

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA



"EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE PROLACTINA POR EL  
 ENDOTELIO DE RETINA DE RATA: EVIDENCIAS DE  
 EFECTOS AUTÓCRINOS"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS  
 (NEUROBIOLOGÍA)**

P R E S E N T A :

**M. en C. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA**

Asesor: Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Juriquilia, Querétaro, Enero del 2002.

**TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Este trabajo se llevó a cabo en el Centro de Neurobiología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, y contó con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

### **Abreviaciones utilizadas frecuentemente:**

**ADN:** Acido desoxiribonucleico.  
**BBCEC:** Células endoteliales de capilares de corteza bovina.  
**bFGF:** Factor de crecimiento básico de fibroblastos.  
**CAM:** Membrana corioalantotódea.  
**CE:** Células endoteliales.  
**CERR:** Células endoteliales de retina de rata.  
**Err Std:** Error estándar.  
**GH:** Hormona de crecimiento.  
**HUVEC:** Células endoteliales de vena de cordón umbilical humanas.  
**IGF:** Factor de crecimiento semejante a la insulina.  
**JAK:** Cinasa Janus.  
**LC:** Lisado celular.  
**MAPK:** Cinasa de proteínas activada por mitógeno.  
**mARN:** Acido ribonucleico mensajero.  
**WC:** Medio condicionado.  
**MD:** Monocapa dañada.  
**MEC:** Matriz extracelular.  
**WIN:** Monocapa normal.  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.  
**PEDF:** Factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentado.  
**PL:** Lactógeno placentario.  
**PLF:** Proliferina.  
**PRL:** Prolactina.  
**PRLR:** Receptor de la PRL.  
**PRP:** Proteína relacionada a la proliferina.  
**SNC:** Suero Normal Conejo.  
**Stat:** Translocadores activados por la transducción de señales.  
**Sub:** Subconfluencia.  
**TGF:** Factor de crecimiento transformante.  
**TSP-I:** Trombospondina.  
**VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular.

## ABSTRACT

Prolactin (PRL) isoforms of 23 and 16 KDa stimulate and inhibit blood vessel growth, respectively, and could be involved in the regulation of ocular angiogenesis. Both proteins have been detected in ocular fluids and tissues from rats and humans. In addition, the local treatment with antibodies anti-PRL induces corneal angiogenesis. In a previous work we showed that endothelial cells from rat retinal capillaries express PRL mRNA. The present study confirms the expression of prolactin mRNA in retinal endothelium by *in situ* hybridization, and the translation of PRL messenger to a 23 KDa protein, as has been shown by immunocytochemistry, Western blot analysis and ELISA. In order to explore if PRL is secreted to the culture medium from rat retinal endothelial cells, we detected PRL-like antigens in the conditioned media of retinal endothelium by Western blot and ELISA. The bioactivity of this PRL was confirmed using Nb2 cell bioassay. The possibility of an autocrine role of PRL in retinal endothelium was obtained by the detection of the PRL receptor mRNA by Southern blot analysis. We were also able to detect that PRL receptor mRNA increases its expression in response to bFGF and injury. Activation of the PRL receptor signal transduction pathway was observed in injured monolayers of retinal endothelial cells. Furthermore, the bFGF-stimulated proliferation of retinal endothelium was inhibited in the presence of PRL antibodies. These results support the hypothesis that PRL is an autocrine regulator of retinal endothelial cell proliferation.

