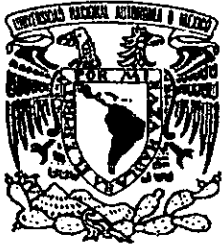


030977.
1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

PROLACTINA EN TEJIDOS Y FLUIDOS OCULARES

Tesis que para obtener el grado de doctor sustenta la estudiante:

291480

Zulma Janeth Dueñas Gómez

COMITÉ EVALUADOR:

Dr. Albeto Huberman

Dr. Miguel Morales

Dr. Hugo Quiróz

Dr. Manuel Salas

Dr. Mauricio Díaz

Dr. Carlos Arámburo

TUTORA:

Dra. Carmen Clapp

Marzo del 2001



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.

RESUMEN

La formación de nuevos vasos capilares sanguíneos o angiogénesis es regulada por numerosos factores que incluyen a miembros de la familia hormonal de la prolactina (PRL). El fragmento amino-terminal de 16 kDa de esta hormona (PRL 16K) inhibe la angiogénesis a través de acciones directas sobre la proliferación y la activación de proteasas en células endoteliales. Estudios recientes mostraron que anticuerpos policlonales anti-PRL inducen angiogénesis en la cornea y permitieron proponer la hipótesis que isoformas de PRL con acciones antiangiogénicas participan en el control de la avascularidad de la cornea. Investigamos esta hipótesis mediante el análisis de la presencia y el origen de PRLs anti-angiogénicas en tejidos y fluidos oculares de la rata. Asimismo determinamos PRL en biopsias de pacientes con retinopatía del prematuro, un padecimiento neovascular de la retina. Anticuerpos monoclonales anti-PRL indujeron angiogénesis en la cornea de la rata y su efecto se asoció con PRLs inmunorreactivas de 23, 21 y 16 kDa en cornea, iris, retina, y en el humor acuoso. Consistentemente, se amplificó el ARN mensajero de PRL en estos tejidos y en células aisladas de los epitelios externos e internos de la cornea. En los pacientes con retinopatía del prematuro se midió PRL inmunorreactiva en humor acuoso, líquido subretiniano y suero. Sus valores no se correlacionaron con los presentes en la circulación. Finalmente se detectó el ARN mensajero de PRL y una proteína inmunorreactiva de 16 kDa en las membranas fibrovasculares presentes en el vítreo de estos pacientes. En conclusión, el ojo expresa PRLs capaces de inhibir la angiogénesis y constituye un nuevo órgano productor y blanco de esta familia hormonal.

ABSTRACT

Angiogenesis, the outgrowth of new blood vessels is regulated by multiple factors that include members of the prolactin (PRL) hormonal family. The amino-terminal 16 kDa fragment of PRL (16K-PRL) inhibits angiogenesis via inhibition of endothelial cell proliferation and protease activation. Immunoneutralization with anti-PRL antibodies induced angiogenesis in the cornea and suggested that anti-angiogenic PRLs could contribute to the avascularity of this organ. Here, we have investigated the expression of anti-angiogenic PRLs in the cornea and in other ocular tissues and fluids of the rat. Moreover, we have analyzed the expression of PRL in ocular biopsies of patients with premature retinopathy, a neovascular eye disease. Monoclonal antibodies directed against PRL induced angiogenesis in the cornea and associated with proteins of 23, 21 and 16 kDa in the cornea, iris, retina and in the aqueous humor. Consistently, PRL mRNA was amplified from homogenates of these tissues and from internal and external epithelial cells isolated from the cornea. Likewise, immunoreactive PRL was measured in the aqueous humor, subretinal fluid and serum of patients with premature retinopathy, and these levels did not correlate with those present in the circulation. Finally, PRL mRNA and a 16 kDa immunoreactive protein were detected in the fibrovascular membranes formed in the vitreous compartment of these patients. In conclusion, our results indicate that antiangiogenic PRLs are expressed in the eye of rats and in humans suffering from a neovascular retinal disease. Accordingly, the eye represents a new site for the production and action of PRL, that may be relevant for the control of ocular neovascularization.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
TABLA DE CONTENIDO.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
I. ANGIOGÉNESIS.....	5
II. PROLACTINA.....	7
1. Generalidades.....	7
2. Prolactinas y angiogénesis.....	9
3. Prolactina 16K.....	10
5. PRLs endógenas con efectos sobre la angiogénesis.....	14
6. Prolactina endotelial.....	15
III. ANTECEDENTES INMEDIATOS.....	17
1. Prolactina y angiogénesis ocular.....	17
2. Trastornos clínicos de neovascularización de la retina.....	18
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	20
MATERIALES Y METODOS.....	21
- Animales y Toma de muestras.....	21
- Pacientes con Retinopatía del Prematuro.....	21
1. Bioensayo de angiogénesis.....	21
2. Procesamiento de córneas.....	22
3. Análisis y fotografía.....	23
4. Homogenizados de Tejidos.....	23
5. Western blot.....	24
6. Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para PRL humana.....	24
7. Inmunocitoquímica (ICQ).....	25
8. Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
En la figura 6 se esquematiza la anatomía del ojo y la histología de la córnea. Como se puede apreciar la córnea está constituida por varias capas de un epitelio externo, un estroma rico en colágena y una única capa de células epiteliales internas, también conocido como endotelio corneal.....	28
1. Efecto de anticuerpos monoclonales anti PRLs sobre la neovascularización de la córnea. ...	28
2. Inmunoreactividad de PRLs en córnea, iris, retina y humor acuoso de rata.....	31
3. Inmunoreactividad asociada al receptor de PRL en el epitelio corneal.....	36
4. Expresión de PRL en córnea, iris y retina de rata.....	38
5. Prolactina inmunoreactiva en fluidos oculares y en suero de pacientes con retinopatía del prematuro.....	42
6. Falta de Correlación entre las PRLs oculares y el suero de pacientes con retinopatía del prematuro.....	46
7. Presencia de PRL bioactiva en fluidos oculares y suero de pacientes con retinopatía del prematuro.....	47
8. Expresión de PRL en las membranas fibrosas del vítreo de pacientes con RP.....	48
9. PRL 16K en membranas fibrovasculares de pacientes con Retinopatía del Prematuro.....	49
CONCLUSIONES.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	54

INTRODUCCIÓN

I. ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis o neovascularización, es el proceso de formación de nuevos vasos capilares sanguíneos a partir de vasos pre-existentes. Este proceso es fundamental para el crecimiento y desarrollo de los tejidos por lo que ocurre muy activamente durante las etapas embrionaria y fetal. Sin embargo después del nacimiento este proceso disminuye y en el adulto prácticamente desaparece a excepción de eventos en el sistema reproductivo de las hembras, tales como la ovulación, la formación del cuerpo lúteo en el ovario, la proliferación del endometrio uterino, la formación de la placenta y de la glándula mamaria, entre otros. Adicionalmente la angiogénesis tiene lugar en el adulto a consecuencia de heridas o fracturas.^{1,2}

El enorme interés por entender la regulación de la angiogénesis deriva del reconocimiento de que varias patologías dependen de la sobreproducción de vasos sanguíneos. Por ejemplo, la angiogénesis es esencial para el desarrollo de tumores sólidos. Los nuevos vasos sanguíneos permiten al tumor alcanzar una tasa de crecimiento máxima, a través de aportar oxígeno y nutrientes y extraer las sustancias de desecho. Además los nuevos capilares proveen de una ruta para la migración de las células tumorales hacia la formación de tumores secundarios o metástasis.^{2,3} Otro ejemplo de padecimientos angiogénico-dependientes, es la artritis reumatoide, donde los nuevos vasos sanguíneos invaden y destruyen el cartilago de la articulación.⁴ Adicionalmente, las patologías más frecuentes de la retina resultan de la formación de neovasos que la destruyen o alteran su funcionamiento. Los trastornos neovasculares de la retina se encuentran entre las principales causas de ceguera en la infancia (retinopatía del prematuro), en pacientes diabéticos (retinopatía diabética) y en pacientes mayores de 65 años (degeneración macular asociada con la edad).^{5,6}

La mayor parte de los factores reguladores de la angiogénesis pertenecen a la familia de los factores de crecimiento y tienen la capacidad de regular la función del endotelio tanto directa como indirectamente. (Fig.1)

Dentro de los principales factores estimuladores de la angiogénesis (angiogénicos) se incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos (bFGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF β), el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la interleucina 8 y el factor de crecimiento de hepatocitos conocido como "scatter factor" (SF). (Fig 1) Por otra parte la regulación negativa de la angiogénesis también está ampliamente representada, e incluye factores como la trombospondina, la endostatina, la angiostatina, el factor tisular inhibidor de metaloproteinasas (TIMP), el factor derivado de plaquetas IV (PF IV), el interferon alfa (INF α) y fragmentos moleculares de la prolactina (PRL). (Fig. 1) El equilibrio entre la acción de factores estimuladores e inhibidores determina tanto a la angiogénesis fisiológica y su alteración en condiciones patológicas.⁷

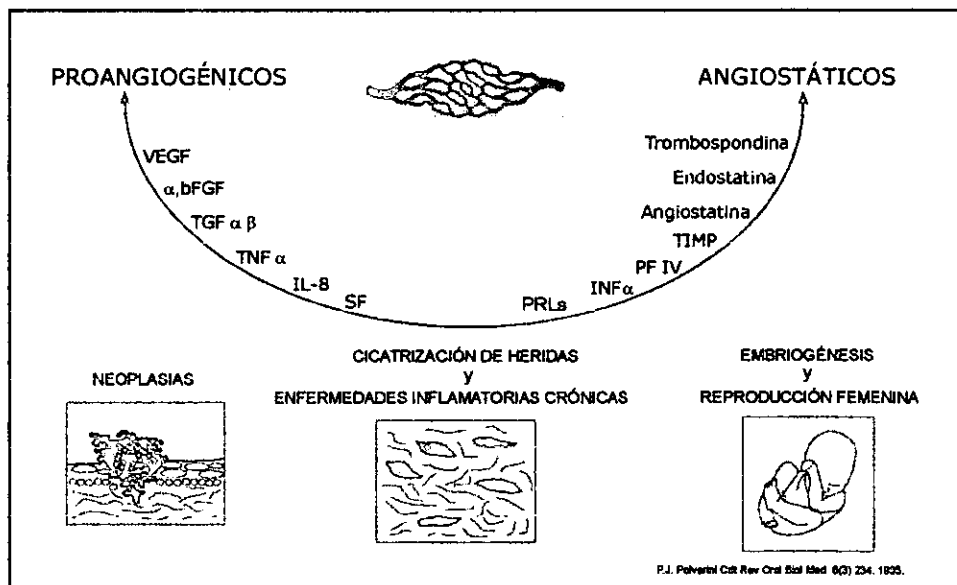


Fig. 1 Algunos de los factores reguladores de la angiogénesis y algunos eventos fisiológicos y patológicos que dependen de ella.

Los factores reguladores de la angiogénesis pueden actuar de manera endocrina, parácrina, o autócrina sobre uno o varios de los eventos que

constituyen dicho proceso. Estos eventos incluyen la degradación de la membrana basal del capilar, la migración de las células endoteliales, su proliferación, su asociación en estructuras tubulares y, finalmente, su diferenciación con la subsecuente formación de una nueva membrana basal (Fig.2).^{8,9}

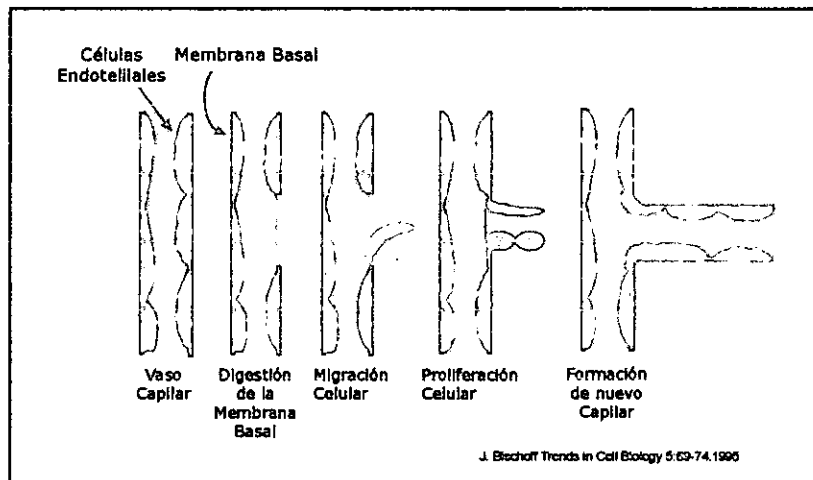


Fig. 2 Pasos que incluyen la formación de un nuevo capilar a partir de uno ya existente (angiogénesis).

Los factores que regulan localmente la angiogénesis se producen principalmente en células tales como macrófagos, fibroblastos, células tumorales, e incluso por el propio endotelio vascular.

II. PROLACTINA

1. Generalidades

Las prolactinas representan una familia de proteínas derivadas de un solo gen y que difieren estructuralmente entre sí debido a modificaciones postraduccionales tales como fosforilación, glicosilación, desamidación, agregación y proteólisis a partir de una proteína predominante con cerca de 200 aminoácidos y una masa molecular de 23 kDa.¹⁰ Las PRLs actúan como hormonas o citocinas en la regulación de funciones diversas que inciden sobre la

reproducción, la osmorregulación, el crecimiento, el metabolismo y la modulación de la respuesta inmune.^{11,12} (Fig.3)

Los sitios de producción de PRL son diversos. Si bien las PRLs se producen principalmente por los lactotrofos adenohipofisarios, que comprenden el 20-50% del total de las células de la hipófisis anterior, se sabe que existen diversos tejidos extrahipofisarios que producen y secretan PRL. Estos incluyen a células de la glándula mamaria, la decidua uterina, el útero, el sistema inmune, el cerebro y el endotelio vascular, entre otros.^{12,14}

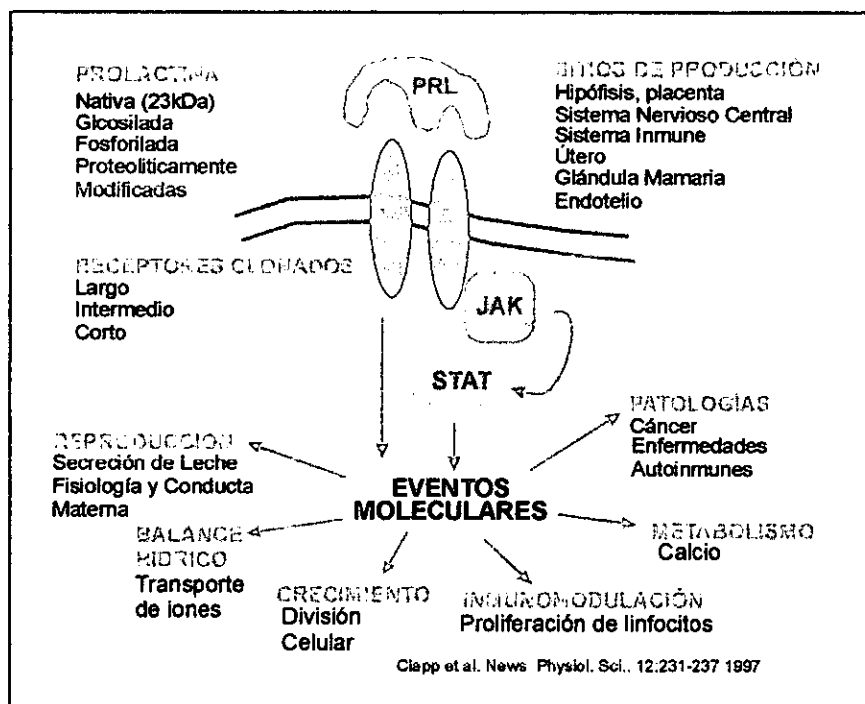


Fig. 3 Esquema que ilustra diferentes aspectos de la fisiología de la PRL.

La PRL inicia sus efectos a través de producir la dimerización de sus receptores en la membrana de sus células blanco, lo cual lleva a la activación de diversos mecanismos intracelulares. Se han descrito 3 variantes del receptor de PRL que resultan del procesamiento alternativo del mensajero y que de acuerdo al tamaño de su dominio intracelular se denominan como receptores corto mediano y largo.¹⁴ Durante los últimos años se ha documentado como uno de los mecanismos principales activados por los receptores de prolactina a la vía denominada JAK/STAT “Jannus Kinases/Signal Transducer and Activator of

Transcription". Las JAK representan a una familia de tirosinas cinasas capaces de fosforilar a los factores de transcripción STAT. La fosforilación de STAT permite su translocación al núcleo y subsecuentemente su unión a secuencias consenso GAS "Gamma Activation Site" en el ADN, que conlleva a la activación de la transcripción de diferentes genes que incluyen al los interferones alfa, beta y gamma. De éstos y otros mecanismos, resultan los distintos efectos de la PRLs (Figs.3 y 4).¹⁰⁻¹⁵

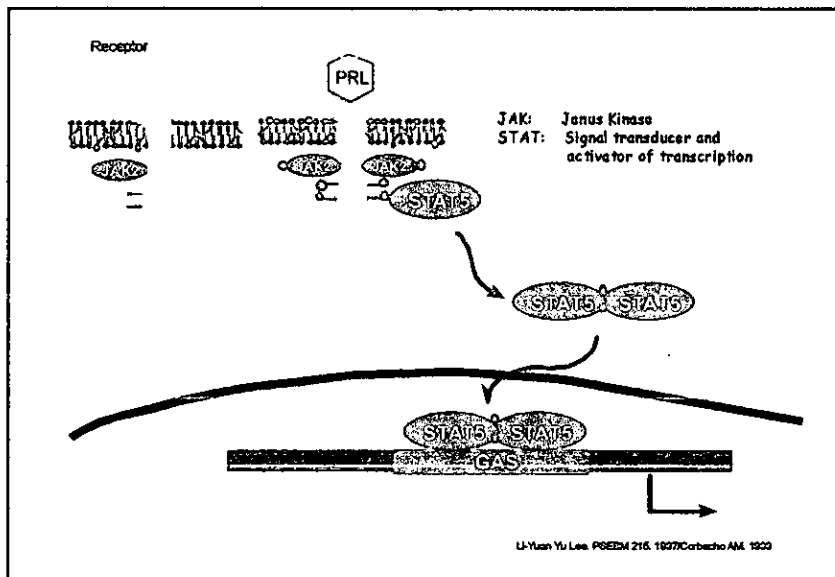


Fig. 4 Esquema de la vía de señalización Jak/Stat, que ha sido la más caracterizada para la PRL.

La diversidad de efectos de la PRL se ha intentado explicar en función de la heterogeneidad estructural de la hormona y de sus receptores. Se ha propuesto que las variantes moleculares que resultan de la modificación postraducciona podrian activar preferencial o exclusivamente algunas isoformas del receptor y no otras. Así, las isoformas de PRL al activar un determinado receptor podrian mediar efectos específicos de la hormona. Ejemplo de esto son los fragmentos moleculares de la PRL con efectos antiangiogénicos.¹²⁻¹⁵

2. Prolactinas y angiogénesis

El descubrimiento de que fragmentos moleculares de la PRL inhiben la angiogénesis se originó en estudios encaminados a analizar los mecanismos responsables de la generación de tumores adenohipofisarios secretores de PRL (prolactinomas). En 1984, Elias y Weiner observaron que ratas con prolactinomas inducidos por estrógenos, desarrollaban una vía de irrigación directa a la hipófisis anterior, sin relevo en el hipotálamo y que provenía de la carótida interna. Desde un punto de vista neuroendocrinológico, esta nueva vía de irrigación permitía a los lactotropos escapar de la inhibición tónica ejercida por el hipotálamo. La ausencia de inhibición permitía aumentar el número de lactotropos y potencialmente su transformación tumoral. Dado que los estrógenos estimulan la producción y secreción de PRL ¹⁶ se consideró que esta hormona podría ser un candidato a ser analizado como factor responsable de los neovasos. Si bien la PRL de 23 kDa no mostró acciones angiogénicas, el fragmento amino-terminal de 16 kDa de la PRL inhibió el crecimiento de células endoteliales en cultivo.¹⁷ Estos hallazgos dieron pie para investigar la angiogénesis como un nuevo campo de acción de esta familia hormonal.

3. Prolactina 16K

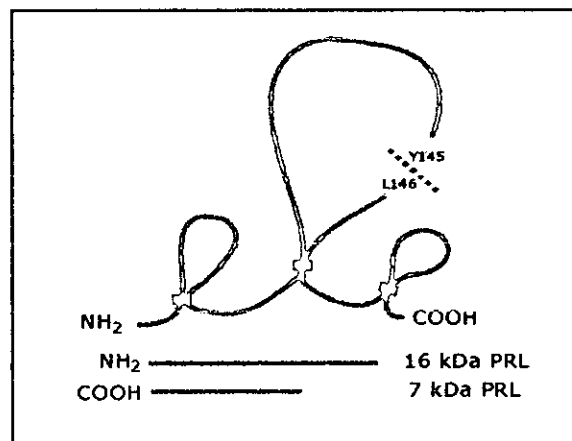


Fig. 5 Esquema de la PRL que presenta un corte proteolítico entre los aminoácidos tirosina 145 y leucina 146. La reducción del puente disulfuro intermedio separa la molécula en un fragmento N-terminal de 16 kDa y uno C-terminal de 7 kDa.

