et. al., *Journal of Pathology*. **180** (1996).
85. Polverini, Peter., Bouck, Noel., et. al., *Methods in Enzymology*. **198**. (1991).
86. Passaniti, Antonio., Taylor, Robert., et. al., *Laboratory Investigation*. **67**. (1992).
87. Vu, Michael., Smith, Clayton., et. al., *Laboratory Investigation*. **53**. (1985).
88. Olivo, Michael., Bhardwaj, Ranjit., et. al., *The Anatomical Record*. **234**. (1992).
89. Auerbach, Robert., Kubai, Louis., et.al., *Developmental Biology*. **41**. (1974).

90. Tanaka, N.G., Sakamoto, N., et. al., *Exp. Phatol.* **30.** (1986).
91. Brown, Kathryn., Maynes, Susan. et. al., *Laboratory Investigation.* **75.** (1996).
92. Eilber, Frederick., Nguyen, Mail., et. al., *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **228.** (1996).
93. Pelton, R. et. al. (1991) *J. Cell Biol.* **115:** 1091-1105.
94. Muller, G. et. al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84:** 5600-5604
95. Gamble, J. R. et. al. (1993b) *J. Cell. Biol.* **121:** 931-943
96. Madri, J., Bell, L. and Merwin, J. (1992) *Molec. Reprod. Dev.* **32:** 121-126
97. M. A. Gimbrone, Jr., R.S. Cotran, S.B. Leapman, and J. Folkman, *J. Natl. Cancer Ins.* (1974) **52:** 413.
98. Pinatel-Simore, Valerie., Guerrin, Marina., et. al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* **35.** (1994).
99. Murata, Toshinori., Nakagawa, Kazunori., et. al., *Laboratory Investigation.* **74.** (1996).
100. Banda, Michael., Knighton, David., et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79.** (1982).
101. Adamis, Anthony., Miller, Joan W., Et. al., *American Journal of Ophthalmology.* **118.** (1994).
102. Warren, Dwight., Azzarolo, Ana Marta., et. al., *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes.* (1994).
103. Finkelstein, Daniel., Brem, Steven., *American Journal of Ophthalmology.* (1977).
104. Good Borah., Poiverini, Peter., et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87.** (1990).
105. Gaudric, Alain., Nguyen, T., et. al. (1992) *Ophthalmic Res.* (1992) **42:** 181-188
106. Muthukkapuppan, Vr., Auerbach, R., *Science* **205.** (1979).
110. Ingoer, D.E., Madri, J.A., et. al., *Endocrinology.* **119.** (1986).
111. Folkman, Judah., Watson, Karol., et. al., *Nature* **339.** (1989).
112. Folkman, Judah., Haudenschild, Cristian., *Nature.* **288.** (1980).
113. Jakson, Dowdy., Volpert, Olga., et. al., *Science.* **266.** (1994).
114. Brooks, Peter., Montgomery, Anthony., et. al., *Cell.* **79.** (1994).
115. Friedlander, Martin., Brooks, Peter., et. al., *Science* **270** (1995).
116. Gross, Jerome., Azizkhan, Richard., et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78.** (1981).

117. *Rymaszewski, Z., Cohen, Robert., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88 (1991).*
118. *Luna, Jose., Tobe, Takao., et al., Laboratory Investigaton. 75 (1996).*
119. *Grant, Maria., Caballero, Sergio., et al., Regulatory Peptides. 48. (1993).*
120. *Shima, David., Gougos, Anne., et. al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. 37. (1996).*
121. *Kalfa, Theodosia., Gerritsen, Mary., et. al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. 36. (1995).*
122. *Smith, Lois., Kopchick, John., et. al., Science 276. (1997).*
123. *Miller, Joan., Adams, David., et. al., American Journal of Pathology 145. (1994).*
124. *Azzarolo, Ana Maria., Bjerrum, Kirsten., et. al., Investigative Ophthalmology & Visual Science 36. (1995).*
125. *Sullivan, David., Block, Linda., et. al., Acta Ophthalmol. Scand. 74. (1996).*