Isoformas moleculares de 23 y 16 kDa de la proíactina (PRL) estimulan e inhiben la angiogénesis, respectivamente, y podrían estar involucradas en el control de la angiogénesis ocular. Ambas proteínas se han detectado en tejidos y fluidos oculares de ratas y humanos y el tratamiento local con anticuerpos anti-PRL induce angiogénesis en la córnea. En un estudio previo se demostró que células endoteliales de la microcirculación de la retina expresan el mRNA de la PRL. En este trabajo se corroboró la expresión de este mensajero utilizando hibridación *in situ*, y se exploró su traducción a proteína, secreción al medio de cultivo y bioactividad. Asimismo, se abordó la posibilidad de que la PRL del endotelio de retina de rata tuviera efectos autócrinos a través de analizar la expresión de su receptor, la activación de la vía de transducción de señales y su proliferación en presencia de anticuerpos capaces de inmunosequestrar a la PRL endógena. Mediante inmunocitoquímica, análisis de Western blot y ELISA se determinó la producción y secreción de PRL al medio de cultivo de las células endoteliales de retina de rata. Utilizando el bioensayo en la línea de Sinfonía de rata Nb2, se observó que la PRL producida por este endotelio presenta actividad biológica. El análisis por Southern blot de productos retrotranscritos y amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) detectó la presencia del ARN mensajero del receptor largo de PRL. Esta expresión fue mayor en células tratadas con bFGF y en monocapas dañadas mecánicamente. Estos resultados concuerdan con la activación de la proteína Stat 5b en monocapas dañadas. Además, el tratamiento con anticuerpos anti-PRL, pero no con anticuerpos pre-inmunes, inhibió la proliferación celular estimulada por el bFGF. Estos resultados son consistentes con una posible estimulación autócrina de la proliferación endotelial vía el receptor de PRL.

## INTRODUCCIÓN

### La Angiogénesis

El Sistema Vascolar está compuesto por arterias y venas, las cuales al ramificarse dan lugar a arteriolas y vénulas, respectivamente, a las que también se les denomina como vasos sanguíneos o capilares. Estos últimos están compuestos por una pared delgada de células endoteliales (CE) que conforman el lumen del capilar, y por los pericitos que son células de músculo liso que rodean al endotelio (D'Amore, P. *et al.*, 1999).

Los vasos sanguíneos se forman a partir de dos procesos: 1) la vasculogénesis, la cual da origen a los vasos a partir de precursores de las células endoteliales llamados angioblastos, y 2) la angiogénesis, que consiste en la formación de un nuevo vaso sanguíneo a partir de uno ya existente, usualmente de una vénula. La vasculogénesis se presenta primordialmente durante la embriogénesis, y su principal fin es establecer de *novo* la red vascular, mientras que la angiogénesis es un proceso restringido a ciertas condiciones fisiológicas del adulto como lo son la reparación tisular, o eventos del sistema reproductivo de las hembras (embarazo, lactancia, ciclo estral, menstruación). Exceptuando estas situaciones, el desarrollo de un proceso angiogénico en organismos ya formados es una condición asociada a diversas patologías involucradas con enfermedades autoinmunes como la uveítis o la artritis reumatoide, con el crecimiento de tumores y metástasis, o con retinopatías como la diabética o la del prematuro, a las cuales se les hará énfasis posteriormente (D'Amore, P. *et al.*, 1999 y Yancopoulos, G. *et al.*, 1998).

La angiogénesis es un proceso dinámico en el que ocurren diversos eventos individuales. Estos están representados esquemáticamente en la **Figura 1**. Para que un vaso sanguíneo se llegue a formar es necesario que factores de crecimiento estimulen a las células endoteliales (a), las cuales degradan la membrana basal mediante el efecto de diversas proteasas (b), lo que permite la migración y la proliferación de las células (c). En la migración del endotelio

participan diversas moléculas de adhesión que regulan la interacción célula-matriz extracelular. Posterior a la migración y proliferación, el endotelio se organiza tridimensionalmente para formar lo que será el lumen del nuevo vaso sanguíneo (d). En este evento están involucradas moléculas de adhesión que regulan la interacción célula-célula. Hasta este momento, el tubo sanguíneo recién formado constituye una red vascular primaria, la cual debe someterse a un proceso de remodelación para formar vasos maduros de mayor tamaño. La remodelación de los vasos está dada por el reclutamiento de células mesenquimales que se diferenciarán a pericitos, los cuales estabilizan la nueva vasculatura. Los pericitos son atraídos por el endotelio para que cubran la nueva red capilar dándole, de esta forma, protección y estabilización (e). Los vasos que no han sido cubiertos o estabilizados son susceptibles de sufrir un proceso de regresión. Este paso de estabilización del vaso sanguíneo recién formado constituye el evento final del proceso angiogénico (Klagsbrun, M. y Moses, M., 1999). Sin embargo, la angiogénesis no es un proceso del todo o nada. La dinámica para establecer un vaso sanguíneo es la consecuencia del balance que se presenta entre factores estimuladores o inhibidores de cualquiera de los pasos mencionados anteriormente de la cascada angiogénica, de tal forma que el resultado neto puede ser iniciar, mantener o alternativamente inhibir este proceso (Figura 2). Cabe señalar que en condiciones fisiológicas normales el balance favorece a los factores inhibidores y como consecuencia el endotelio se encuentra en un estado de quiescencia (Lelkes, P. *et al.*, 1996).