La prolactina de 16 kDa resulta de la proteólisis de la PRL 23K, mediante un corte entre los aminoácidos tirosina 145 y leucina 146 y la reducción del puente bisulfuro intermedio.¹⁸ (Fig.5) Las proteasas responsables de dicho procesamiento se han detectado en homogenizados de distintos órganos blanco de PRL como la glándula mamaria, el hígado y la próstata.¹⁹ Si bien la proteasa no se ha identificado, estudios *in vitro* han implicado a la enzima lisosomal catepsina D, con base en que esta enzima puede generar a la PRL 16K a partir de un estándar puro de PRL.²⁰

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 en sustitución de la Lisina 124. Además se sustituyó la cisteína 58 por serina para prevenir la formación incorrecta de puentes bisulfuro.^{21,22}

La PRL 16K ejerce muchos de los efectos de la PRL 23K aunque con menor potencia, como por ejemplo la estimulación de la proliferación del epitelio mamario y de las células Nb₂.²³ Las células Nb₂ representan una línea celular derivada de un linfoma murino a partir de linfocitos T, que prolifera específicamente en respuesta a PRL y por lo tanto son utilizadas como un bioensayo para detectar y cuantificar a esta hormona.²³ No obstante, el principal interés sobre esta variante se deriva de sus efectos inhibidores sobre la angiogénesis, efecto propio de este fragmento hormonal, que no comparte con la PRL íntegra. La PRL 16K, más no la PRL íntegra, es capaz de inhibir la proliferación de células endoteliales de diversas especies y lechos vasculares.²¹ Además, la PRL 16K inhibe la asociación de las células endoteliales en estructuras tubulares semejantes a capilares, que ocurre cuando éstas son cultivadas en geles de colágena.²¹ Estas acciones sobre el endotelio se traducen en una inhibición del proceso integral de la angiogénesis que ocurre *in vivo*. La PRL 16K inhibe la angiogenesis en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo así como también inhibe la angiogénesis inducida por bFGF en córneas de rata.^{17,24,25.}

Por otra parte, experimentos realizados por el grupo de colaboradores de Weiner y Martial, muestran que uno de los mecanismos por los cuales la PRL 16K ejerce su efecto antiangiogénico es mediante la inhibición de la urocinasa activadora del plásmínógeno (uAP). La activación de la uAP es fundamental en la regulación de la angiogénesis porque activa la cascada de proteasas que degradan la matriz extracelular y por lo tanto juegan un papel esencial en la migración de las células endoteliales y en la reparación de los tejidos. El tratamiento de células endoteliales derivadas de capilares de cerebro bovino con PRL 16K, inhibe la actividad de la uAP a través de estimular la expresión del inhibidor del plásmínógeno-1 (PAI-1).²⁶ La activación de la expresión de PAI-1 por 16K PRL inhibe la degradación de la matriz extracelular por uPA, previniendo así la angiogénesis.^{26,27}

Se sabe además que en las células endoteliales la activación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), media los efectos proliferativos de bFGF y VEGF, y que la PRL 16K inhibe la fosforilación y la activación de las MAPK (p42 y p44 MAPK), a través de inhibir la activación de Ras inducida por estos factores.

²⁷(Fig.6)

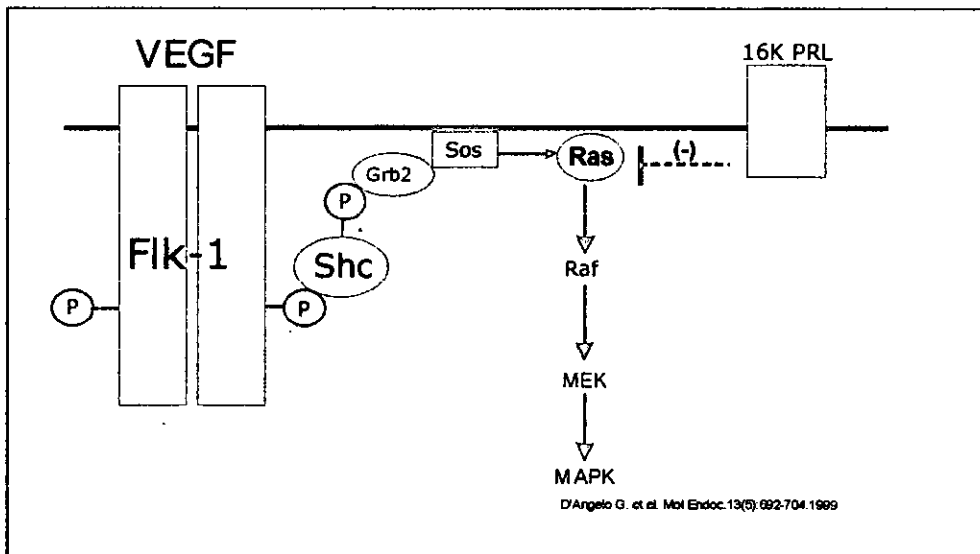


Fig. 6. Vía de señalización propuesta para la acción inhibitoria de PRL 16K sobre la activación de Ras inducida por VEGF.²⁷

El hecho de que los efectos inhibitorios de la angiogénesis ocurran en respuesta al fragmento de 16K de la PRL mas no por efecto de la PRL completa (23K), sugirió la posible participación de receptores distintos a los receptores clásicos para PRL.

4. Receptores a PRL 16K en células endoteliales

Evidencias directas apoyan la existencia de un receptor específico para la PRL 16K en membranas de células endoteliales.²⁸ Estas evidencias se basan en ensayos con PRL 16K marcada isotópicamente que muestran su unión específica, saturable y de alta afinidad a membranas aisladas de células endoteliales. Como era de esperarse, la PRL íntegra que no tiene efectos directos sobre el endotelio, no compitió por este sitio de unión. Tampoco lo hizo la hormona de crecimiento humana (hGH) que es lactogénica y capaz de activar a los receptores clásicos de PRL, ni el bFGF. Sin embargo, dos proteínas que comparten una homología del 40% en su secuencia primaria con la PRL, la proliferina (PLF) y la proteína relacionada con proliferina (PRP) compitieron por la unión de PRL 16K marcada.²⁸ Estos hallazgos dieron pie para demostrar que tanto la PLF como la PRP tienen acciones sobre la angiogénesis.²⁹ Estas acciones son opuestas, la PLF estimula y la PRP inhibe la migración de células endoteliales en cultivo y la angiogénesis *in vivo*.²⁹ Por otra parte la PRL 23K marcada isotópicamente no se unió a membranas de células endoteliales ²⁸ y no se tienen evidencias de la expresión del receptor clonado de la PRL en los endotelios donde se han examinado los efectos a través de la PRL 16K ²⁸ (Clapp y Kelly, resultados no publicados).

El hecho de que la PRL 16K inhibe la angiogénesis a través de un receptor nuevo presente en el endotelio, apoya la posible participación de esta hormona en el control normal de este proceso. Sin embargo, esta hipótesis requiere de la demostración de la presencia endógena de este fragmento de PRL.

5. PRLs endógenas con efectos sobre la angiogénesis

Se ha observado que la PRL cortada, precursor de la PRL 16K se encuentra en la hipófisis anterior y en la circulación de diversas especies incluida la humana.³⁰ Se propuso a la catepsina D como la enzima responsable de la generación de la PRL cortada debido a que esta enzima corta a la PRL en el sitio esperado (tirosina 145 y leucina 145) ya que el inhibidor de la enzima, pepstatina A, evita dicho corte.²⁰ La catepsina D es una proteasa de aspártico presente en los lisosomas y que si bien algunas evidencias sugieren su posible regulación y secreción diferencial el consenso es que opera en todos los tejidos de acuerdo a la disponibilidad del sustrato. Sin embargo, evidencias experimentales han permitido plantear que la enzima que corta a la PRL puede ser regulada. Estas evidencias muestran que la actividad de la enzima varía entre diferentes tejidos y es función de su estado fisiológico.³⁰ Por ejemplo, la actividad enzimática que corta PRL de glándulas mamarias de ratas lactantes, es mayor a la de ratas vírgenes.³⁰ Más aún, el tratamiento con estrógenos reduce la actividad de corte de PRL por extractos neurohipofisarios.³¹

En apoyo al procesamiento natural de PRL hacia PRL 16K, la técnica de Western blot permitió la detección de PRL 16K en la hipófisis anterior y en la circulación de diversas especies.³² Adicionalmente, Se observó que otros fragmentos de PRL pueden poseer efectos antiangiogénicos. Mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra la PRL 16K se detectó la presencia de un fragmento de PRL de 14 kDa en el sistema hipotálamo-neurohipofisario.³³⁻³⁵ El sistema hipotálamo-neurohipofisario está constituido por neuronas localizadas en dos núcleos del hipotálamo anterior, el supraóptico y el paraventricular y sus proyecciones neuronales en la neurohipófisis. Este sistema secreta un amplio número de péptidos con diversas acciones reguladoras, dentro de los que se destacan las neuro-hormonas vasopresina y oxitocina. En estas neuronas se demostró la expresión del ARN mensajero de la PRL y su traducción hacia proteínas de 23 y de 14 kDa.³⁴ La PRL 14K es la forma predominante, se encuentra en gránulos de secreción y es liberada al medio de cultivo de explantes

neurohipofisarios mediante un mecanismo dependiente de calcio.³⁴ Además de compartir determinantes antigénicos con la PRL 16K, la PRL 14K comparte sus efectos antiangiogénicos. Medios condicionados por neurohipófisis en cultivo, enriquecidos con la PRL 14K, inhiben la proliferación de las células endoteliales y su efecto se neutraliza con anticuerpos anti-PRL 16K.³¹ Estos hallazgos, permitieron proponer al sistema hipotálamo neurohipofisario como una fuente a la circulación de prolactinas con propiedades antiangiogénicas. En franca concordancia con esta propuesta, se encontró que una proteína de 14 kDa con inmunoreactividad de PRL, está presente en el suero de la rata.³⁴

La idea de que las PRLs pueden ser inhibidores sistémicos de la angiogénesis no es inesperada. Se conocen varios fragmentos de proteínas con efectos inhibitorios de la angiogénesis que se encuentran presentes en la circulación. Ejemplo de esto, son la endostatina y la angiostatina, fragmentos de 20 kDa y de 38 kDa de la colágena y del plasminógeno, respectivamente.^{36,37} Estas proteínas se han implicado en el control sistémico de la neovascularización tumoral.

La angiogénesis es un evento que ocurre localmente y no en forma generalizada, y como se mencionó obedece en gran medida a factores producidos por las células de la vecindad del capilar e incluso por las propias células endoteliales. Evidencias recientes muestran que las células endoteliales producen PRL y en algunos casos sus fragmentos antiangiogénicos.³⁸⁻⁴⁰

6. Prolactina endotelial

Estudios recientes mostraron que células endoteliales de diversos lechos vasculares y de diferentes especies expresan el ARN mensajero de PRL y lo traducen hacia proteínas de distintos pesos moleculares. Por ejemplo la células endoteliales derivadas de capilares de cerebro bovino en cultivo expresan no sólo el ARN mensajero que codifica para la PRL nativa de 23 kDa, sino también un transcrito aproximadamente 100 pares de bases más corto cuya secuencia denota

la delección del tercer exón, sin alteración del marco de lectura.³⁸ La traducción de este transcrito predice una proteína de 21 kDa. En concordancia con estos transcritos las células endoteliales bovinas sintetizan y secretan PRLs inmunoreactivas cuyos pesos moleculares aparentes son de 23, 21 y 14 kDa y que podrían corresponder a la PRL nativa de 23 kDa, a la PRL de 21 kDa, producto de traducción del transcrito con delección en el tercer exón y a un fragmento de 14 kDa de la PRL, similar al detectado en la neurohipófisis.³³ Estos hallazgos son consistentes con la idea de que las PRLs endoteliales podrían estimular en forma autócrina la angiogénesis.

Cabe notar que no sucede lo mismo en células endoteliales de diferentes especies y/o lechos vasculares. Si bien células endoteliales derivadas de la vena umbilical humana también expresan el ARN mensajero para la PRL nativa y el transcrito de 100 pares de bases menor, las PRLs generadas e incluyen proteínas de 60 y 16 kDa además de las de 23, 21 y 14 kDa. Interesantemente la incubación de estas células con anticuerpos anti-PRL que reaccionan exclusivamente con la proteína de 16 kDa estimularon la proliferación celular.³⁸ Es posible que la estimulación por estos anticuerpos fuera consecuencia de la neutralización de PRL 16K secretada por las células endoteliales humanas. Otro endotelio que presenta diferencias en relación a la PRL es el proveniente de capilares de la retina de la rata. Estas células solamente expresan el ARN mensajero que codifica para la PRL de 23 kDa y lo traducen hacia grandes cantidades de esta PRL y no hacia otras isoformas de la hormona.⁴⁰

En resumen, todas estas evidencias han permitido proponer que las PRLs podrían participar en la regulación de la angiogénesis tanto, sistémicamente a manera de hormonas como, localmente a manera de citocinas. La pregunta al respecto es si estas PRLs endógenas contribuyen a la regulación de la angiogénesis. Estudios previos, ampliados en esta tesis apoyan la hipótesis de que PRLs con efectos antiangiogénicos participan en el control de la avascularidad de tejidos como los presentes en la córnea.^{24,25}

III. ANTECEDENTES INMEDIATOS

El cartílago y la córnea están conformados por tejidos que en condiciones normales son avasculares. Se ha propuesto que la ausencia de vasos sanguíneos en estos tejidos se debe a la sobreproducción y/o mayor efecto de factores inhibidores sobre los estimuladores de la neovascularización.⁴¹ Así, tanto el cartílago como la córnea, constituyen sitios donde poner de manifiesto la acción de inhibidores de la angiogénesis, en particular de fragmentos de PRL. En este sentido la córnea presenta ventajas para este análisis ya que es un órgano externo y transparente y de fácil abordaje experimental. De hecho la inducción de angiogénesis en la córnea en respuesta a la aplicación de implantes conteniendo factores angiogénicos ha hecho de la córnea uno de los bioensayos de angiogénesis *in vivo* más empleados.⁴² En este ensayo se demostró que la PRL 16K inhibe el efecto angiogénico del bFGF.^{24,25}

1. Prolactina y angiogénesis ocular

La inhibición del efecto angiogénico del bFGF por la PRL 16K sugiere que este fragmento de PRL pudiese participar en el control de la avascularidad de la córnea. Para analizar esta posibilidad se trataron corneas con anticuerpos anti-PRL con el propósito de inmunosequestrar PRLs locales se investigó si este procedimiento inducía una respuesta angiogénica local. En todos los casos, anticuerpos policlonales anti-PRL capaces de reaccionar tanto con la PRL 23K como con la PRL 16K, produjeron una respuesta angiogénica que fue significativamente mayor a la de los grupos controles utilizando anticuerpos preinmunes o proteínas no específicas.²⁴⁻²⁵ Estos hallazgos sugirieron que PRLs con efectos antiangiogénicos podrían estar presentes en la córnea.

La presencia de PRL en córnea no es del todo inesperada. Desde 1986 Frey y colaboradores mostraron la presencia de PRL inmunorreactiva en las lágrimas y

en la glándula lacrimal, y más recientemente mostraron que el epitelio lacrimal produce y secreta PRL.⁴⁵⁻⁴⁷ De hecho, se ha propuesto que la PRL puede actuar como regulador local del volumen y composición iónica de las lágrimas. Por ejemplo el epitelio lagrimal expresa receptores a PRL y la PRL regula la actividad de la ATPasa Na⁺,K⁺ en dicho epitelio y el volumen de agua de las lágrimas.⁴⁵⁻⁴⁸ Dada la presencia de uniones estrechas “tight junctions” entre las células del epitelio corneal, la internalización de la PRL lagrimal en la córnea debería operar vía un mecanismo activo de transporte a través del epitelio corneal, como por ejemplo, la endocitosis mediada por receptor.

2. Trastornos clínicos de neovascularización de la retina

La posibilidad de que la PRL forme parte de los factores que regulan la angiogénesis podría tener grandes repercusiones en la clínica. La angiogénesis ocular es la causa más frecuente de ceguera en el mundo. Una sobreproducción anormal de vasos sanguíneos en la retina ocurre en padecimientos tales como la retinopatía diabética, la degeneración macular asociada con la edad y la retinopatía del prematuro, entre otras. La angiogénesis intraocular parece resultar de la acción de factores angiogénicos inducidos por hipoxia. La hipoxia es uno de los estímulos más potentes para inducir angiogénesis.^{49,50} Entre los factores angiogénicos inducidos por hipoxia se encuentran el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento 1 tipo insulina (IGF-1).^{51,52} La hipoxia puede originarse de alteraciones en la concentración de oxígeno ambiental (retinopatía el prematuro) o de una reducción del flujo sanguíneo en la microcirculación de la retina (retinopatía diabética). En todos los casos la hipoxia resulta en la formación de nuevos vasos que invaden la retina y el humor vítreo. Los neovasos son muy permeables, generan edema y atraen células vecinas involucradas en la formación de tejido fibroso que con el tiempo puede ocasionar el desprendimiento de la retina y la pérdida total de la visión.⁵⁴

En la retinopatía diabética además de la isquemia característica de pacientes diabéticos se han propuesto causas adicionales para la hipoxia. Por ejemplo, se ha observado que en pacientes con diabetes mellitus una proporción importante de la hemoglobina se encuentra glicosilada y que este cambio interfiere con su capacidad de transportar oxígeno.⁵¹ La incidencia de retinopatía vaso-proliferativa en diabéticos es alta y se incrementa con los años del padecimiento. Así, se ha observado que este padecimiento se presenta en el 99% de los pacientes diabéticos insulino-dependientes con 20 años de enfermedad y que el 66% de diabéticos no insulino-dependientes poseen algún grado de retinopatía vasoproliferativa.⁵⁴

Otro trastorno de neovascularización ocular que es de alto impacto en países subdesarrollados, si bien no lo es en países del primer mundo, es la retinopatía del prematuro. Este padecimiento se presenta en infantes prematuros a consecuencia de su exposición a niveles variables de oxígeno cuando son puestos dentro de la incubadora. En el 10% de los prematuros, el endotelio reacciona a los cambios en las presiones de oxígeno generando angiogénesis. Al igual que en los pacientes diabéticos los nuevos capilares invaden y sangran hacia la cavidad del vítreo produciendo un tejido fibroso que eventualmente desprende la retina.⁵⁰ La fotocoagulación temprana de neovasos evita el padecimiento, sin embargo este tratamiento no siempre es posible en nuestros países por lo que la mayoría de estos niños pierden la visión.⁵⁰⁻⁵⁴

Los padecimientos mencionados permiten destacar el enorme interés que el entendimiento de la regulación de la angiogénesis ocular ha despertado en los últimos años y la justificación de identificar nuevos factores implicados en la regulación de este proceso.

HIPÓTESIS

General:

Las prolactinas se producen intraocularmente y funcionan como reguladores de la angiogénesis ocular.

Pariculares:

1. Isoformas de PRL con efectos antiangiogénicos se expresan en la córnea y en otros tejidos y fluidos oculares.
2. La PRL del ojo se origina extraocularmente a partir de la PRL lagrimal y/o sistémica.

OBJETIVOS

Analizamos las hipótesis propuestas utilizando el bioensayo de angiogénesis en la córnea de la rata y evaluando biopsias de tejidos y fluidos oculares obtenidos de ratas y de pacientes con retinopatía el prematuro sometidos a cirugía ocular. Nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Determinar si al igual que anticuerpos anti-PRL policlonales, anticuerpos anti-PRL monoclonales inducen angiogénesis en la córnea.
2. Determinar la presencia y peso molecular aparente de PRLs inmunorreactivas en tejido y fluidos oculares.
3. Determinar si el receptor de PRL está presente en el epitelio de la córnea y por lo tanto si este mecanismo podría mediar la internalización a la córnea de la PRL lagrimal.
4. Analizar la posible correlación entre los niveles circulantes de PRL y los niveles de la hormona medidos en los fluidos oculares.
5. Investigar la expresión del ARN mensajero de PRL en tejidos oculares.

HIPÓTESIS

General:

Las prolactinas se producen intraocularmente y funcionan como reguladores de la angiogénesis ocular.

Pariculares:

1. Isoformas de PRL con efectos antiangiogénicos se expresan en la córnea y en otros tejidos y fluidos oculares.
2. La PRL del ojo se origina extraocularmente a partir de la PRL lagrimal y/o sistémica.

OBJETIVOS

Analizamos las hipótesis propuestas utilizando el bioensayo de angiogénesis en la córnea de la rata y evaluando biopsias de tejidos y fluidos oculares obtenidos de ratas y de pacientes con retinopatía el prematuro sometidos a cirugía ocular. Nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Determinar si al igual que anticuerpos anti-PRL policlonales, anticuerpos anti-PRL monoclonales inducen angiogénesis en la córnea.
2. Determinar la presencia y peso molecular aparente de PRLs inmunorreactivas en tejido y fluidos oculares.
3. Determinar si el receptor de PRL está presente en el epitelio de la córnea y por lo tanto si este mecanismo podría mediar la internalización a la córnea de la PRL lagrimal.
4. Analizar la posible correlación entre los niveles circulantes de PRL y los niveles de la hormona medidos en los fluidos oculares.
5. Investigar la expresión del ARN mensajero de PRL en tejidos oculares.

MATERIALES Y METODOS

- Animales y Toma de muestras

Ratas macho Wistar entre 200 y 250 g de peso, fueron sacrificadas por decapitación, previa anestesia con CO₂. Los ojos se enuclearon y el humor acuoso ($\approx 6\mu\text{l}$) se obtuvo mediante punción a través de la córnea utilizando una jeringa tipo insulina. Posteriormente con la ayuda de un microscopio estereoscópico se disectaron la córnea, el iris y la retina. Los tejidos y fluidos oculares se agruparon en pools de 10 ratas.

- Pacientes con Retinopatía del Prematuro

Todas las biopsias pertenecieron a pacientes con retinopatía del prematuro grado 4-5, los grados más altos de esta patología que necesariamente deben ser sometidos a cirugía.⁵⁴ Estos pacientes se caracterizan por presentar un tejido fibroso muy vascularizado en la cámara del vítreo.

Como parte de la cirugía ocular se requiere extraer el humor acuoso, la membrana fibrosa del vítreo y el líquido subretiniano. Este último es un dializado del vítreo que se acumula en el espacio entre la coroides y la retina, que si bien es un espacio virtual en el feto, en estos niños se vuelve real por la acumulación del fluido. Las biopsias de estos tejidos y fluidos, así como del suero fueron congeladas inmediatamente.

1. Bioensayo de angiogénesis

Como parte de la tesis de maestría se estableció el bioensayo de angiogénesis de la córnea de rata de acuerdo al método reportado.⁵⁵ Las sustancias a

bioensayar se incluyen en el polímero hydron (2-poli-hidroxil-etilmetacrilato, Interferon Sciences, Inc., New Brunswick, NJ). Las muestras se prepararon bajo condiciones estériles disolviendo el polímero en 95% de etanol (12% p/v) a temperatura ambiente. Volúmenes iguales de hydron y de la muestra (anticuerpos) fueron combinados en superficies estériles y mantenidos a 4° C. Cada pellet se cortó en 8 porciones de aproximadamente 0.5 mm².

Bajo el estereoscopio 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 promedio de 1 mm entre la esclerótica y la córnea del ojo. Una vez hecho el saco, con la ayuda de unas pinzas finas, se colocó 1/8 del implante hasta el fondo del saco adhiriendo el borde exterior para que el saco sellara nuevamente.

2. Procesamiento de córneas

Seis días después de hecho el implante, las ratas se sacrificaron y se procedió a enuclear los ojos para fijarlos durante 1 hora en 4% paraformaldehído y 1.5% glutaraldehído en amortiguador de fosfatos (PBS 0.1 M, pH 7.4). Una vez disecadas las córneas, se tiñó la red capilar haciendo reaccionar la peroxidasa endógena de los eritrocitos contenidos en los capilares con de 0.05% de diaminobencidina y 0.01% de peróxido de hidrógeno en PBS 1 M (31). Esta reacción da una coloración café donde se localizan los eritrocitos, y permite visualizar la red capilar. Posteriormente se deshidrató el 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 Entellan (Merck) y se cubrieron con un cubre-objetos.

3. Análisis y fotografía

Las preparaciones se observaron bajo un microscopio estereoscópico (Nikon-Fx-45 WA) y se capturaron y digitalizaron las imágenes de las córneas evaluadas mediante el programa de análisis de imágenes (Image INH ver. 1.62, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Para este análisis 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 se incrementó en presencia de vascularización.

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

a. 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.

b. que los valores de absorbancia positivos correspondieran cuando menos al doble de los valores obtenidos para los respectivos controles utilizados.

Las diferencias encontradas entre los diferentes grupos se evaluaron mediante la aplicación de pruebas estadísticas apropiadas (ANOVA, t-student, X²), seguidas de comparaciones post-hoc.

4. Homogenizados de Tejidos

Las córneas, iris y retinas de los dos ojos de diez ratas fueron agrupadas y homogenizadas (Politrón 10-35 Beckman Instruments, USA), en amortiguador de lisis (50mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 100 ug/ml PMSF, 1ug/ml aprotinina, pH 8.0) y centrifugadas a 14,000 g durante 30 minutos. Los sobrenadantes se filtraron y concentraron en centricones de 3,000 y 100,000 de corte molecular para eliminar las proteínas de altos y bajos pesos moleculares, respectivamente. Las muestras se cuantificaron mediante el método descrito por Bradford ⁵⁶ y se analizaron en geles de poliacrilamida al 12 %bajo condiciones

desnaturalizantes y reductoras (5% mercapto-etanol, SDS-PAGE) de acuerdo al método descrito.⁵⁷

5. Western blot:

Se utilizó el método descrito.⁵⁶ Brevemente, los geles se equilibraron durante 10 min en buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% metanol), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 40 V y 4°C durante toda la noche. Las membranas se bloquearon en 2% BSA y 0.05% Tween-20 en PBS durante 1 h y posteriormente se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario correspondiente, policlonal (C-4, 1:500) y monoclonal (INN-1 1:500), anti PRL. Ambos anticuerpos son dirigidos contra la PRL íntegra de 23 kDa. El anticuerpo policlonal C-4 fue generado por nuestro laboratorio en el conejo y caracterizado previamente ^{ref} El anticuerpo monoclonal fue donado por el Dr. Peter Berger (Institute for Biomédica Aging Research, Austrian Academy of Sciences, Innsbruck, Austria) y caracterizado previamente ^{ref} Los anticuerpos se lavaron 3 veces con 0.9 % NaCl y 0.05 % Tween-20 en PBS durante 5 min y se incubaron por 1 h con segundos anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina. Finalmente las membranas se lavaron y se reveló la presencia de proteínas tipo PRL utilizando el sustrato de fosfatasa alcalina y los reactivos de un estuche comercial de acuerdo a las instrucciones del proveedor (AP Conjugate Substrate Kit, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA. USA).

6. Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para PRL humana

Este ensayo se realizó utilizando un estuche comercial (*Genzyme Diagnostics, San Carlos, CA. USA*).

7. Inmunocitoquímica (ICQ)

- Córneas

Los ojos se fijaron en 4% paraformaldehído y 1.5% glutaraldehído en buffer de fosfatos (PBS). Posteriormente se transfirieron a una solución 30% sacarosa en PBS hasta su saturación. Las córneas fueron disectadas, incluidas en un Tissue Teck (OCT-Miles Inc. Elkhart, IN) y congeladas inmediatamente. Cortes de 10 μm obtenidos en el criostato, fueron colocados en laminillas cubiertas con vectabond (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) y se incubaron con 30% de peróxido de hidrógeno en metanol, durante 30 min para bloquear la peroxidasa endógena. Asimismo, para bloquear posibles sitios de unión inespecíficos, los cortes se incubaron en 10% BSA, 3% de suero normal de cabra (NCS), 0.5% Tritón X-100 en PBS durante 2 h. Posteriormente los cortes fueron incubados con anticuerpos monoclonales anti-receptor de PRL (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), diluidos en 0.5% Tritón X-100 en PBS, durante toda la noche, en atmósfera húmeda y a temperatura ambiente. Se utilizaron anticuerpos donados por el Dr. Paul A. Kelly (Institut National de la Santé et de la Recherché Médicale U-344, Paris, Francia), que están dirigidos contra la porción del receptor que une (T_4 y T_6) y que no une (U_5 y U_6) a la PRL y que han sido caracterizados previamente.⁵⁸

Las laminillas fueron lavadas e incubadas por una hora con segundos anticuerpos anti-IgG de ratón biotinilados y subsecuentemente incubados 1 h con el complejo biotina-avidina acoplado a peroxidasa también a temperatura ambiente de acuerdo a las instrucciones de los proveedores (Vectastain Kit ABC, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). La unión de los anticuerpos anti-receptor fue revelada con 0.05% diaminobencidina (DAB) y 0.015% de peróxido de hidrógeno en PBS durante 3-4 min. Los cortes se deshidrataron, se montaron con Entellan (Merck KGaA Darmstadt, Germany) y se cubrieron con un cubreobjetos.

**- Células del epitelio externo (CEpCR) e interno (CEnCR)
de la córnea**

Las células de los epitelios externo e interno de la córnea de la rata se aislaron de acuerdo a los métodos descritos.^{59,60} Las células del epitelio interno de 10 ratas fueron desprendidas y colocadas en cajas para cultivo celular de 35 mm, que contenían medio de cultivo Eagles's MEM, complementado con 20% de suero fetal de ternera, 50 ug/ml de gentamicina y 5% de penicilina-streptomocina. Posteriormente, las mismas córneas fueron tratadas con colagenasa/disypasa (1.0 U/ml en solución HANK's) durante una hora para desprender completamente las células del epitelio externo. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio D-MEM/F12 complementado con 10% de suero fetal bovino, 10 ug/ml de insulina, 15 mM de HEPES, 1 ug/ml de hidrocortisona, 50 ug/ml de gentamicina y 5% de penicilina-streptomocina. Para estimular la proliferación celular se les adicionó bFGF (1 ng/ml).⁶¹ Las células se caracterizaron con base en su morfología, su capacidad para formar monocapas y su inmunoreactividad a anticuerpos anti-queratina. Para este último criterio se utilizaron técnicas de inmunocitoquímica similares a las ya descritas y un anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina (Monoclonal Anti-Pan Cytokeratin, Sigma). Este anticuerpo reconoce un amplio espectro de citoqueratinas de diversos epitelios normales, neoplásicos de humano, rata, bovino, sapo y se utiliza también para caracterización de cultivos de líneas celulares epiteliales.

8. Retrotranscripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

El RNA total de los distintos tejidos y células en cultivo se extrajo de acuerdo al procedimiento de tiocianato de guanidina y fenol.⁶² El RNA (5 ug) fue retrotranscrito (RT) durante 1 h a 37 °C en 25 ul de buffer (20 mM Tris, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, pH 8.3), conteniendo 1 mM de dNTPs, 1 ug de cada cebador oligo (dT), 1 ug de un cebador inespecífico (random primer), 25 unidades de Rnasina (Promega) y 200 unidades de retrotranscriptasa (proveniente del virus de

leucemia murina Moloney). El PCR se realizó en 50 ul de buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, pH 8.3), con 200 uM de cada dNTP, 50 pMol de cada cebador, y una unidad de Taq ADN polimerasa. El proceso de desnaturalización se llevó a cabo a 97 °C por 30 seg. La amplificación fue por 40 ciclos (a 94 °C por 30 seg, a 65°C por 1 min, a 72 °C 1.5 min y a 71 °C por 10 min). Los cebadores para la amplificación del ADN complementario de la prolactina de rata corresponden al exón 2 para el extremo 5' (5'-TGTTCTGGTGGCGACTGC-CAGACACCT-3') y al exón 4 para el extremo 3' (5'-TATCTTTTCGATCCCTTCGAGAAGCCG-3'). Utilizando estos cebadores el producto esperado del PCR es de 480 pb.

Las mismas condiciones de la RT-PCR fueron utilizadas para retrotranscribir y amplificar el ARN mensajero de la PRL humana de membranas fibrosas de ojos de pacientes con retinopatía del prematuro. En este caso se aisló el RNA total de las membranas fibro-vasculares de los pacientes sometidos a cirugía y se utilizaron dos cebadores específicos para el ADN complementario de PRL humana. El cebador del extremo 5' correspondió al exón 2 del gen de la prolactina (5'-GCAGTT-GTTGTTGTGGATGATT-3') y el del extremo 3' corresponde al exón 5 (5'-GATGCCAGGTGACCCTTCGAGA-3'). Con estos cebadores el producto esperado de la amplificación es de 560 pb.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 6 se esquematiza la anatomía del ojo y la histología de la córnea. Como se puede apreciar la córnea está constituida por varias capas de un epitelio externo, un estroma rico en colágena y una única capa de células epiteliales internas, también conocido como endotelio corneal.

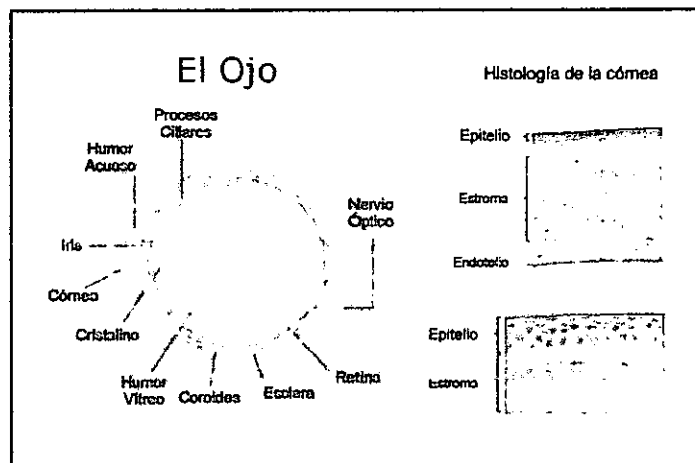


Fig. 6 Esquema de la anatomía del ojo y la histología de la córnea

1. Efecto de anticuerpos monoclonales anti PRLs sobre la neovascularización de la córnea.

Estudios previos mostraron que implantes con anticuerpos policlonales anti-PRL en el estroma de la córnea, inducen una respuesta angiogénica local.^{24,25} Como parte de esta tesis documentamos estos hallazgos utilizando anticuerpos monoclonales anti-PRL. Los anticuerpos monoclonales fueron dirigidos contra la PRL 23K y reconocen tanto a esta PRL como a la PRL 16K, como lo muestra el Western blot que revela a las PRL 23K y 16K utilizando este anticuerpo. (Fig. 7).

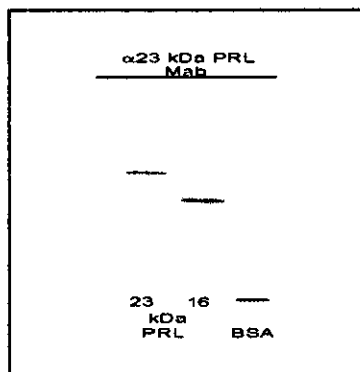


Fig 7. Western blot revelado con el anticuerpo monoclonal anti PRL 23K (α .23 kDa PRL Mab, INN-I) Como se puede apreciar este anticuerpo reconoce los estándares de PRL 23K y PRL 16K y no a una proteína inespecífica como la albúmina (BSA).

El efecto de estos anticuerpos sobre la neovascularización de la córnea se evaluó a través de cuantificar el área capilar asociada a los implantes. El área capilar se determinó mediante un sistema de análisis de imágenes que permite determinar la densidad óptica asociada a la tinción de los capilares. Se consideraron como respuestas angiogénicas positivas, aquellas en las que los valores fueron dos veces o más los observados en el grupo control de anticuerpos inmunes. De acuerdo a este criterio se evaluó la incidencia de angiogénesis, definida como el número de casos positivos con respecto al total de casos analizados. Finalmente se determinó el número de vasos largos que invadían el implante. En la figura 8 se muestra un caso representativo que ilustra la respuesta angiogénica del anticuerpo monoclonal, que fue claramente mayor a la angiogénesis inducida por anticuerpos preinmunes de ratón. La córnea control conteniendo el implante sin proteína no mostró respuesta angiogénica. Las diferencias fueron evaluadas para un grupo grande de casos y se encontró que los anticuerpos anti-PRL indujeron una respuesta significativamente mayor que los anticuerpos preinmunes en los tres parámetros evaluados: densidad óptica del área capilar, incidencia de angiogénesis y número de vasos sanguíneos (Fig.9). Es claro sin embargo que los anticuerpos preinmunes produjeron algo de

angiogénesis con respecto al control, si bien este nivel solo fue significativo cuando se evaluó la incidencia de angiogénesis (Fig.9). Para descartar un proceso inflamatorio asociado a la interacción antígeno-anticuerpo, se bioensayaron implantes conteniendo albúmina en combinación con un anticuerpo monoclonal anti-albúmina. El complejo albúmina-anti-albúmina no produjo respuestas angiogénicas significativas en ninguno de los parámetros utilizados (resultados no mostrados).

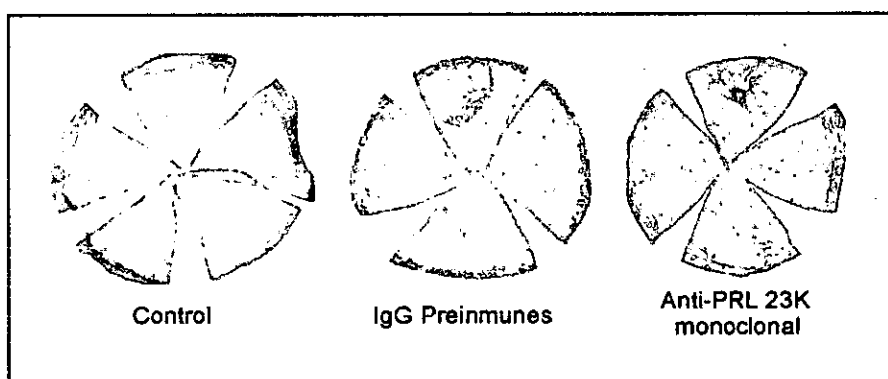


Fig. 8 Inducción de angiogénesis en la córnea por anticuerpos monoclonales anti-PRL. Casos representativos de las respuestas obtenidas al implantar el vehículo sólo, 2 μ g de IgG's preinmunes de ratón o 2 μ g del anticuerpo monoclonal anti-PRL (α PRL Mab INN-I).

Estos resultados corroboran los hallazgos utilizando anticuerpos policlonales anti-PRL y por lo tanto apoyan la presencia de PRLs antiangiogénicas en la córnea. Dado que en todos los casos los anticuerpos reconocen al menos dos isoformas de la hormona (PRL 23K y 16K), no podemos concluir cual es la naturaleza de las PRLs involucradas. Sin embargo la PRL 16K es un posible candidato ya que sus efectos antiangiogénicos se encuentran ampliamente documentados.^{17,21,22}

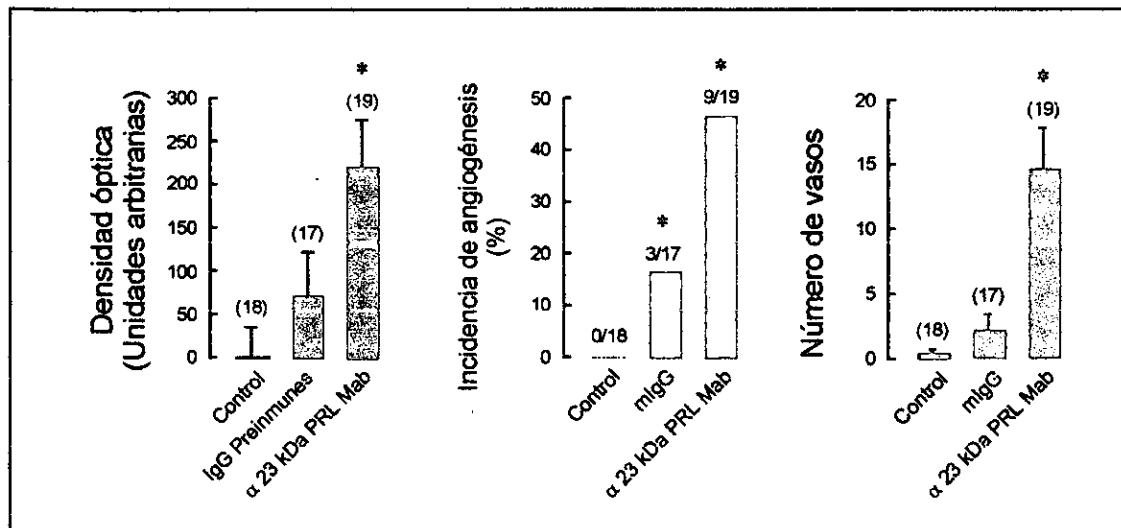


Fig. 9. Parámetros utilizados para evaluar la inducción de angiogénesis en las córneas, por implantes conteniendo sólo el vehículo (control), 2 µg de IgGs preinmunes o con el anticuerpo monoclonal anti-PRL INN-I (α PRL Mab INN-I). * p < 0.05 vs. Control.

2. Inmunoreactividad de PRLs en córnea, iris, retina y humor acuoso de rata.

Con el propósito de determinar si la PRL 16K está presente en la córnea se agruparon y homogenizaron córneas de diez ratas y se analizaron en Western blots utilizando los mismos anticuerpos policlonales y monoclonales anti-PRL empleados en el bioensayo de angiogénesis en córnea.⁵⁵ La figura 10 muestra los resultados obtenidos en un pool representativo de córneas, iris, retina y humor acuoso de las mismas ratas. En estos compartimentos oculares los anticuerpos policlonales anti-PRL detectaron proteínas inmunorreactivas con pesos moleculares aparentes de 23, 21 y 16 kDa, a excepción del humor acuoso donde solamente se apreciaron proteínas de 23 y 25 kDa.