En los últimos 20 años se ha descrito una gran variedad de factores angiogénicos, los cuales comprenden a diversos grupos de moléculas como lo son factores de crecimiento, enzimas, citocinas, hormonas o quimiocinas (Figura 2). Entre los principales activadores del proceso angiogénico se encuentran miembros de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), los cuales ejercen una función predominante como factores proangiogénicos sobre las CE (Klagsbrun, M. y D'Amore, P., 1996).

Con respecto a los factores inhibidores de la angiogénesis o angiostáticos, también se ha descrito el efecto de moléculas con características diversas como lo



son péptidos proteolíticos, proteínas de la matriz extracelular (MEC), inhibidores de enzimas, citocinas, hormonas o quimiocinas (Figura 2). Dentro de los principales factores antiangiogénicos caracterizados que actúan directamente sobre las CE como inhibidores endógenos se encuentra la molécula de matriz extracelular Trombospondina-1 (TSP-1) (Zetter, B., 1998). Este mismo efecto se ha reportado para fragmentos peptídicos provenientes de moléculas de mayor tamaño originados por proteólisis como lo son la Angiostatina, correspondiente al fragmento interno de 38 kDa del plasminógeno (O'Reilly, M.S. *et al.*, 1994) , la Endostatina, que es el fragmento de 20 kDa carboxilo-terminal de la colágena XVIII (O'Reilly, M.S. *et al.*, 1997), o el fragmento de 16 kDa amino-terminal de la Proiactina (PRL) (Clapp, C. *et al.*, 1993). En estos casos las moléculas completas no poseen efectos antiangiogénicos.

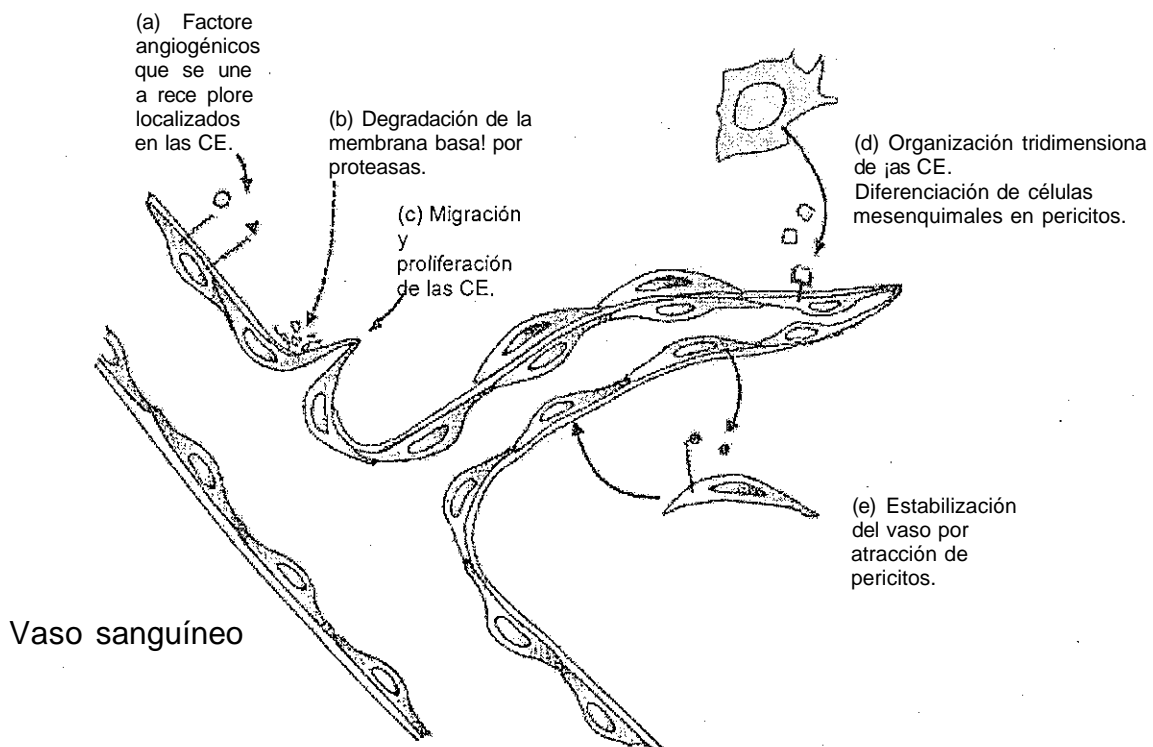
En la Figura 2 se observa que existen factores como el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que tienen efectos antagónicos sobre la angiogénesis, es decir pueden ser inhibidores o estimuladores, dependiendo del modelo valorado. El TGF- $\beta$  es angiostático *in vitro*, pero angiogénico *in vivo* (Pepper, M.S., 1997). Otras moléculas, como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), produce efectos antagónicos dependiendo de la dosis (Fajardo, L. *et al.*, 1992).