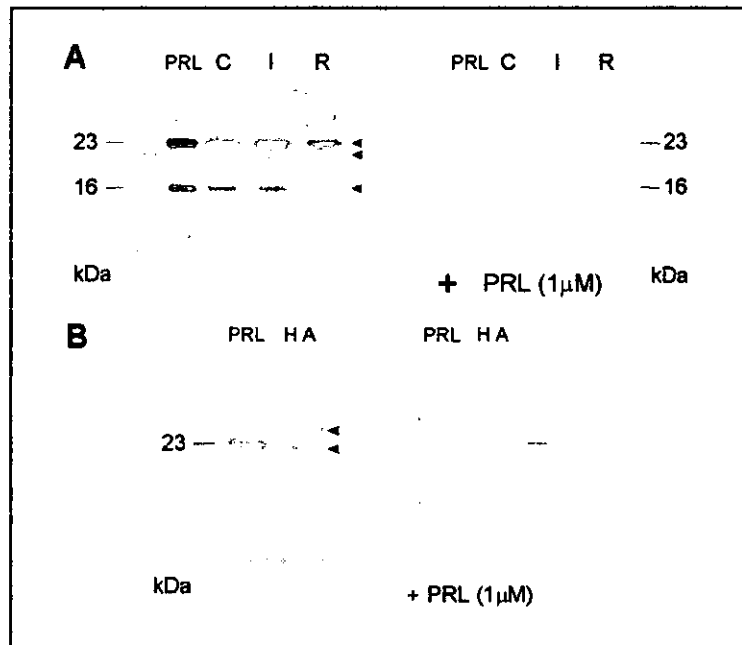


Fig. 10. Casos representativos de los Western blots revelados con el anticuerpo policlonal anti-PRL. Homogenados de córnea (C), iris (I) y retina (R) muestran proteínas inmunorreactivas tipo PRL (►) cuyos pesos moleculares aparentes son 23, 21 y 16 kDa (A). En el humor acuoso (HA) las proteínas inmunorreactivas (►) son de 25 y 23 kDa. La especificidad de las proteínas se demostró con la ausencia de inmunotinción al preabsorber los anticuerpos con $1\mu\text{M}$ de PRL exógena. Una mezcla de los estándares de PRL 23K y 16K se utilizó como referencia.

En apoyo a la especificidad de la reacción la preabsorción de los anticuerpos con $1\mu\text{M}$ de PRL evitó la detección de dichas proteínas. Mas aún, el anticuerpo monoclonal INN-1 reaccionó con las mismas proteínas de 23, 21 y 16 kDa en los tejidos oculares, pero no con la de 25 kDa en el humor acuoso. Otra vez la preabsorción con PRL exógena evitó la reacción de este anticuerpo (Fig.11).

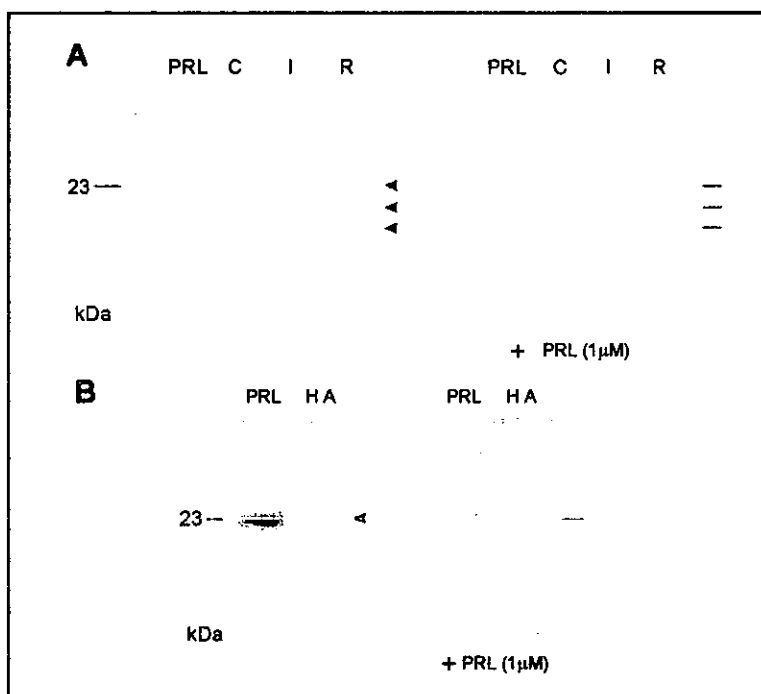


Fig. 11. Casos representativos de los Western blots revelados con el anticuerpo monoclonal anti-PRL INN-I (α PRL Mab INN-I). Homogenados de córnea (C), iris (I) y retina (R) muestran bandas inmunorreactivas (\triangleright) tipo PRL cuyos pesos moleculares aparentes son 23, 21 y 16 kDa. En el humor acuoso (HA) se observó solo una banda inmunorreactiva de 23 kDa, que tampoco se observa al preabsorberla con PRL exógena (B). PRL estándar se utilizó como referencia. La especificidad de las bandas se demostró con la preabsorción de dichas bandas utilizando 1 μ M de PRL exógena

Con base en los pesos moleculares aparentes, las proteínas inmunoreactivas podrían corresponder a la PRL íntegra (23K) y al fragmento amino-terminal de 16 kDa (PRL 16K). La proteína de 21 kDa es similar a la PRL 21K que se describió, secretada por el endotelio en cultivo.^{38,39} Esta PRL endotelial de 21 kDa se ha propuesto que podría corresponder al producto de traducción de un ARN mensajero de PRL con delección del tercer exón, también presente en los endotelios³⁸. La proteína de 25 kDa podría corresponder a una PRL glicosilada. La PRL puede ser glicosilada en el residuo de asparagina en la posición 31, migra con un peso molecular de 25 kDa.^{63,65} Alternativamente, la proteína de 25 kDa detectada en el humor acuoso podría corresponder a una variante no glicosilada similar a la previamente detectada en la hipófisis anterior y en el suero de la rata.⁶⁵ Las

modificaciones estructurales de dicha proteína podrían enmascarar el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-PRL utilizado.

Recientemente un ensayo inmunoenzimático (ELISA), corroboró la presencia de PRL ocular.⁶⁶ Este ensayo se estableció en el laboratorio utilizando los mismos anticuerpos policlonales anti-PRL empleados en este estudio y permitió cuantificar PRL en la córnea (1.2 ± 0.3 ng/ μ g de proteína) y en el humor acuoso (33.7 ± 3.2 ng/ml).⁶⁷ Cabe señalar que los niveles de PRL presentes en la córnea son aproximadamente 100 veces menores a los reportados en la hipófisis de ratas macho utilizando el radioinmunoensayo.⁶⁸⁻⁶⁹ Por otra parte llama la atención que los niveles detectados en el humor acuoso son aproximadamente dos veces los detectados en el suero de las mismas ratas.⁶⁷

Es posible que la PRL ocular pudiese provenir al menos en parte de la PRL sistémica. Se ha reportado que la administración sistémica de PRL marcada radioactivamente inyectada por vía intracardial, muestra patrones de incorporación en tejidos oculares que incluyen la retina, la coroides y el cuerpo ciliar, así como también los segmentos internos de los fotorreceptores.⁷⁰ Los mismos autores señalan que la presencia de PRL está asociada a tejidos muy vascularizados en las células adyacentes a los vasos y en las células endoteliales, más no en la luz de los capilares. Sin embargo, no es claro cual sería el mecanismo que permitiría la internalización de la PRL sistémica. En el ojo existe una barrera hematorretiniana, cuyas características funcionales son similares a las de la barrera hematoencefálica y no permiten fácilmente el ingreso de proteínas sistémicas del tamaño de la PRL hacia los fluidos oculares.⁷⁰ En este sentido, para la PRL presente en el líquido cefalorraquídeo se ha propuesto la incorporación activa mediada por su receptor, presente en el plexo coroideo.⁷¹ Comparativamente, la PRL circulante podría incorporarse al humor acuoso vía su receptor presente en las células epiteliales del órgano ciliar. Este órgano es la extensión anterior de la coroides y la retina; está formado por fibras musculares lisas, dos capas de epitelios y una red vascular en los centros de sus proyecciones, que se denominan procesos ciliares. Este órgano es equivalente al

plexo coroideo y juega un papel determinante en la regulación de la composición del humor acuoso.⁷² Nuestros estudios preliminares mediante inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-receptor de PRL (U₅) han logrado determinar la presencia del receptor de PRL a lo largo del órgano ciliar (Fig. 12).



Fig.12 Sección del órgano ciliar teñida para inmunocitoquímica con el anticuerpo monoclonal anti-receptor de PRL (U₅) y segundos anticuerpos acoplados a peroxidasa. La marca positiva se asoció al tejido epitelial.

La posible contribución de la PRL sistémica a la PRL ocular podría explicar la presencia de PRL glicosilada en el humor acuoso. En la rata la PRL glicosilada corresponde al 50% de la PRL circulante.^{10,63} Al respecto, la PRL glicosilada también se detecta en otros fluidos orgánicos como la leche^{64,68,69} y el líquido amniótico¹⁰ y si bien reacciona con los anticuerpos anti-PRL, su potencia biológica parece menor. Se requiere investigar la presencia de carbohidratos en esta proteína para poder validar su naturaleza.

Como se mencionó en la introducción de esta tesis, otro posible origen extra-ocular de la PRL es la glándula lagrimal. La PRL se produce en el epitelio lagrimal y se secreta a las lágrimas,⁴³ y dado que las células del epitelio corneal presentan gran cantidad de uniones cerradas (“tight junctions”) que forman una barrera oclusora (“zónula ocludens”), la internalización de la PRL lagrimal al interior de la córnea debiera ocurrir vía un mecanismo activo de transporte, como el propuesto en el órgano ciliar, es decir vía la endocitosis mediada por el receptor. En apoyo a

esta alternativa, los resultados de esta tesis muestran la presencia del receptor de PRL en el epitelio corneal *in situ*.

3. Inmunoreactividad asociada al receptor de PRL en el epitelio corneal

Mediante la técnica de inmunocitoquímica, se observó que el anticuerpo monoclonal U₅ dirigido contra el receptor de PRL marcó positivamente las células epiteliales a lo largo de la córnea (Fig.13). La especificidad de la inmunotinción se corroboró al usar otros tres anticuerpos monoclonales anti-receptor de PRL (U₅, T₁, T₆), que dieron una tinción similar (resultados no mostrados). Asimismo, no se observó tinción positiva al preabsorber el efecto del anticuerpo con una proteína recombinante que corresponde al dominio extracelular del receptor ⁷³ (Fig. 13B), ni en ausencia del anticuerpo primario, (resultado nomostrado) o cuando éste se reemplazó por anticuerpos preinmunes de ratón (Fig.13C).

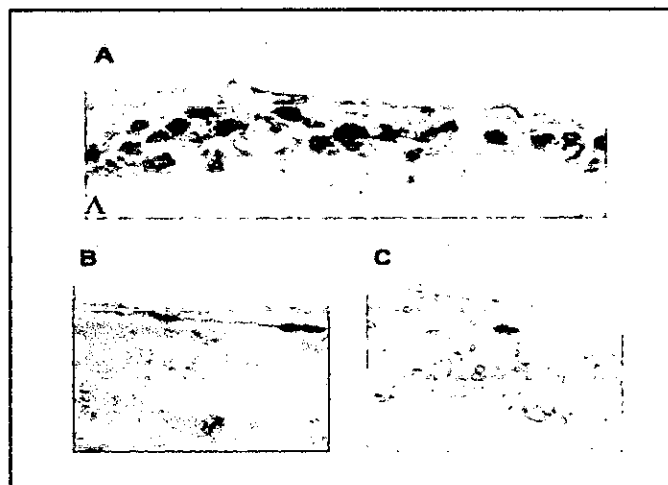


Fig.13 Identificación del receptor de PRL en epitelio corneal de rata, utilizando el anticuerpo anti-receptor U₅ (100µg/ml) y segundos anticuerpos acoplados a peroxidasa (A). En el panel B se muestra la preabsorción de la tinción con una proteína recombinante que corresponde al dominio extracelular del receptor, y en C, utilizando IgG's preinmunes de ratón.

Resultados similares se observaron en células del epitelio externo de la córnea en cultivo. Estas células se aislaron y caracterizaron de acuerdo a su capacidad para formar monocapas (Fig. 14A) y a su reactividad con anticuerpos anti-citoqueratina (resultados no mostrados). En concordancia con el epitelio córneoal *in situ*, éstas células se marcaron positivamente con el anticuerpo monoclonal anti receptor de PRL U₅ (Fig. 14B). Asimismo no se observó inmunotinción al co-incubar el anticuerpo anti- receptor de PRL con el dominio extracelular del receptor de PRL (resultado no mostrado), ni en presencia de anticuerpos preinmunes de ratón (Fig. 14C).

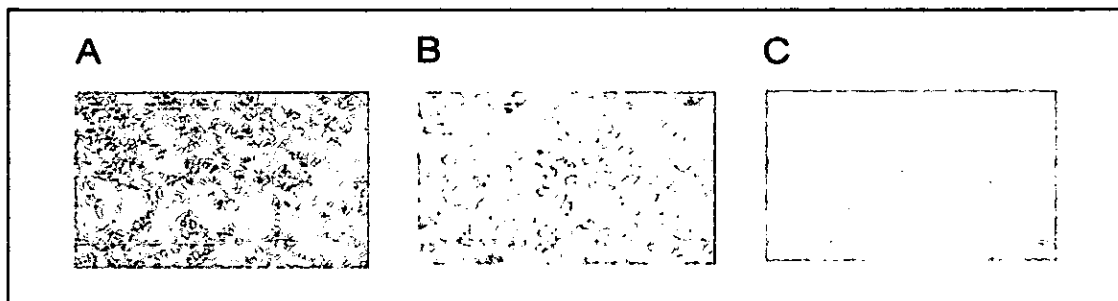


Fig.14 **A** Monocapa de células epiteliales de la córnea en cultivo. **B** Inmunotinción positiva en presencia del anticuerpo anti receptor de PRL U₅. **C** Ausencia de tinción positiva al incubar con IgGs no inmunes.

La presencia del receptor de PRL en células del epitelio corneal es consistente con la posibilidad de que estas células constituyan un blanco de acción de la PRL lagrimal y probablemente de las PRLs presentes en la córnea. Al respecto se ha propuesto que entre sus acciones, la PRL lagrimal podría regular la fisiología de la córnea, la conjuntiva o el tejido linfoide asociado a la conjuntiva.^{45,48}

Por otra parte, la presencia del receptor en el epitelio corneal apoya la posibilidad de que la PRL lagrimal, unida a su receptor pudiera ser internalizada y transportada al interior de la córnea. Al respecto se sabe que la PRL se internaliza en diversas células blanco tales como el epitelio mamario y las células de los folículos ováricos y que este es el mecanismo por el cual la PRL sistémica se incorpora a la leche^{12,13} y al líquido folicular ovárico^{12,13}. Estos hallazgos son en el mejor de los casos sugerentes, y la internalización de la PRL lagrimal deberá ser

investigada por ejemplo, a través de analizar la incorporación de PRL radioactiva al epitelio corneal en estudios *in vivo* ó *in vitro*.

Si bien la PRL en el ojo podría tener un origen extra-ocular (sistémico o lagrimal), también es posible sugerir un origen local a partir de su síntesis por los propios tejidos oculares. Se sabe que la PRL se produce en diversos tejidos extra-hipofisarios que incluyen células dentro del sistema nervioso central, el sistema inmune y tejidos periféricos como el útero y la placenta, y en epitelios como el mamario y el lagrimal.^{12,13,43}

4. Expresión de PRL en córnea, iris y retina de rata

Con el propósito de investigar la posible producción local de PRL analizamos la presencia de su ARN mensajero mediante retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir del RNA total aislado de córnea, iris y retina

La figura 15 muestra el análisis tipo Southern blot de los productos de la RT-PCR e indica que tanto en la córnea, como en el iris y la retina se amplifica un producto de 480 pares de bases. El tamaño de este producto corresponde al esperado para el ARN mensajero que codifica a la PRL de 23 kDa y por lo tanto al tamaño del producto amplificado a partir del DNA complementario de PRL clonado de la hipófisis anterior de la rata. El control negativo muestra la ausencia de amplificación cuando se omitió la enzima transcriptasa reversa de la mezcla de reacción.

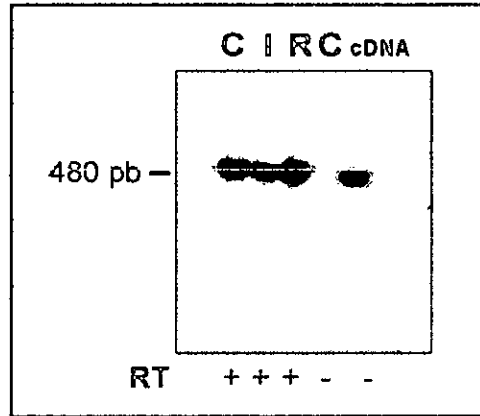


Fig.15. Análisis por RT-PCR-Southern blot del ARN total aislado de la córnea (C), iris (I) y retina (R) de rata. El producto de RT-PCR corresponde en tamaño al amplificado del ADN complementario (cDNA) clonado de la hipófisis de la rata (control positivo). No hubo señal positiva en ausencia de transcriptasa reversa.

La expresión del ARN mensajero de PRL es consistente con los hallazgos mediante Western blot que muestran la presencia de PRLs inmunorreactivas en todos estos tejidos, y apoya la síntesis de PRL por los mismos. Es posible que en el iris y la retina la producción de PRL se asocie al endotelio vascular, dado que ambos tejidos son altamente vascularizados. Al respecto, se sabe que la PRL se produce y secreta por el endotelio vascular de diversas especies y lechos vasculares. En particular, las células endoteliales de los vasos capilares de la retina destacan en la gran cantidad de PRL producida y secretada al medio de cultivo (10 ng/ml), que es más de cien veces mayor con respecto a la PRL secretada por endotelios de la microcirculación bovina (30 pg/ml) y de la macrocirculación humana (1 pg/ml). Mas aún la concentración de PRL secretada por el endotelio de la retina de rata es tan solo diez veces menor que la secretada por lactotropos hipofisarios en cultivo (100 ng/ml).^{74,75}

En contraposición al iris y a la retina, la córnea es avascular y los tipos celulares comprenden fundamentalmente varias capas del epitelio externo y una sola capa del epitelio interno (Fig. 6). Investigamos la localización del ARN

mensajero de PRL en la córnea a través del Southern blot-RT-PCR del ARN total aislado de cultivos primarios del epitelio externo y del interno.

La figura 16 muestra el producto de la reacción de RT-PCR, que en todos los casos estuvo presente y correspondió al transcrito de 480 pb y que corresponde en tamaño al que codifica para la PRL 23K y que también amplificado del homogenado total de córnea (Fig.15). En el epitelio interno se expresa menos mensajero para PRL que en el externo, dado que la eficiencia de la amplificación en ambos casos fue corregida para el gen casero β -actina. La especificidad de la reacción se corroboró mediante la ausencia de marca positiva cuando se omitió la enzima de la mezcla de reacción. (Fig16).

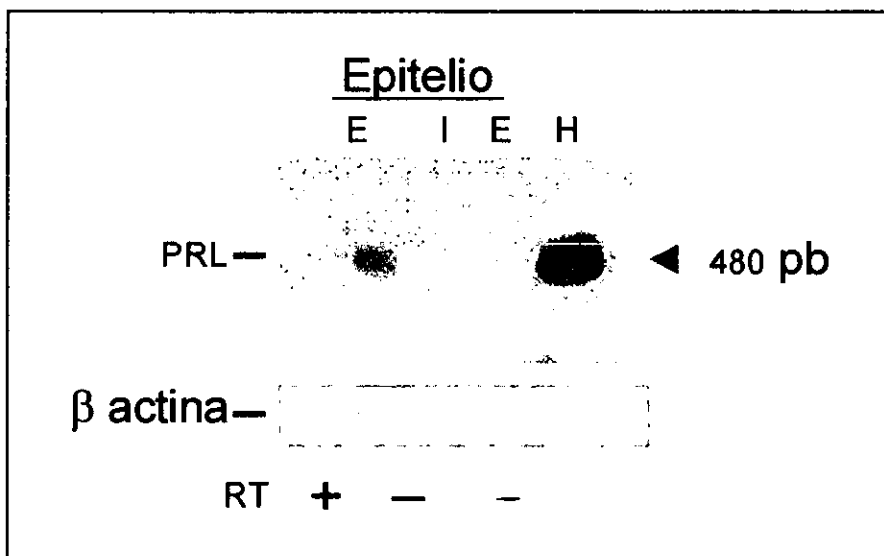


Fig.16 Expresión del ARN mensajero de PRL por células de los epitelios externo (E) e interno (E) de la córnea en cultivo. El producto amplificado es similar en tamaño al presente en el hipotálamo (H) de la rata (control positivo). No se observa amplificación en ausencia de RT (control negativo).

En concordancia con la expresión del ARN mensajero de PRL, en los cultivos epiteliales corneales Western blots también revelaron la presencia de proteínas inmunorreactivas, en estos casos de 23 y 12 kDa.(Fig.17) Si bien los Western blots no son cuantitativos, la proteína del epitelio interno y del externo se ajustó a una misma concentración, por lo que la presencia de bandas de proteínas con densidades equivalentes sugiere que ambos tejidos producen cantidades similares

de PRLs. Este hallazgo no coincide con los niveles de expresión del ARN mensajero detectado entre ambos epitelios por RT-PCR. (Fig.16)

La proteína de 23 kDa es esperada dado que es similar a la detectada en los homogenados totales de córnea. Sin embargo en los cultivos celulares no se detectó a la PRL 16K y si una PRL menor (12 kDa). (Fig.17) Dada la presencia de PRL 16K en córneas totales, la diferencia en tamaño con la PRL pequeña podría corresponder a un procesamiento proteolítico adicional de la PRL 16K por las células en cultivo. Alternativamente, la PRL 16K podría no generarse en los cultivos celulares y la proteína 12K no estar relacionada a dicho fragmento de PRL. Al respecto, en estudios recientes observamos que el procesamiento enzimático de la PRL por extractos celulares aislados de tejidos blanco de la hormona además de generar a la PRL 16K, generan PRLs de 11 y 7 kDa.⁷⁶ También se ha reportado que fragmentos de PRL menores a 16 kDa (14 kDa) tienen propiedades antiangiogénicas, se generan en el tejido nervioso y están presentes en la circulación.³⁴

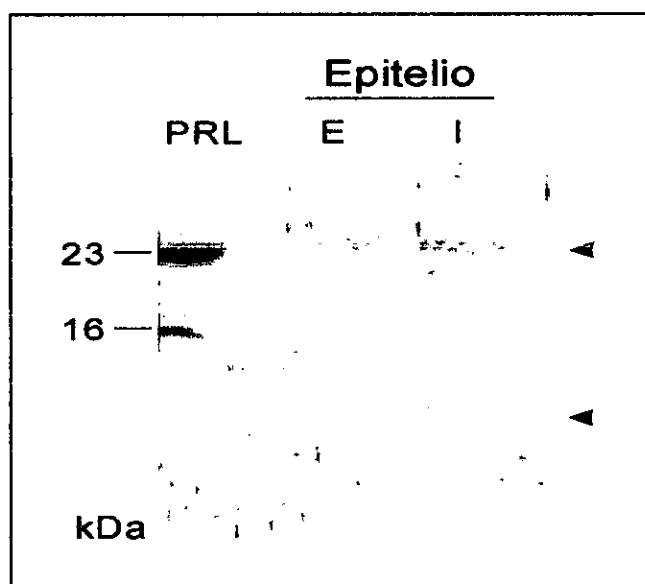


Fig. 17. Western blot de proteínas inmunorreactivas a anticuerpos policlonales anti-PRL en lisados celulares del epitelio externo (E) e interno (I) de la córnea de rata en cultivo. Las flechas (▶) indican proteínas inmunorreactivas de 23 y 12 kDa.

En conclusión, observamos que los epitelios corneales al igual que otros epitelios del cuerpo producen y secretan PRL. Estos hallazgos han sido confirmados por técnicas de hibridación *in situ* donde la sonda complementaria al ARN mensajero de PRL marca positivamente las células del epitelio externo de la córnea (Montes de Occa y Clapp, resultados no publicados).

Como ya se mencionó en la introducción de esta tesis, la neovascularización ocular es causa frecuente de ceguera en distintos tipos de retinopatías, que incluyen a la retinopatía del prematuro. Dado que las PRLs podrían estar involucradas en el proceso angiogénico ocular, investigamos la presencia de PRL en el ojo de pacientes con retinopatía del prematuro sometidos a cirugía ocular.

5. Prolactina inmunoreactiva en fluidos oculares y en suero de pacientes con retinopatía del prematuro

Las concentraciones de PRL de pacientes con retinopatía del prematuro valoradas mediante ELISA de PRL en el humor acuoso (7.2 ± 1.7 ng/ml, n = 37), en el líquido subretiniano (34.9 ± 2.9 ng/ml, n = 8) y en el suero (61.9 ± 7.7 ng/ml, n = 56) se representan en la figura 18.

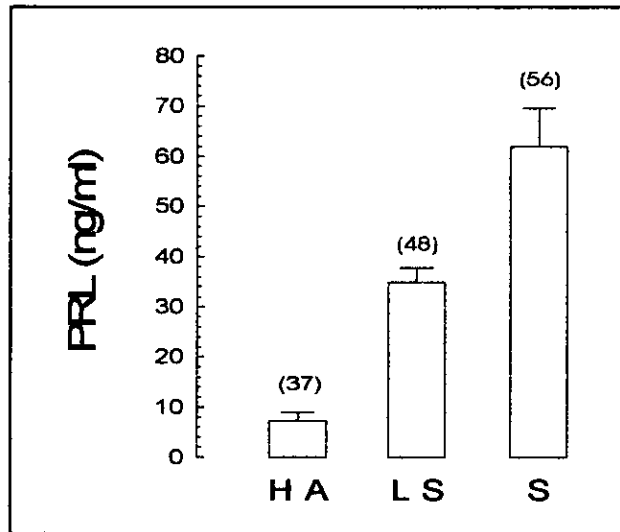


Fig.18 Detección mediante ELISA de PRL en el humor acuoso (HA), líquido subretiniano (LS) y suero de pacientes con retinopatía del prematuro. En paréntesis se indica el número de casos analizados.

Mientras que en el humor acuoso solo se detectó PRL en 19 de 37 pacientes (51%), en el líquido subretiniano y en el suero se determinó PRL en todos los pacientes (Fig.19). La presencia de PRL en los fluidos oculares es consistente con la detección de la hormona en el humor acuoso de la rata y lo que indica que su presencia es común en las diferentes especies.

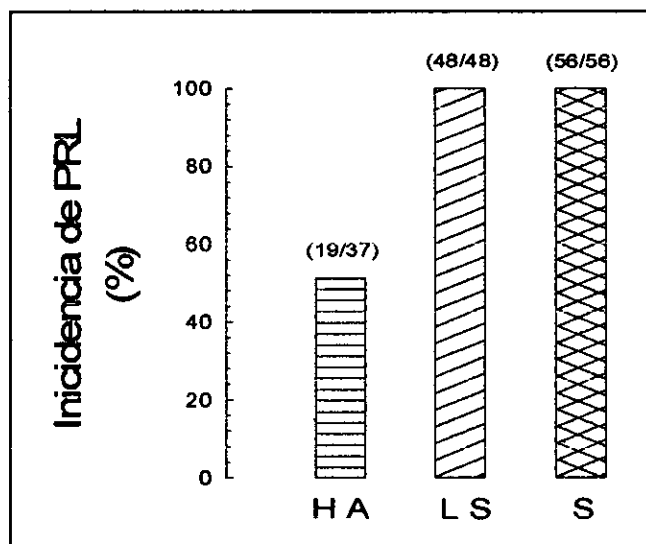


Fig.19 Incidencia de PRL medida en los fluidos oculares (HA y LS) y el suero de los pacientes con Retinopatía del Prematuro. Los números sobre las barras indican los casos en los que se detectó PRL con respecto al total de casos analizados.

Los niveles de PRL en los fluidos oculares y en el suero no mostraron diferencias con respecto a la edad de los pacientes, que osciló entre 0.5 a 3 años, y tuvo una edad promedio de 1.2 ± 0.1 años. Interesantemente, se observaron diferencias en relación al sexo de los pacientes. La concentración de PRL fue significativamente mayor ($p < 0.05$ en el humor acuoso y en el líquido subretiniano de los varones en relación a la de las niñas (Tabla 1)

PRL (ng/ml)

PACIENTES	SUERO	HUMOR ACUOSO	LÍQUIDO SUBRETINIANO
1 ♀	57.7 ± 14.8 (n = 20)	3.1 ± 1.1 (n = 11)	24.8 ± 2.9 (n = 15)
1 ♂	65.5 ± 9.6 (n = 32)	10.1 ± 2.7 * (n = 22)	40.2 ± 4.6* (n = 25)
2 ♀	7.6 ± 0.75 (n = 22)		
2 ♂	10.2 ± 1.65 (n = 19)		

¹ Valores obtenidos para pacientes con retinopatía del prematuro. ² Valores reportados para niños normales en edades de 1-3 años.⁷⁷ * p < 0.05 vs. valores respectivos en las niñas

Sin embargo, la concentración de PRL circulante no mostró diferencias significativas con respecto al sexo (Tabla 1). Esta discrepancia entre las PRLs oculares y la PRL circulante podría implicar el que las primeras son independientes de las segundas, es decir que las PRLs en los fluidos oculares no provienen o al menos no en su mayor parte de la PRL sistémica.

Por otra parte, cabe también señalar que la PRL medida en la circulación de los pacientes con retinopatía del prematuro es claramente mayor a la reportada en la literatura para niños normales de edad equivalente (Tabla1). Estos niveles altos de PRL en la circulación de los pacientes podrían influir sobre la posible contribución de la PRL sistémica a la PRL ocular. Como ya se discutió hay evidencias en la rata, de que la PRL radioactiva inyectada a la circulación sistémica ingresa a los tejidos oculares.⁷⁰ Asimismo datos preliminares ya mencionados sugieren la presencia del receptor en el órgano ciliar (Fig.7) y por lo tanto que en dicho órgano podría ocurrir la internalización vía el receptor, de la PRL sistémica.

6. Falta de Correlación entre las PRLs oculares y el suero de pacientes con retinopatía del prematuro

Con el propósito de explorar el posible origen sistémico de la PRL ocular se analizó si existía alguna correlación entre los niveles de PRL circulante y la del humor acuoso o la del líquido subretiniano de los mismos pacientes. La figura 20 (A, B) muestra que en ningún caso se observó una correlación entre los respectivos valores. Esta aparente divergencia entre las concentraciones de la PRL sistémica y la ocular sugiere el que en estos pacientes la PRL ocular no proviene de la PRL circulante. Sin embargo sí se observó una correlación directa, aunque no significativa, entre los niveles de PRL detectados en el humor acuoso y los del líquido subretiniano de los mismos pacientes. Esta aparente asociación entre las concentraciones de PRL en los fluidos oculares es consistente con la comunicación entre los compartimentos del ojo. Asimismo la posible independencia entre la PRL ocular y la sistémica coincide con la observación previa de que los niveles de PRL ocular, mas no de la PRL sistémica se asocian con el sexo (Tabla 1).

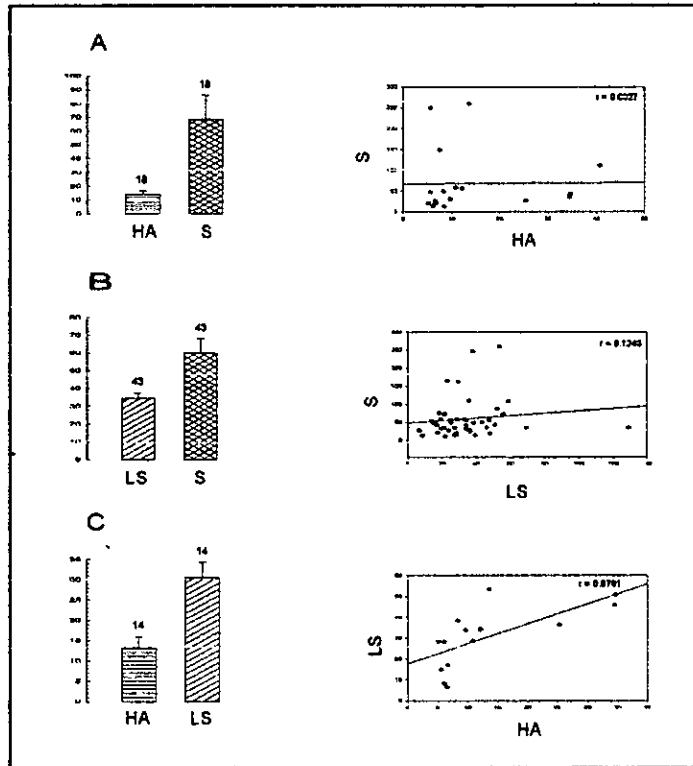


Fig. 20 Gráfica de la falta de correlación entre los valores de humor acuoso (HA), líquido subretiniano (LS) y suero (S) de los mismos pacientes con retinopatía del prematuro.

7. Presencia de PRL bioactiva en fluidos oculares y suero de pacientes con retinopatía del prematuro

Consistentemente el ELISA, se detectó PRL bioactiva en los fluidos oculares y en el suero de los pacientes con retinopatía del prematuro. El bioensayo utilizado se basa en la proliferación de las células Nb2 derivadas de un linfoma murino, las cuales responden de manera específica a PRL.²³ En apoyo a que el efecto biológico fue específico, todas las muestras fueron bioensayadas en presencia o ausencia del anticuerpo anti-PRL, y en todos los casos los anticuerpos bloquearon el efecto (resultados no mostrados). La concentración de PRL bioactiva fue menor a la medida por el ELISA, si bien esta diferencia solamente fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el suero (Fig. 21). Este resultado es consistente con la probable presencia en fluidos oculares y en la circulación, de isoformas de PRL que son inmunoreactivas pero que tienen una menor actividad

biológica.^{78,79} Formas moleculares de PRL con reducida actividad biológica han sido reportadas previamente en la circulación y en fluidos como la leche.⁸²⁻⁸⁴ Una de estas isoformas es la PRL 16K, que tiene el 10% de la bioactividad de PRL en el bioensayo Nb2.²³ Al respecto los resultados de esta tesis muestran evidencias de que la PRL 16K está presente en diversos tejidos oculares de la rata (Figs. 10 y 11).

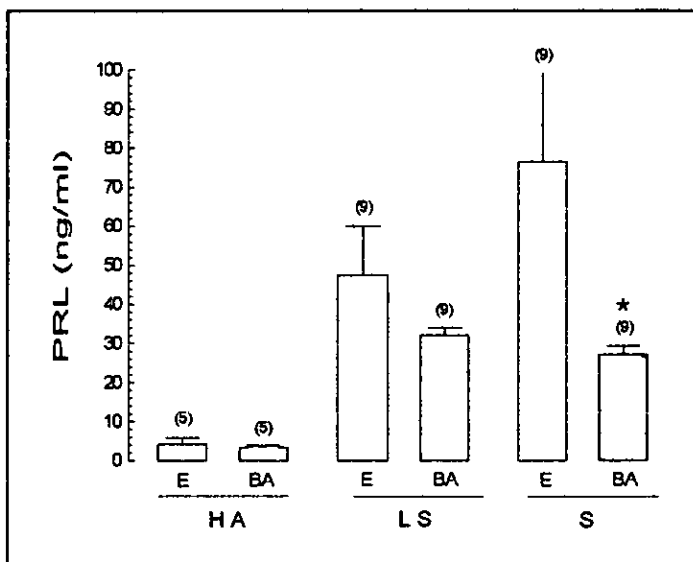


Fig. 21 Comparación de la concentración de PRL evaluada por ELISA (E) o por el bioensayo (B) en el humor acuoso (HA), el líquido subretiniano (LS) y el suero (S) de los mismos pacientes. En los paréntesis se indica el número de casos analizados.

Alternativamente a un origen sistémico como única fuente de PRL ocular, investigamos si la PRL podría sintetizarse intraocularmente en tejidos los pacientes con Retinopatía del Prematuro.

8. Expresión de PRL en las membranas fibrosas del vítreo de pacientes con RP

El análisis por Southern blot de los productos de amplificación por RT-PCR a partir de ARN total aislado de las membranas fibrovasculares del vítreo, mostró la presencia de un transcrito que corresponde en tamaño al amplificado a partir del ADN complementario clonado de la hipófisis humana y que es el esperado para el ARN mensajero que codifica para la PRL completa (23K). (Fig. 23) Adicionalmente

se observó un transcrito 100 pb menor. Este transcrito menor es similar en tamaño al expresado en células endoteliales humanas y bovinas que codifica para una PRL con delección en el tercer exón. La delección del tercer exón implica una eliminación de 30 aminoácidos y por lo tanto la traducción hacia una proteína de alrededor de 21 kDa de masa molecular. La detección de estos ARN mensajeros apoya la expresión intraocular de PRL en los pacientes con retinopatía del prematuro. Estudios recientes utilizando hibridación *in situ* corroboraron la expresión del ARN mensajero de PRL en las membranas fibrovasculares de estos pacientes y mostraron su localización tanto en el endotelio vascular como en leucocitos infiltrados (Montes de Occa y Clapp, resultados no mostrados). De tal manera, tanto en el humano, como en la rata, el endotelio de la microcirculación constituye una fuente de producción de PRL ocular.

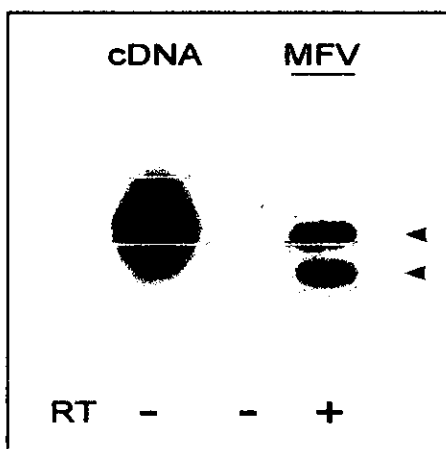


Fig.23 Análisis por RT-PCR-Southern blot de los productos amplificados del ARN total aislado de las membranas fibrovasculares (MFV) de pacientes con retinopatía del prematuro. Los productos amplificados a la derecha se observa la amplificación del ADN complementario que codifica para la PRL humana.

9. PRL 16K en membranas fibrovasculares de pacientes con Retinopatía del Prematuro

Con el propósito de determinar las isoformas de PRL ocular, analizamos mediante Western blots homogenizados de las membranas fibrovasculares. La

figura 24 muestra un caso representativo de cuatro membranas independientes donde la inmunorreactividad tipo PRL se asocia exclusivamente con una proteína de 16 kDa. El hallazgo de esta proteína es consistente con la posible presencia intraocular de PRL 16K. La ausencia aparente de otras PRLs (23K y 20K) esperadas de acuerdo a los ARN mensajeros detectados podría deberse a una baja sensibilidad en la detección del ensayo, que sin embargo implicaría la presencia de bajas concentraciones de las mismas. Esta baja concentración en el tejido podría ser resultado de la secreción de ambas PRLs a la fase líquida del vítreo o de su proteólisis hacia la PRL 16K.

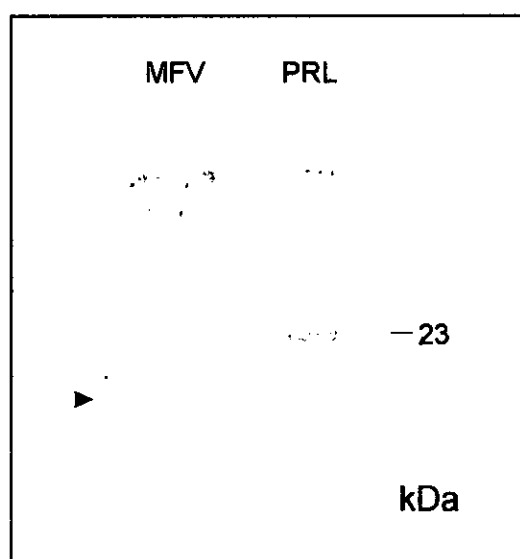


Fig.24 Western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-PRL humana, que muestra un caso representativo de membranas de pacientes con Retinopatía del Prematuro. La flecha indica una proteína inmunorreactiva de 16 kDa.

En apoyo a la posible proteólisis local de la PRL nuestros estudios preliminares muestran que extractos del vítreo son capaces de cortar a la PRL de rata y generar la PRL 16K (Macotela Y, Clapp C., resultados no publicados). Asimismo, se ha reportado que la catepsina D, enzima implicada en la generación de PRL 16K a partir de PRL está presente en el humor vítreo de bovino⁷⁹ de rata ⁸⁰ y de humano.⁸¹ En apoyo a la posible secreción de PRL 23K al humor vítreo, el ELISA y el bioensayo midieron PRL en el líquido subretiniano de pacientes con

retinopatía del prematuro. Ambos ensayos están dirigidos contra la PRL 23K y detectan pobremente a la PRL 16K. Se ha reportado que la PRL 16K tiene un 2% de la inmunorreatividad por los anticuerpos anti PRL 23K en el radioinmunoensayo ²² y 10% de la bioactividad de PRL sobre las células Nb2 ²³. La naturaleza de las PRLs deberá ser analizada purificando a las isoformas de PRL de los fluidos oculares y determinando su secuencia primaria.

Hasta el momento se desconoce si la PRL se asocia con la fisiopatología de la Retinopatía del Prematuro. El análisis preliminar de muestras de humor acuoso y de suero de pacientes sometidos a cirugía ocular por padecimientos no neovasculares como cataratas y glaucoma, sugiere que la concentración de PRL es mayor en los niños con retinopatía del prematuro. Sin embargo el número de casos controles debe ser ampliado para obtener conclusiones confiables.

CONCLUSIONES

En conclusión los resultados de esta tesis son consistentes con:

1. La presencia en la cornea de PRLs con efectos anti-angiogénicos.

Anticuerpos monoclonales inducen la neovascularización de la córnea y ésta contiene PRLs inmunorreactivas de diversos pesos moleculares, que aparentemente incluyen a la PRL antiangiogénica de 16 kDa.

2. La posible internalización a la córnea de PRL lagrimal.

Esta posibilidad es aun especulativa y solo se sugiere con base en la presencia del receptor de PRL en el epitelio externo de la cornea *in situ* y en células aisladas del epitelio corneal en cultivo. La presencia del receptor es una condición para el transporte por endocitosis de la PRL lagrimal al interior de la córnea.

3. La presencia de PRL en otros tejidos y fluidos oculares

PRLs inmunorreactivas de diversos pesos moleculares se detectaron en homogenados de iris y retina y en el humor acuoso de la rata. También se determinó PRL en el humor acuoso, en el líquido subretiniano y en las membranas fibrovasculares de pacientes con retinopatía del prematuro.

4. La PRL ocular no proviene exclusivamente de la PRL sistémica.

El receptor de PRL esta presente en el cuerpo ciliar, órgano responsable del transporte selectivo de algunos componentes del humor acuoso a partir del plasma. Sin embargo en los pacientes con retinopatía del prematuro, no se

encontró correlación alguna entre la concentración de PRL en los fluidos oculares y la presente en la circulación.

5. La PRL se produce intraocularmente.

El ARN mensajero de PRL esta presente en la córnea (epitelio externo e interno), iris y retina de la rata. También se detectó en las membranas fibrovasculares de pacientes con retinopatía del prematuro.