Muchos de los factores enlistados en la Figura 2 poseen efectos específicos sobre la angiogénesis. Sin embargo, existen moléculas que presentan un amplio espectro de acción más allá de la regulación de la formación de vasos sanguíneos. Un ejemplo de estas moléculas son las hormonas.

La regulación por hormonas de la angiogénesis es un fenómeno complejo, dado que estas pueden ser producidas como factores autócrinos por las CE, de manera similar a como acontece con muchos otros reguladores, o bien pueden tener efectos indirectos sobre el endotelio, actuando sobre otros tipos celulares para inducir en ellos la producción de reguladores angiogénicos (Corbacho, A. *et al.* 2001).

Dentro de las hormonas que son producidas por las CE, se encuentran miembros de la familia de la PRL, como es el caso del fragmento antiangiogénico de 16 kDa que se mencionó anteriormente.

En la siguiente sección se describirá más detalladamente el efecto que ejercen moléculas pertenecientes a esta familia de hormonas sobre la angiogénesis.



**Figura 1.-** Eventos individuales que ocurren en la angiogénesis. (a) Estimulación de las células endoteliales. (b) Degradación de la membrana basal. (c) Migración y proliferación de las células endoteliales. (d) Organización tridimensional del endotelio para formar el lumen del vaso, (e) Estabilización del vaso sanguíneo. (Tomado de Klagsbrun, M. y Moses, M., 1999).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



molecular de 22-23 kDa. La estructura terciaria de la PRL y la GH está estabilizada por puentes disulfuro y la componen cuatro alpha-hélices antiparalelas (Ben-Jonathan, N. *etal.*, 1996 y Bole-Feysot *et al.*, 1998).

Dentro de las funciones biológicas que se han descrito para la PRL se encuentran aquellas que ejerce sobre la reproducción, la osmoregulación, la conducta, la regulación inmune, el crecimiento, el metabolismo, y recientemente se han descrito acciones sobre la angiogénesis. Estas funciones las lleva a cabo actuando de manera autócrina, parácrina o endocrina, siendo su principal fuente de producción los lactotrofos de la hipófisis anterior. Sin embargo, su producción se ha detectado en numerosos tejidos extrahipofisarios. Por mencionar algunos, la expresión del gen de la PRL o de la proteína se ha reportado en miometrio, decidua, cerebro, glándula lagrimal, timo, bazo, epitelio mamario, piel, pulmón, células inmunes, fluido cerebroespinal, lágrimas, sudor, leche, líquido amniótico, líquido folicular y, como ya se mencionó, en el endotelio. Esta amplia diversidad en su síntesis, explica parcialmente su amplio espectro de acción, el cual también puede deberse a la diversidad estructural de la hormona y a la de sus receptores (Ben-Jonathan, N. *etal.*, 1996 y Bole-Feysot, C. *etal.*, 1998).