En resumen, los hallazgos de este trabajo proponen al ojo como un nuevo órgano productor y blanco de los miembros de la familia hormonal de la PRL, particularmente de aquellas con efectos inhibidores de la angiogénesis. Consecuentemente, los resultados apoyan la hipótesis de que las PRLs participan en la regulación de la angiogénesis ocular y podrían estar implicadas en la patofisiología de trastornos neovasculares, como en la retinopatía del prematuro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Folkman, J. *Angiogenesis: initiation and control*. *Ann N Y Acad Sci* 1982 401: 212-27.
2. Aiello, LP., *Keeping in touch with angiogenesis*. *Nature Med*. 2000 April (6) 4:379-381.)
3. Folkman, J. *Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis*. *Introduction., Cancer Metastasis Rev* 1990 Nov 9:3 171-4.
4. Weber AJ, De Bandt M., *Angiogenesis: general mechanisms and implications for rheumatoid arthritis*. *Joint Bone Spine*. 2000;67(5):366-83.)
5. Casey, R. and Li, WW., *Factors controlling ocular angiogenesis*. *Am J Ophthalmol* 1997 Oct 124:4 521-9.
6. Adamis, AP., Aiello, LP. & D'Amato, RA., *Angiogenesis and ophthalmic disease*. 1999.
7. Pulverini, PJ., *The pathophysiology of angiogenesis*. *Crit Rev Oral Biol. Med*. 1995 6 3:230-247
8. Battegay BJ. *Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospect*. *J.Mol Med*. 1995 73: 333-346;
9. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. *Nature Med* 2000 March (6) 3:389-395
10. Sinha, Y.N. *Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance*. *Endocrine Reviews*, 1995 16: 354-369.)
11. Yu-Lee L. *Molecular actions of prolactin in the immune system*. *P.S.E.B.M*. 1997, 215:35-52
12. Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen, D.L. and Steinmetz, R.W. *Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects*. *Endocrine Reviews* 1996 17(6):639-669
13. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G *Prolactin: structure, function, and regulation of secretion*. *Physiol Rev* 2000 Oct;80(4):1523-63)
14. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA., *Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice*. *Endocr Rev*. 1998 Jun;19(3):225-68. Review.
15. Clapp C. and Martinez de la Escalera G. (1997). *Prolactins: Novel Regulators of angiogenesis*. *News Physiol. Sci* 12: 231-237).
16. Elias, KA., Weiner, RI., *Direct arterial vascularization of estrogen-induced prolactin-secreting anterior pituitary tumors* *Pro. Natl. Acad. Sci*. 1984 81:4549-53)
17. Clapp, C., Martial, J., Guzman ,R.C., Rentier-Delrue, F., Weiner, R.I. *The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis*. *Endocrinology*, 1993, 133:1292-1299
18. Clapp, C *Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms..* *Endocrinology* 1987 Dec 121:6 2055-64)
19. Nicoll CS., *Cleavage of prolactin by its target organs and the possible significance of this process* *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997 Jan 2:1 81-9

20. Baldochi RA, Tan L, King DS, Nicoll CS., *Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D.* *Endocrinology* 1993 Aug 133:2 935-8
21. Ferrara N, Clapp C, Weiner R. *The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells.* *Endocrinology.* 1991 Aug;129(2):896-900.
22. Clapp C, Sears PS, Russell DH, Richards J, Levay-Young BK, Nicoll CS., *Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin.* *Endocrinology* 1988 Jun 122:6 2892-8
23. Tanaka, T., Shiu, R.P.C., Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R.L. and Friesen, H.G. *A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: Measurement of Prolactin and Growth Hormone in human serum.* *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1980 51:1058-1063.
24. Dueñas Z., *Análisis in vivo de la participación de prolactinas en el proceso angiogénico.* Tesis maestría. Centro de Neurobiología. UNAM. México. 1997.
25. Duenas Z, Torner L, Corbacho AM, Ochoa A, Gutierrez-Ospina G, Lopez-Barrera F, Barrios FA, Berger P, Martinez de la Escalera G, Clapp C. *Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules.* *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999 Oct;40(11):2498-505.
26. Lee H, Struman I, Clapp C, Martial J, Weiner RI, *Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression.* *Endocrinology* 1998 Sep 139:9 3696-703.
27. D'angelo G, Martín JF, Liri T, Fantl WJ, Martial J, Weiner RI, *16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells.* *Mol Endocrinol* 1999 May 13:5 692-704.
28. Clapp C, Weiner RI *A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells.* *Endocrinology* 1992 Mar 130:3 1380-6
29. Jackson D, Volpert OV, Bouck N, Linzer DI., *Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein.* *Science* 1994 Dec 2 266:5190 1581-4)
30. Sinha YN, Gilligan TA, Lee DW, Hollingsworth D, Markoff E, *Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma* *J Clin Endocrinol Metab* 1985 Feb 60:2 239-43
31. Torner L, Nava G, Duenas Z, Corbacho A, Mejia S, Lopez F, Cajero M, Martinez de la Escalera G, Clapp C. *Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment.* *J Endocrinol.* 1999 Jun;161(3):423-32.
32. Nicoll CS, *Cleavage of prolactin by its target organs and the possible significance of this process.* *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997 Jan;2(1):81-9.

33. Torner L, Mejia S, Lopez-Gomez FJ, Quintanar A, Martinez de la Escalera G, Clapp C. A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology*. 1995 Dec;136(12):5454-60.
34. Clapp C, Torner L, Guitérrez-Ospina G, Alcántara E, López-Gómez Nagano M, Kelly PA, Mejia S, Morales MA, & Martínez de la Escalera G., *The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Oct 25 91:22 10384-8).*
35. Mejia S, Morales MA, Zetina ME, Martínez de la Escalera G, Clapp C. *Immunoreactive prolactin forms colocalize with vasopressin in neurons of the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. Neuroendocrinology*. 1997 Sep;66(3):151-9.
36. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. *Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth Cell 1997 Jan 24 88:2 277-85)*
37. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. *Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma Cell 1994 Oct 21 79:2 315-28*
38. Clapp C, López-Gómez FJ, Nava G, Corbacho A, Torner L, Macotela Y, Dueñas Z, Ochoa A, Noris G, Acosta E, Garay E, & Martínez de la Escalera G., *Expresión of Prolactin mRNA and of Prolactin-like proteins in endotelial cells: evidence for autocrine effects. Journal of Endocrinology 1998, 158:137-144).*
39. Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Torner L, Dueñas Z, Noris G, Morales MA, Martínez de la Escalera G, and Clapp C., *Human umbilical vein endotelial cells express multiple prolactin isoforms, Journal of Endocrinology 2000, 166:53-62*
40. Ochoa A, Montes de Oca P, Rivera C, Duenas Z, Nava G, Clapp Carmen and Martínez de la Escalera G., *Rat retinal capillary endotelial cells produced and secrete Prolactin Invest Ophthalmol & Vis Sci 200 in press*
41. Folkman J. *Angiogenesis and angiogenesis inhibition: An overview. In. Goldberg I.D. and Rosen E.M. Regulation of Angiogenesis. Boston; Berlin:Bikhauser, 1997: 1-8)*
42. Auerbach R., Auerbach W., and Polkowsoki I. *Assay for angiogenesis: a review. Pharmac. Ther. 1991;51: 1-11*
43. Wood, R.L., Zhang, J., Huang, Z.M., Gierow, J.P., Schechter, J.E., Austin K., Mircheff, and Warren, D.W. 1999 *Prolactin and prolactin receptor in the lacrimal gland. Exp. Eye. Res. 69, 213-226)*
44. Mircheff, A.K., Warron, D.W., Wood, R.L., Tortoriello, P.J. and Kaswan, R.L. (1992). *Prolactin Localization, binding, and effects on peroxidase release in rat exorbital lacrimal gland. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 33, 641-50*

45. (Frey, W.H. II, Nelson, J.D., Frick, M.L. and Eld, R.P. (1986). Prolactin immunoreactivity in human tears and lacrimal gland: possible implication for tear production. In the precocular tear film (Holly, F.J., ed.). Pp 798-807. The Dry Eye Institute: Lubbock, Texas, U.S.A.
46. Azarolo A.M, Bjerrum K, Maves CA, Becker L, Wood RL, Mirchef AK and Warren DW.1995. Hypophysectomy-Induced Regression of Female of Rat Lacrimal Glands: Partial Restoration and Maintenance by Dihydrotestosterona and Prolactin. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*.1995;36:216-226
47. Mathers WD, Stovall D, Lane JA, Zimmerman MB, Johnson S., Menopause and tear function: the influence of prolactin and sex hormones on human tear production., *Cornea* 1998 Jul;17(4):353-8
48. McClellan KA, Robertson FG, Kindblom J, Wennbo H, Tornell J, Bouchard B, Kelly PA, Ormandy CJ., Investigation of the role of prolactin in the development and function of the lacrimal and harderian glands using genetically modified mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 Jan;42(1):23-30
49. Lonchamp M, Pennel L, Duhault J, Hyperoxia/Normoxia-Driven Retinal Angiogenesis in Mice: A Role for Angiotensin II. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Feb;42(2):429-432.
50. Campochiaro PA., Retinal and choroidal neovascularization *J Cell Physiol*. 2000 Sep; 184 (3):301-10. Review
51. Anthony P. Adamis, Lloyd P. Aiello & Robert A. D'Amato., Angiogenesis and ophthalmic disease., *Angiogenesis* 1999 3: 9-14 Review
52. Aiello L.P., Avery R.L., Arrigg PG., et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of parients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*. 1994; 331: 1480-1487
53. Kent D, Pennie F, Laws D, White S, Clark D, The influence of retinopathy of prematurity on ocular growth. *Eye*. 2000 Feb;14 (Pt 1):23-9.
54. Gopal L, Sharma T, Shanmugam M, Badrinath SS, Sharma A, Agraharam SG, Surgery for stage 5 retinopathy of prematurity: the learning curve and evolving technique. *Indian J Ophthalmol*. 2000 Jun;48(2):101-6
55. Pulverini P., Bouck N P., Rastinejad F., Assay and Purification of Naturally Occurring Inhibitor of Angiogenesis. *Methods in Enzymology* Vol 198. 440-450. 1991
56. Bradford, M., A rapid and sensitive meted for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248.
57. Laemmli UK., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(259):680-5.
58. Okamura H, Zachwieja J, Raguet S, Kelly PA., Characterization and applications of monoclonal antibodies to the prolactin receptor. *Endocrinology*. 1989 May;124(5):2499-508.
59. Yoichii Minami, Jaime Sugihara and Shinji Oono., Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrizz culture., (1993) *Invest. Ophthal. & Vis. Sci.*, 34, 7:2316-2324

76. Aranda, J. *Electroelución de proteínas. Tesis de licenciatura en Química. Universidad de Guanajuato-Centro de Neurobiología. UNAM 2000*
77. Gassler N, Peuschel T, Pankau R. *Pediatric reference values of estradiol, testosterone, lutropin, follitropin and prolactin. Clin Lab. 2000;46(11-12):553-60*
78. Farkouh NH, Packer MG, Frantz AG, *Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum : high proportion in basal state and reduction after thyrotropin-releasing hormone. J Clin Endocrinol Metab. 1979; 48:1026-1032*
79. Subramanian MG, Gala RR. *Do prolactin levels measured by RIA reflect biologically active prolactin ? J Clin Immunoassay 1986; 9:42-52.*
80. Obuchowska I, Stankiewicz A, Mariak Z., *Cathepsin activity of normal bovine ocular tissues and pathological human intraocular fluids. Acta Biochim Pol. 1996;43(4):687-92*
81. Wolanska M, Bakunowicz-Lazarczyk A, Bankowski E., *Proteolytic activity of vitreous-humour. Acta Biochim Pol. 1991;38(1):119-22.*
82. Osuna E, Perez Carceles MD, Jakobsson SW, Luna A., *Biochemical and morphological markers in the post mortem diagnosis of ischemic heart distress., Acta Med Leg Soc (Liege). 1990;40:275-83.*

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

60. Forbes D., Pozos R., Nelson D., Lima P. Characterization of rat corneal epithelium mantained in tissue culture. *Eye Research* 1984, 3; 12:1471-1479
61. Bednarz J, Schrenck A R, and Engelmann K., Different characteristics of endotelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Animal*. 1998 34:149-153
62. Chomczynski P, Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction., *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
63. Lewis UJ, Singh RN, Sinha YN, Vanderlaan WP. Glycosylated human prolactin *Endocrinology*. 1985 Jan;116(1):359-63
64. Bedecarrats G, Guemene D, Morvan C, Crisostomo-Pinto S, Kuhnlein U, Zadworny D., In vitro release of isoforms of prolactin from pituitary glands of turkey hens at different physiological stages. *Gen Comp Endocrinol*. 1999 Jan;113(1):105-11.
65. Sinha YN, Gilligan TA., Identification and partial characterization of a 25K protein structurally similar to prolactin *Proc Soc Exp Biol Med*. 1985 Apr;178(4):505-14.
66. Signorella AP, Hymer WC., An enzyme-linked immunosorbent assay for rat prolactin., *Anal Biochem*. 1984 Feb;136(2):372-81.
67. Rivera C. Establecimiento de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la cuantificación de PRL en tejidos y fluidos oculares. Tesis de Licenciatura en Biología. UAQ-Centro de Neurobiología-UNAM. 2001
68. Krown A K., Wang Yu-fen, Ho T W., Kelly P and Walker A. 1992 Prolactin isoform 2 as an autocrine growth factor for GH₃ cells. *Endocrinology* 131 (2) 595-602.
69. Ginsburg E., Vonderhaar BK 1995 Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Research*. 55:2591-2595
70. O'Steen WK, Sundberg DK. Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic Res*. 1982;14(1):54-62
71. Roky R, Paut-Pagano L, Goffin V, Kitahama K, Valatx JL, Kelly PA, Jouvet M. Distribution of prolactin receptors in the rat forebrain. *Immunohistochemical study*. *Neuroendocrinology*. 1996 May;63(5):422-9
72. Russell D Fernald., Evolution of eyes [Review], *Current Opinion in Neurobiology*, 2000, 10:4:444-450
73. Sandowski Y, Cohen Y, Le Rouzic P, Bignon C, Rentier-Delrue F, Djiane J, Prunet P, Gertler A. Recombinant prolactin receptor extracellular domain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): subcloning, preparation, and characterization. *Gen Comp Endocrinol*. 2000 May;118(2):302-9
74. Schams D., Prolactin levels in bovine blood, influenced by milking manipulation, genital stimulation and oxytocin administration with specific consideration of the seasonal variations. *Acta Endocrinol.*, 1972 Dec;71(4):684-96
75. Erroi A, Bassetti M, Spada A, Giannattasio G., Microvasculature of human micro- and macroprolactinomas. A morphological study., *Neuroendocrinology*. 1986;43(2):159-65

Inhibition of Rat Corneal Angiogenesis by 16-kDa Prolactin and by Endogenous Prolactin-like Molecules

Zulma Dueñas,^{1,2} Luz Torner,¹ Ana M. Corbacho,¹ Alejandra Ochoa,¹ Gabriel Gutiérrez-Ospina,¹ Fernando López-Barrera,¹ Fernando A. Barrios,¹ Peter Berger,³ Gonzalo Martínez de la Escalera,¹ and Carmen Clapp¹

PURPOSE. The cornea is an avascular organ, where induction of new blood vessels involves the turn-on of proangiogenic factors and/or the turn-off of antiangiogenic regulators. Prolactin (PRL) fragments of 14 kDa and 16 kDa bind to endothelial cell receptors and inhibit angiogenesis. This study was designed to determine whether antiangiogenic PRL-like molecules are involved in cornea avascularity.

METHODS. Sixteen-kDa PRL and basic fibroblast growth factor (bFGF) or anti-PRL antibodies were placed into rat cornea micropockets and neovascularization evaluated by the optical density associated with capillaries stained by the peroxidase reaction and by the number of vessels growing into the implants. Prolactin receptors in corneal epithelium were investigated by immunocytochemistry.

RESULTS. bFGF induced a dose-dependent stimulation of corneal neovascularization. This effect was inhibited by coadministration of 16-kDa PRL, as indicated by a 65% reduction in vessel density and a 50% decrement in the incidence of angiogenic responses. Corneal angiogenic reactions of different intensities were induced by implantation of polyclonal and monoclonal anti-PRL antibodies. Corneal epithelial cells were labeled by several anti-PRL receptor monoclonal antibodies.

CONCLUSIONS. These findings show that exogenous 16-kDa PRL inhibits bFGF-induced corneal neovascularization and suggest that PRL-like molecules with antiangiogenic actions function in the cornea. PRL receptors in the corneal epithelium may imply that PRL in the cornea derives from lacrimal PRL internalized through an intracellular pathway. These observations are consistent with the notion that members of the PRL family are potential regulators of corneal angiogenesis. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2498-2505)

Angiogenesis, the formation of new blood vessels is a key element for growth and development, reproduction, wound healing, and tissue repair. Angiogenesis is also a primary event in several pathologic processes, including tumor development, chronic inflammatory diseases, and various retinopathies.^{1,2}

Several stimulators and inhibitors of angiogenesis have been identified that modulate the ability of endothelial cells to digest the basement membrane and proliferate, migrate, and/or associate into a new capillary network.^{3,4} The balance between naturally occurring inducers and inhibitors of angiogenesis

determines the active neovascularization observed during embryogenesis as well as the vascular quiescence maintained by most tissues in adult life.^{4,5} The cornea and the cartilage are normally avascular. Their resistance to vascular invasion appears to involve a predominance of inhibitors over stimulators of angiogenesis.⁴⁻⁶

Among a long list of active peptides, members of the prolactin (PRL) hormonal family have been proposed as potential regulators of angiogenesis.⁷ Fragments of PRL of 14 kDa and 16 kDa bind to endothelial cell receptors and inhibit endothelial cell proliferation, migration, and tube formation.⁷⁻¹² Similarly, the 16-kDa amino terminal fragment of PRL inhibits the in vivo development of the microvasculature of the chick chorioallantoic membrane (CAM).¹⁰ In addition proliferin and proliferin-related protein (PRP), considered members of the PRL family on the basis of primary sequence homology, compete with 16-kDa PRL for endothelial cell binding⁹ and have opposite effects on angiogenesis.¹³ Proliferin stimulates and PRP inhibits endothelial cell migration and corneal neovascularization, respectively.¹³

The cornea is a powerful model for investigating the in vivo regulation of blood vessel growth.¹⁴ In the present study, we used rat corneas to analyze the potential contribution of PRLs to the regulation of angiogenesis. Our findings extend those previously reported of in vivo antiangiogenic action of 16-kDa PRL¹⁰ and provide evidence to suggest that PRL-like

From the ¹Neurobiology Center, National Autonomous University of Mexico, Querétaro, Mexico; and the ²Institute for Biomedical Aging Research, Austrian Academy of Sciences, Innsbruck, Austria.

³Permanent address: Fundación Universitaria de Boyacá, Tunja, Colombia.

Supported by Grants 3662P, 27950-N from the National Council of Science and Technology of Mexico, IN201895 from the National University of Mexico, 75197-554801 from The Howard Hughes Medical Institute, and RGA 96-097 from The Third World Academy of Sciences.

Submitted for publication November 24, 1998; revised March 24, 1999; accepted May 20, 1999.

Commercial relationships policy: N.

Corresponding author: Carmen Clapp, Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 1-1141, 76001 Querétaro, Qro., Mexico.

E-mail: clapp@servidor.unam.mx

molecules with inhibitory actions on blood vessel growth, may be involved in the maintenance of corneal avascularity. A preliminary report of these findings has been presented.¹⁵ In all facets of the study, animals were managed in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Rat 23-kDa PRL (BIO grade) was donated by the National Hormone and Pituitary Program (NHPP, Torrance, CA). Sixteen-kDa PRL was generated after the enzymatic proteolysis of rat 23-kDa PRL with a particulate fraction from rat mammary gland extracts, gel filtration, and carbamidomethylation, as reported.¹⁶ Human basic fibroblast growth factor (bFGF) was a kind gift from Judith A. Abraham (Scios, Mountain View, CA). Antisera were raised in rabbits by immunization with NHPP rat 23-kDa PRL or with rat 16-kDa PRL standards. Rat PRL monoclonal antibody (INN-rPRL-1) in raw ascites fluid, generated and characterized as described, was used.¹⁷ Four monoclonal antibodies (U5, U6, T1, and T6) directed against the extracellular domain of the PRL receptor were kindly provided by Paul A. Kelly (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U-344, Paris, France). Two of these monoclonal antibodies (U5 and U6) are directed to epitopes outside the binding domain, whereas the other two (T1 and T6) interact at or near the ligand-binding domain.¹⁸ Purified nonimmune mouse IgGs were from ICN Biomedicals (Aurora, IL).

Purification of IgG

Antibodies from rabbit antisera, nonimmune sera, or ascites fluid were purified on a protein A Sepharose column (Sigma, St. Louis, MO), as described.¹⁹ Briefly, samples were added to columns equilibrated with phosphate-buffered saline (PBS; pH 8). Columns were washed extensively with PBS (pH 8) and IgG eluted with 0.1 M sodium acetate (pH 3) into tubes with 1 M Tris hydrochloride (pH 8) to neutralize the acid. The concentration of antibodies was determined by the Bradford method (Bio-Rad, Richmond, CA).

Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Polyclonal antibodies directed against 23-kDa PRL or 16-kDa PRL and the INN-rPRL-1 anti-23-kDa PRL monoclonal antibody were characterized by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), performed as described.²⁰ For these assays, wells were coated with 10 ng of either 23-kDa PRL or 16-kDa PRL. Primary polyclonal (1:2000) or monoclonal (1:100) antibodies, with or without serial dilutions of 23-kDa or 16-kDa PRLs were added to the coated wells. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used at 1:2000 or 1:1000 dilution, respectively. Bound horseradish peroxidase-conjugated antibodies were revealed by reaction with 2 mg of ortho-phenylenediamine (dihydrochloride) in 0.1 M citrate buffer (pH 5.0) with 0.1% hydrogen peroxide. Reaction was stopped with 4 N sulfuric acid and optical density (OD) determined at 490 nm.

Western Blot Analysis

Twenty-three-kDa and 16-kDa PRLs were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

in 15% acrylamide separating and 4% stacking laboratory gels, under reducing conditions using the buffer system of Laemmli.²¹ Proteins were blotted into nitrocellulose membranes and probed with polyclonal (1 µg/ml) or monoclonal (2 µg/ml) antibodies. Antigen-antibody reaction was developed with the use of an alkaline phosphatase secondary antibody kit (Bio-Rad, Hercules, CA).

Rat Corneal Bioassay

The bioassay was performed with male Wistar rats (200–250 g), as previously described.²² Briefly, rats were anesthetized with sodium pentobarbital. A corneal pocket was made by inserting a 27-gauge needle, with the pocket's base 1 mm from the limbus. Implants containing the test substances were made using poly-2-hydroxyethylmethacrylate (Hydron; Interferon Sciences, New Brunswick, NJ), stained with india ink, and combined (1:1) with the sample substance. The Hydron substance solution was pipetted onto a sterile Teflon surface and air dried to produce a 2-mm-diameter disc. Approximately one eighth of the disc was implanted in each corneal pocket. Animals were killed 6 days after implantation and corneas dissected, flattened by cuts leaving three to four regions of at least 4 mm² each, and fixed for 2 hours with 4% paraformaldehyde-1.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Corneal capillary network was delineated by staining the enclosed red blood cells by a peroxidase reaction, as described.¹⁰ Accordingly, visualization of vessels followed corneal incubation in 0.05% 3,3'-diaminobenzidine in the presence of 0.01% H₂O₂ in 0.1 M phosphate buffer. Subsequently, corneas were dehydrated, mounted (Entellan; Merck, Darmstadt, Germany), coverslipped, and analyzed in a light-field microscope (model 104; Nikon, Garden City, NY). Images were digitized with a video camera (model CCD72; Dage-MTI, Michigan City, IN) and subjected to analysis (NIH Image ver. 1.62, National Institutes of Health, Bethesda, MD). A mask of a region of interest, with a semitriangular shape and approximately 4.0 mm², was generated and centered at the implant on each corneal digitized image. This was the smaller common area to be contained within the segments delimited by the cuts performed to flatten the corneas. Corneal angiogenesis was quantitated by recording the OD associated with pixel gray values of stained capillaries within the region of interest mask. Image background was subtracted to ensure OD uniformity on the image. Only angiogenic reactions reaching an OD value equal to or higher than the double of the average control level were considered to be substantial enough for the evaluation of the incidence of neovascularization. In addition, the number of long vessels reaching the implant from perilimbal vessels was quantitated on the printed digitized corneal images by double-blind, independent observers.

Immunocytochemistry

Male Wistar rats (200–250 g) were killed by decapitation. Eyes were enucleated and fixed for 2 hours with 4% paraformaldehyde-1.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), transferred to 20% (wt/vol) sucrose until saturation, and then cut at 15 mm thickness in a cryostat (−16°C). Sections were incubated for 30 minutes in methanol containing 90% H₂O₂ and 1 hour in 10% bovine serum albumin (BSA), 3% normal calf serum, and 0.3% Triton X-100 in PBS. Subsequently, sections were incubated overnight in a humid atmosphere at 4°C with

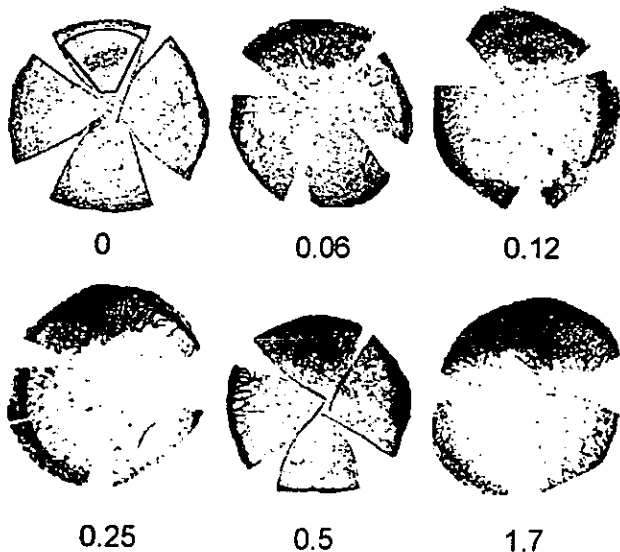
bFGF (μg)

FIGURE 1. bFGF-induced corneal angiogenesis. Representative corneas treated for 6 days with Hydron (Interferon Sciences) implants containing increasing doses of bFGF. Corneal capillaries were revealed by staining the enclosed red blood cells by peroxidase reaction. The region of interest used for evaluating angiogenic responses is delineated in the cornea containing no bFGF. Numbers below corneas indicate micrograms of bFGF contained in the respective implant.

each anti-PRL receptor monoclonal antibody (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in 0.3% Triton X-100 PBS. The sections were rinsed and incubated with secondary biotinylated anti-mouse IgG followed by avidin-biotin-peroxidase (ABC kit, Vector Laboratories). Bound anti-PRL receptor antibodies were revealed with 0.05% 3,3'-diaminobenzidine and 0.15% H_2O_2 for 2 to 3 minutes. Sections were dehydrated, mounted (Entellan; Merck), coverslipped, and analyzed in a light-field microscope (model BX60; Olympus, Lake Success, NY).

Statistical Analysis

Data reported as ODs and number of vessels (mean \pm SEM) were analyzed by two-way analysis of variance (replicate \times treatment) to partition out variation due to experimental replicates. Mean values for each treatment were compared using Duncan's new multiple-range test. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Data reported as incidence of angiogenesis were analyzed for statistical significance by the nonparametric Mann-Whitney rank sum test.

RESULTS

Inhibition by 16-kDa PRL of Corneal Angiogenesis Induced by bFGF

bFGF stimulated corneal angiogenesis in a dose-dependent manner (Figs. 1 and 2). Increasing amounts of bFGF (from 60 ng to 1.7 μg) were associated with increasing ODs in an area surrounding the implants, that were significantly higher than those observed with vehicle (Hydron alone) or BSA-containing implants (Fig. 2A). Values in these two control groups were similar to those recorded in equivalent corneal areas distant

from the implants (data not shown). Dose-related increases in the proportion of corneas with substantial angiogenic responses (OD more than two times the values of untreated corneas) were also observed (Fig. 2B). The implantation of 60 and 120 ng bFGF elicited substantial angiogenesis in 1 of 7 and in 14 of 18 corneas, respectively, and higher doses resulted in substantial angiogenesis in all the treated corneas (Fig. 2B). Implants containing BSA did not induce substantial angiogenesis in any of the 17 treated corneas.

To investigate the putative antiangiogenic effect of 16-kDa and 23-kDa PRL, corneal angiogenesis was stimulated with 0.25 μg bFGF (the lowest dose observed to induce substantial angiogenesis in 100% of corneas) in the absence or presence of 2 μg of the two PRL standards (Fig. 3). Inclusion of 16-kDa PRL in the implants reduced the magnitude of the angiogenic responses induced by bFGF by more than 65% (Figs. 3A, 3B). Likewise, the incidence of corneas with substantial angiogenic responses was reduced by half by treatment with 16-kDa PRL. Conversely, cotreatment with bFGF and 23-kDa PRL resulted in an incidence and magnitude (OD) of angiogenesis similar to those induced by bFGF alone (Fig. 3B).

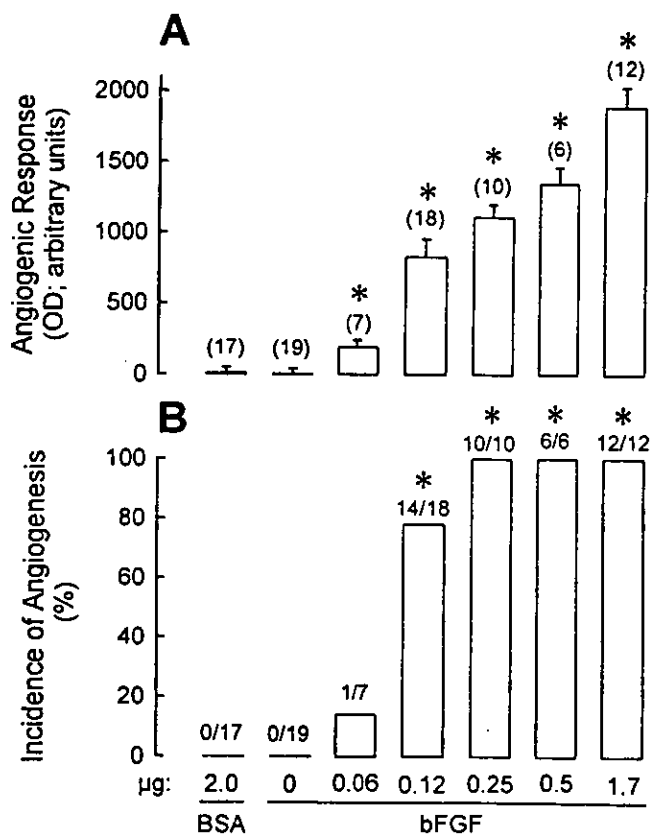


FIGURE 2. bFGF-induced corneal angiogenesis. (A) Angiogenic responses induced by increasing doses of bFGF, quantitated by the OD of a 4-mm² area surrounding the implant. Values represent the mean \pm SEM of the number of corneas shown in parentheses. (B) Incidence of angiogenesis, defined as the proportion of corneas with substantial angiogenesis (ODs more than two times those of untreated corneas). Numbers above bars represent the number of corneas with substantial angiogenesis over the number of treated corneas. * $P < 0.05$ versus vehicle- or BSA-treated controls.

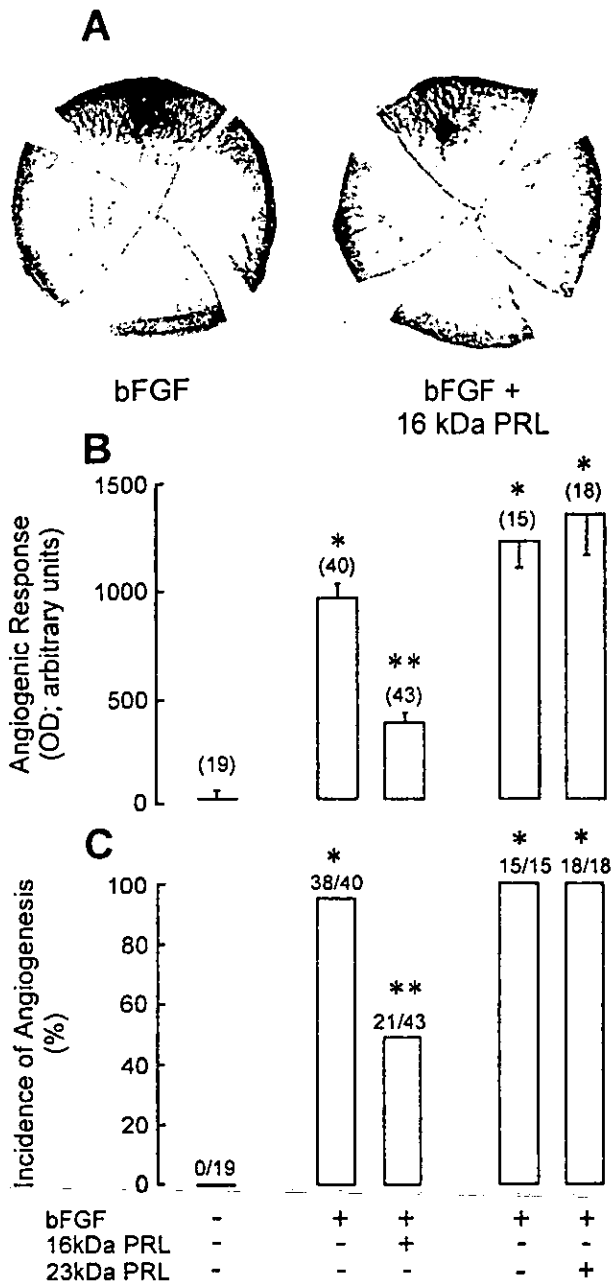


FIGURE 3. Inhibition by 16-kDa PRL of bFGF-induced corneal angiogenesis. (A) Representative corneas implanted with bFGF (0.25 μ g) alone or together with 16-kDa PRL (2 μ g). (B) Angiogenic responses to bFGF (0.25 μ g) in the absence or presence of 2 mg 16-kDa PRL or 23-kDa PRL, quantitated by the OD associated with stained capillaries. (C) Incidence of angiogenesis (as defined in legend to Fig. 2) after treatment of corneas. (B) Other conditions are as described in Figures 1 and 2. * $P < 0.05$ versus vehicle-implanted control; ** $P < 0.05$ versus group treated with bFGF alone.

Characterization of Anti-PRL Antibodies

Anti-23-kDa PRL polyclonal and monoclonal antibodies were characterized by ELISA and western blot analysis (Fig. 4). Competition curves using different concentrations of 16-kDa or 23-kDa PRL standards showed that although both PRL standards reacted with the monoclonal antibody at similar potencies, 16-kDa PRL had a higher immunoreactivity than 23-kDa

PRL for both anti-23-kDa and anti-16-kDa polyclonal antibodies (Fig. 4A).

Western blot analysis probed with all the PRL antibodies detected 23-kDa PRL and 16-kDa PRL standards with similar intensities (Fig. 4B). No reaction was observed with either PRL standard when western blot analyses were probed with pre-immune rabbit or mouse antibodies (data not shown). None of the antibodies reacted with the BSA nonspecific control.

Induction of Rat Corneal Angiogenesis by Anti-PRL Antibodies

Implants containing anti-16-kDa PRL or anti-23-kDa PRL polyclonal antibodies induced corneal angiogenesis (Fig. 5). Although anti-16-kDa PRL antibodies induced substantial angiogenic responses in 20% of the corneas treated, anti-23-kDa PRL antibodies did the same in 40% (Fig. 5). On average, these responses were equivalent in magnitude to those induced by

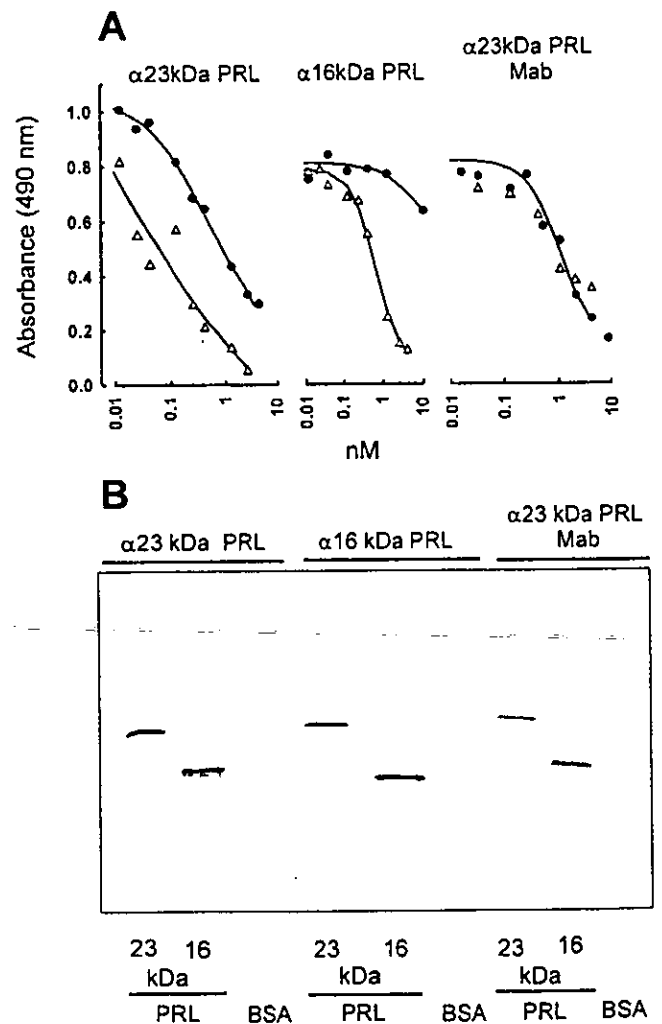
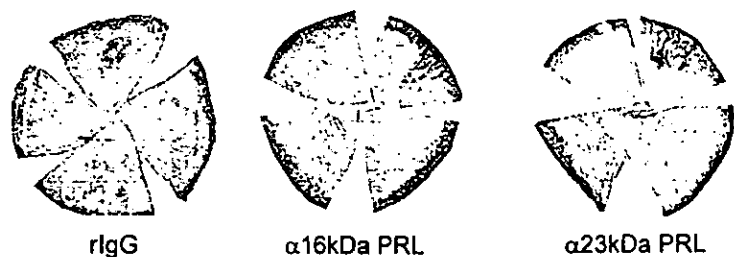


FIGURE 4. Characterization of anti-PRL antibodies. (A) ELISA competition curves using serial concentrations of 16-kDa (Δ) or 23-kDa (\bullet) PRL standards and anti-23-kDa PRL polyclonal antibodies (α 23-kDa PRL), monoclonal antibodies (α 23-kDa PRL Mab), or an anti-16-kDa PRL polyclonal antibody (α 16-kDa PRL). (B) Twenty-three-kDa and 16-kDa rat PRL standards, revealed by western blot analysis probed with the respective anti-PRL polyclonal and monoclonal antibodies. None of the antibodies reacted with the BSA-treated negative control.

A



B

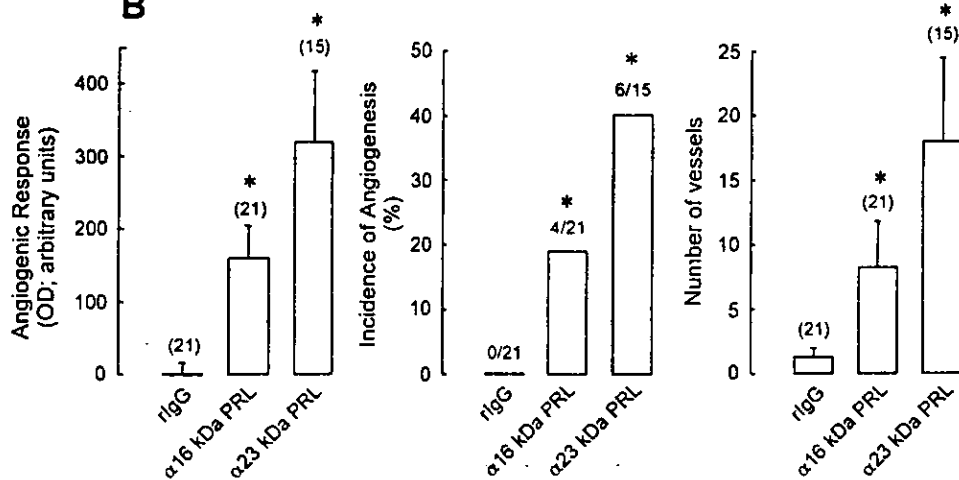


FIGURE 5. Induction of corneal angiogenesis by anti-PRL polyclonal antibodies. (A) Representative corneas implanted with nonimmune antibodies from normal rabbit serum (rlgG; 3 μ g), anti-16-kDa PRL (α16-kDa PRL; 2 μ g), or anti-23-kDa PRL (α23-kDa PRL; 2 μ g) polyclonal antibodies. (B) Corneal angiogenesis in response to the respective antibodies was evaluated by quantitation of the OD associated with stained capillaries (*left*), the incidence of angiogenesis (*middle*), and the number of long vessels reaching the implants (*right*). Other conditions are as described in Figures 1 and 2. * $P < 0.05$ versus treatment with nonimmune rabbit antibodies.

doses of bFGF between 60 and 120 ng (Fig. 2). Although OD determinations adequately monitor the moderate and strong neovascularization responses induced by bFGF, they could underestimate mild vessel growth, such as that occurring in response to PRL antibodies. Thus the number of leading vessels reaching the implant was used as an additional score for proangiogenic actions of anti-PRL antibodies. Both anti-16-kDa PRL and anti-23-kDa PRL antibodies increased the number of these vessels over preimmune antibody values. To control for nonspecific reactions to antigen-antibody interactions, 36 corneas were treated with 2 μ g BSA, anti-BSA antibodies, or their combination, with no positive responses detected (data not shown).

Similar results were obtained with the use of the monoclonal anti-23-kDa PRL antibody (Fig. 6). A 47% incidence of neovascularization, accompanied by a larger number of vessels, was observed in corneas implanted with anti-PRL monoclonal antibody (Fig. 6). One third to one fifth of these responses, however, appeared to be nonspecific, because they were elicited by nonimmune mouse antibodies.

PRL Receptor Immunoreactivity in Corneal Epithelium

The presence of PRL receptors in corneal epithelium was investigated in an attempt to elucidate a possible extraocular origin for PRL in the cornea. Here, PRL receptors could function as an avenue for the incorporation into the cornea of PRL known to be present in tears.²³ The U5 anti-PRL receptor monoclonal antibody detected PRL-receptorlike immunoreactivity in epithelial cells throughout the cornea (Fig. 7). Specificity of immunostaining was validated by a similar positive

reaction observed with the other three anti-PRL-receptor monoclonal antibodies used (U6, T1, and T6; data not shown) and by the lack of a reaction in the absence of primary antibodies or after their replacement with nonimmune mouse IgGs (Fig. 7).

DISCUSSION

Neovascularizations are the most frequent causes of blindness worldwide. Intraocular neovascularization occurs in, among other disorders, diabetic retinopathy, ischemic retinal vein occlusion, retinopathy of prematurity, corneal transplantation, and ocular trachoma. Angiogenesis in the eye may be the result of an imbalance between stimulatory and inhibitory factors that presumably occurs from the elevated expression of local angiogenic factors induced by ischemia.^{24,25} Various angiogenic factors have been proposed to mediate vasoproliferative eye diseases, including bFGF, insulin-like growth factor-1, and, most important, vascular endothelial growth factor.²⁴⁻²⁷ However, the imbalance responsible for the pathologic angiogenesis may also result from downregulation of inhibitors of blood vessel growth.⁴⁻⁶

Several angiogenesis inhibitors have been described, some of which correspond to fragments of larger proteins.⁵ The latter include angiostatin, a 36-kDa internal fragment of plasminogen²⁸; endostatin, the 20-kDa C-terminal fragment of collagen XVIII²⁹; an internal fragment of platelet factor 4³⁰; fragments of laminin³¹; peptides derived from thrombospondin³²; and the 14-kDa and 16-kDa N-terminal fragments of PRL.^{10,12}

PRL fragments of 14 kDa and 16 kDa inhibit endothelial cell proliferation.⁸⁻¹⁰ Similarly, 16-kDa PRL inhibits the activa-

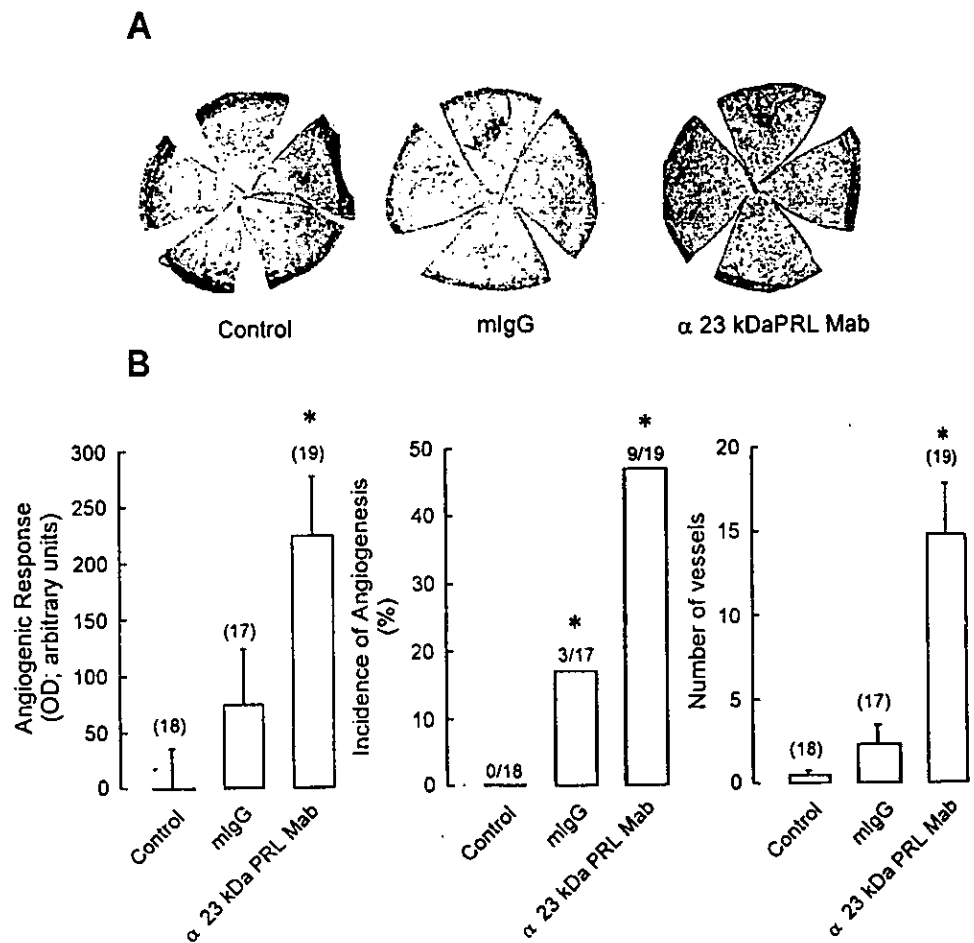


FIGURE 6. Induction of corneal angiogenesis by an anti-PRL monoclonal antibody. (A) Representative corneas implanted with vehicle (control) or with 2 μ g of either non-immune mouse antibodies (mIgG) or anti-23-kDa PRL monoclonal antibody (α 23-kDa PRL Mab). (B) Corneal angiogenesis in response to the respective antibodies was evaluated by the quantitation of the OD associated with stained capillaries (*left*), the incidence of angiogenesis (*middle*), and the number of vessels reaching the implants (*right*). Other conditions are as described in Figures 1 and 2. * $P < 0.05$ versus vehicle-treated control.

tion of urokinase,¹¹ a protease involved in endothelial cell migration, and tube formation by endothelial cells in vitro.¹⁰ Moreover, 16-kDa PRL inhibits the in vivo formation of blood vessels in the chick embryo CAM.¹⁰ PRL fragments with anti-angiogenic effects appear to be produced by the enzymatic proteolysis of 23-kDa PRL in both the anterior and posterior lobes of the pituitary gland and are found in the circulation.^{11,12,33} Moreover, endothelial cells from different blood vessels and species have been shown to express the PRL gene,³⁴⁻³⁶ and endothelia-derived PRL molecules have been found to affect endothelial cell proliferation.³⁴ The placenta produces proliferin and PRP, two PRL-like proteins that stimulate and inhibit angiogenesis, respectively.¹³ Both proteins have been implicated in the regulation of placental neovascularization.¹³ Accordingly, various lines of evidence provide support to the hypothesis that members of the PRL family function as potential regulators of angiogenesis.

In the present study we used the rat cornea to investigate this hypothesis. The cornea provides a well characterized bioassay for angiogenesis, in which the elicitation of an angiogenic reaction is a convincing demonstration of true neovascularization, because this organ is normally avascular.¹⁴ With this assay we have evaluated the in vivo antiangiogenic action of 16-kDa PRL on the well-known angiogenic effect of bFGF. In addition, we have treated corneas with anti-PRL antibodies in an attempt to unmask possible PRL-like proteins involved in tissue avascularity. Antibody administration to corneas has been a valuable tool for the detection of molecules active in angiogenesis.³⁷

Corneal angiogenesis was quantitated through measurement of densitometric (OD) values associated with stained capillaries, which also allowed a qualitative determination of the incidence of angiogenesis. These parameters provided reliable dose-response quantitations of bFGF-induced angiogenesis. Active doses of bFGF were similar to effective ones previously described in this assay.³⁷ Addition of 16-kDa PRL reduced bFGF-induced angiogenesis by 65%, when judged by the ODs of the treated area. Moreover, 16-kDa PRL reduced by 50% the incidence of bFGF-induced angiogenesis. Sixteen-kDa PRL was active at a dose five times lower than the effective one in the CAM assay.¹⁰ This in vivo inhibitory effect of 16-kDa PRL is consistent with the previously described antiangiogenic effect of PRP,¹³ the placental PRL-like protein that competes for 16-kDa PRL receptor in endothelial cells.⁹ PRP was shown to inhibit bFGF-induced vessel growth in rat corneas.¹³ However, 23-kDa PRL did not modify bFGF angiogenic action. This absence of effect is to be expected because 23-kDa PRL does not bind to 16-kDa PRL receptors in endothelial cells.⁹ Receptors mediating the antiangiogenic actions of PRL fragments differ from the classic (cloned) PRL receptors, both structurally and functionally.⁹ Thus, 23-kDa PRL has been shown to be inactive in angiogenesis, in endothelial cells both in vitro and in vivo, and in the microvasculature of the CAM.^{8,10}

The in vivo antiangiogenic action of 16-kDa PRL was originally described in the CAM.¹⁰ The CAM in the early chick embryo (days 6-9) is a rapidly growing membrane where angiogenesis actively occurs in response to multiple stimula-

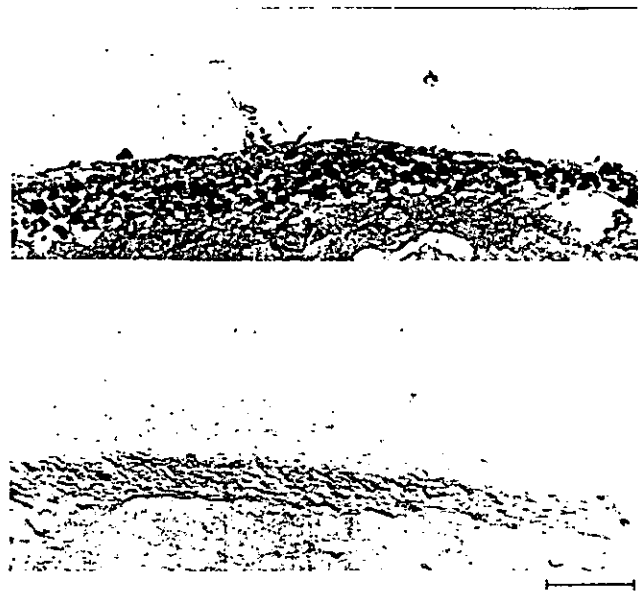


FIGURE 7. Immunoperoxidase identification of the PRL-receptor in corneal epithelial cells. *Top*: immunostaining with U-5 anti-PRL-receptor monoclonal antibody (100 µg/ml). *Bottom*: control section where nonimmune mouse IgG (100 µg/ml) was substituted for primary antibodies. Scale bar, 40 µm.

tory factors. In the present study we showed that 16-kDa PRL inhibited the *in vivo* effect of a defined stimulator of angiogenesis, bFGF. Inhibition by 16-kDa PRL of the *in vivo* angiogenic effect of bFGF matches the reported 16-kDa PRL inhibition of bFGF-induced proliferation of endothelial cells in culture.^{8,10} Actually, it is known that this PRL fragment inhibits the mitogenic effect of bFGF and vascular endothelial growth factor by acting distal to their receptors and proximal to the mitogen-activated protein kinases, specifically by inhibition of the activation of Raf-1.^{38,39} The fact that 16-kDa PRL inhibits the *in vivo* effect of bFGF is consistent with the notion that PRL-like proteins can counteract the net stimulatory effect of angiogenic factors.

In an attempt to investigate whether endogenous PRLs are involved in the control of cornea avascularity, we studied the effect of neutralizing the action of endogenous PRL with PRL-directed antibodies on corneal neovascularization. The polyclonal and monoclonal PRL antibodies used reacted with both 23-kDa and 16-kDa PRL standards by ELISA and western blot. All these antibodies resulted in corneal angiogenic responses. The number of long capillary vessels was increased in the area surrounding antibody-releasing implants. Accordingly, treatment with anti-PRL antibodies was associated with higher ODs in these areas, and therefore, with a substantial stimulation of the incidence of angiogenesis. Specificity of antibody action was supported by significant differences between nonimmune rabbit and mouse IgG. However, mouse IgG produced a moderate angiogenic reaction, perhaps because of inflammation. Nevertheless, the anti-PRL monoclonal antibody induced a significant response three times higher than this control. The possibility that inflammation related to antigen-antibody interaction contributed to the angiogenic effect of anti-PRL antibodies is unlikely, because no angiogenic response followed co-treatment of corneas with BSA and anti-BSA antibodies.

The possibility that angiogenesis induced by PRL antibodies is caused by blockage of the antiangiogenic effect of endogenous PRL-like molecules, raises various intriguing issues. This novel proposal requires that PRL-like molecules, specifically PRL fragments and/or other antiangiogenic PRL forms, be present in the cornea. Although these PRLs must be determined and identified, their presence in the cornea is likely. We have recently detected immunoreactive PRL in the aqueous fluid of humans,⁴⁰ and rat retinal endothelial cells have been found to express the PRL gene.³⁶ Moreover, PRL receptors have been identified in the retina,⁴¹ and PRL has been proposed to play a role in the metamorphosis of visual pigments in amphibians.⁴² In addition, PRL has been shown to be synthesized by acinar cells of lacrimal glands.⁴³ These cells express the PRL mRNA and locate PRL-like immunoreactivity in secretory vesicles.⁴³ Consistent with this, PRL has been detected in human tears,²³ and evidence has been provided to suggest that its presence in tears is under systemic hormonal control.⁴⁴ Actually, it has been proposed that this hormone may have a role in the physiology of the cornea, the conjunctiva, or the conjunctiva-associated lymphoid tissue.⁴³ In this regard, it can be hypothesized that antiangiogenic PRLs present in the cornea could originate from lacrimal PRL and thus could have an extraocular origin. Consistent with this proposal, immunocytochemistry with four well-characterized PRL receptor monoclonal antibodies, showed that receptors for prolactin seemed to be located throughout the corneal epithelium. Because PRL is known to be taken up by receptor-mediated endocytosis in several cell types,^{45,46} it is possible to hypothesize that epithelial cells in the cornea may bind and internalize the PRL present in tears, and thus provide an avenue for the incorporation of lacrimal PRL into this organ. Therefore, these results add support to the presence of PRL in the cornea and provide an insight into the possible extraocular origin of this hormone.

No conclusions can be drawn on the nature of the possible contribution of PRLs to cornea avascularity. Sixteen-kDa PRL may be a candidate, because it inhibits corneal neovascularization, and it reacts with all the antibodies used. Alternatively, other PRL-like proteins may be involved, as suggested by the fact that the 16-kDa PRL-directed antibodies were less active in corneal blood vessel growth than antibodies raised against the whole 23-kDa PRL molecule.

The present study provides observations consistent with the hypothesis that members of the PRL family may function as regulators of angiogenesis, specifically in the maintenance of corneal avascularity. The presence of PRL receptors in ocular tissues similar to those of the cornea further supports the eye as a novel target for PRL actions. Identification of PRL in ocular tissues and fluids and its possible ocular and/or extraocular origin are under current investigation.

Acknowledgments

The authors thank Gabriel Nava and Leopoldo González-Santos for their expert technical assistance.

References

1. Bategay BJ. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med.* 1995;73:333-346.
2. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular rheumatoid arthritis and other diseases. *Nat Med.* 1995;1:27-31.
3. Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessels formation. *Trends Biochem Sci.* 1997;22:251-256.

4. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol Ther.* 1994;63:265-311.
5. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. In: Goldberg ID, Rosen EM, eds. *Regulation of Angiogenesis*. Basel: Birkhäuser Verlag; 1997:1-8.
6. Moses MA, Sudhalter J, Langer R. Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science*. 1990;248:1408-1410.
7. Clapp C, Martínez de la Escalera G. Prolactins: novel regulators of angiogenesis. *News Physiol Sci*. 1997;12:231-237.
8. Ferrara N, Clapp C, Weiner R. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology*. 1991;129:896-900.
9. Clapp C, Weiner R. A specific, high-affinity, saturable binding site for the 16-kDa fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology*. 1992;130:1380-1386.
10. Clapp C, Martial JA, Rentier-Delrue F, Guzman R, Weiner R. The 16-kDa N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*. 1993;133:1292-1299.
11. Lee H, Struman I, Clapp C, Martial J, Weiner R. Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology*. 1998;139:3696-3703.
12. Clapp C, Torner L, Gutiérrez-Ospina G, et al. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophysial system and the protein is processed into a 14 kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:10384-10388.
13. Jackson D, Volpert OV, Bouck N, Linzer DH. Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin related protein. *Science*. 1994;266:1581-1584.
14. Auerbach R, Auerbach W, Polakowski I. Assay for angiogenesis: a review. *Pharmacol Ther.* 1991;51:1-11.
15. Dueñas Z, Torner L, Corbacho A, et al. Effects of 16 kDa prolactin antibodies on in vivo angiogenesis (abstract). *Endocr Soc*. 1998;80:308. Abstract P2-268.
16. Clapp C. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology*. 1987;121:2055-2064.
17. Staindl B, Berger P, Kofler R, Wick G. Monoclonal antibodies against human, bovine and rat prolactin: epitope mapping of human prolactin and development of a two-site immunoradiometric assay. *J Endocrinol*. 1987;114:311-318.
18. Okamura H, Zachwieja J, Raguei S, Kelly P. Characterization and applications of monoclonal antibodies to the prolactin receptor. *Endocrinology*. 1989;124:2499-2508.
19. Baglia AL, Cruz D, Shaw JE. An Epstein-Barr virus-negative Burkitt lymphoma cell line (sRamos) secretes a prolactin-like protein during continuous growth in serum-free medium. *Endocrinology*. 1991;128:2266-2272.
20. Signorella A, Hymer WC. An enzyme-linked immunosorbent assay for rat prolactin. *Anal Biochem*. 1984;136:372-381.
21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.
22. Polverini PJ, Bouck NP, Rastinejad F. Assay and purification of naturally occurring inhibitor of angiogenesis. *Methods Enzymol*. 1991;198:440-450.
23. Frey WH, Nelson JD, Frick ML, Elde RP. Prolactin immunoreactivity in human tears and lacrimal gland: possible implication for tear production. In: Holly FJ, ed. *The Preocular Tear Film in Health, Disease, and Contact Lens Wear*. Lubbock, TX: The Dry Eye Institute; 1986:798-807.
24. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*. 1994;331:1480-1487.
25. Takagi H, King LG, Ferrara N, Aiello P. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor *KDR/Flk* gene expression through adenosine A2 receptors in retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:1311-1321.
26. Sivalingam A, Kenney J, Brown GC, Benson WE, Donoso L. Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1990;108:869-872.
27. Meyer-Schwickerath R, Pfeiffer A, Blum WK, et al. Vitreous levels of the insulin-like growth factors I and II, and the insulin-like growth factor binding protein 2 and 3, increased in neovascular eye disease: studies in non-diabetic and diabetic subjects. *J Clin Invest*. 1993;92:2620-2625.
28. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994;79:315-328.
29. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*. 1997;882:277-285.
30. Gupta SK, Hassel T, Singh JP. A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:7799-7803.
31. Sakamoto N, Iwahana M, Tanaka NG, Osaka Y. Inhibition of angiogenesis and tumor growth by a synthetic laminin peptide, CDP-GYIGSR-NH2. *Cancer Res*. 1991;51:903-906.
32. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, et al. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:6624-6628.
33. Torner L, Mejía S, López-Gómez F, et al. A 14 kDa prolactin-like fragment is secreted from the hypothalamo-neurohypophysial system of the rat. *Endocrinology*. 1995;136:5454-5460.
34. Clapp C, López-Gómez FJ, Nava G, et al. Expression of prolactin mRNA and prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *J Endocrinol*. 1998;158:137-144.
35. Corbacho A, Macotela Y, Torner L, et al. Synthesis and secretion of prolactin-like proteins in endothelial cells (abstract). *Endocr Soc*. 1997;79:465. Abstract P3-116.
36. Ochoa A, Dueñas Z, Corbacho A, et al. Isolation, culture and characterization of rat retinal endothelial cells. Evidence for the expression of prolactin by retinal endothelium (abstract). *Endocr Soc*. 1998;80:76. Abstract OR18-4.
37. Pandey A, Shao H, Marks RM, Polverini PJ, Dixit VM. Role of B61, the ligand for the Eck receptor tyrosine kinase, in TNF- α -induced angiogenesis. *Science*. 1995;268:567-569.
38. D'Angelo G, Struman I, Martial JA, Weiner RI. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:6374-6378.
39. Weiner RI, D'Angelo G. Signaling for the antiangiogenic action of 16 k prolactin. *Proc Am Assoc Cancer Res*. 1996;37:667-668.
40. Caicedo R, Nava G, Dueñas Z, et al. Determinación de prolactina y su ARN mensajero en tejidos y fluidos oculares de pacientes con retinopatía del prematuro (abstract). *Mex Physiol Sci Soc*. 1998;41:89. Abstract O-107.
41. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly P. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*. 1998;19:225-268.
42. Crim JW. Prolactin-tyroxine antagonism and the metamorphosis of visual pigments in *Rana catesbeiana tadpoles*. *J Exp Zool*. 1975;192:355-362.
43. Mircheff AK, Warren AW, Wood RL, Tortoriello PJ, Kaswang RL. Prolactin localization, binding, and effects on peroxidase release in rat exorbital lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33:641-650.
44. Huang ZM, Low A, Azzarolo AM, Mircheff AK, Warren DW. Regulation of prolactin (PRL) messenger RNA in rabbit lacrimal glands. [ARVO Abstract]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;39(4):S886. Abstract nr 4099.
45. Josefsberg Z, Posner BI, Patel B, Bergeron JJ. The uptake of prolactin into female rat liver. *J Biol Chem*. 1979;254:209-214.
46. Seddiqi T, Ollivier-Boousquet M. Temperature dependence of prolactin endocytosis and casein exocytosis in epithelial mammary cells. *Eur J Cell Biol*. 1991;55:60-70.