Por lo que respecta a la diversidad molecular de la PRL, ésta en su forma nativa de 23 kDa sufre diversas modificaciones postraduccionales, como lo son la glicosilación, la fosforilación, la dimerización, la agregación o bien el corte por enzimas proteolíticas que generan el fragmento amino terminal de 16 kDa, y el carboxilo terminal de 8 kDa. Este corte enzimático en la rata se produce entre los residuos de aminoácidos de Tyr<sup>145</sup>-Leu<sup>146</sup> y de Trp<sup>148</sup>-Ser<sup>149</sup>. El fragmento de 16 kDa se ha encontrado en la circulación de ratas y humanos, así como en la hipófisis, en el líquido amniótico y en algunos tejidos oculares de la rata como la córnea, el iris y la retina (Corbacho, A. *et al.*, 2001).

La PRL de 16 kDa comparte algunas funciones con la PRL nativa, sin embargo, presenta también efectos propios como lo son su actividad antiangiogénica *in vitro* e *in vivo* (Clapp, C. *et al.*, 1993), y la estimulación de la producción de óxido nítrico (NO) y de la isoforma inducible de la enzima que lo sintetiza (iNOS) en fibroblastos de pulmón de rata (Corbacho, A. *et al.*, 2000a).

El fragmento de 16 kDa de la PRL, comenzó a considerarse como un factor antiangiogénico cuando se demostró que inhibía la proliferación basal o la estimulada por el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) de células endoteliales bovinas provenientes de corteza cerebral (BBCEC) o de corteza adrenal (Ferrara, N. *et al.*, 1991). Un trabajo posterior reforzó esta consideración al inhibirse el proceso global de la angiogénesis en el modelo *in vivo* de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (CAM), la formación de estructuras tipo capilar por células endoteliales de cerebro bovino sobre geles de colágena (Clapp, C. *et al.*, 1993) o la inhibición de la angiogénesis en la córnea de la rata (Dueñas, Z. *et al.*, 1999a). Este efecto antiangiogénico de la PRL de 16 kDa ha sido demostrado en diversos tipos de endotelio, y también es llevado a cabo por un fragmento de la PRL de 14 kDa producido en el tracto hipotálamo-neurohipofisario de la rata (Corbacho, A. *et al.*, 2000b, Ochoa, A., *et al.* 2000, Clapp, C. *et al.*, 1994 y Clapp, C. *et al.*, 1998). Los efectos antiangiogénicos de la PRL de 16 kDa parecen ser mediados por receptores de alta afinidad localizados en las membranas de las células endoteliales a los que no se une la PRL completa. Sin embargo, este receptor no ha sido clonado ni caracterizado hasta el momento (Clapp, C. y Weiner, R., 1992).

El mecanismo de acción de la PRL de 16 kDa sobre el endotelio no se conoce, pero se han logrado elucidar algunos de los eventos que desencadena en las BBCEC. Estos incluyen: 1) la inhibición de la fosforilación de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) p42 y p44 después de su activación por los mitógenos endoteliales VEGF y bFGF (D'Angelo, G. *et al.*, 1995), 2) la inhibición de la activación de Ras inducida por el VEGF (D'Angelo, G. *et al.*, 1999), 3) la inducción de la apoptosis mediante la activación de caspasas (Martini, J.F., *et al.*, 2000) y 4) la inhibición de la actividad de urokinasa activada por el bFGF mediante un incremento en la expresión de un inhibidor de esta enzima, el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) (Lee, H., *et al.*, 1998).

Se ha puesto de manifiesto recientemente la posibilidad de utilizar al fragmento de 16 kDa de la PRL como un agente terapéutico en la inhibición de la angiogénesis tumoral. Al respecto los resultados de Bentzien, F. *et al.* (2001)

demuestran que la inyección de células tumorales productoras de PRL de 16 KDa inhibe la angiogénesis y por lo tanto el crecimiento tumoral en un modelo murino.

Se han obtenido resultados controversiales con respecto al efecto que ejerce la PRL completa sobre la angiogénesis. Evidencias de Merkle, C. *et al.* (2000) muestran la presencia del receptor para la PRL en endotelio de aorta pulmonar bovina, y en este mismo trabajo reportan efectos que apuntan hacia una posible función antiangiogénica de la hormona completa. Sin embargo, datos de Struman, I. *et al.* (1999), señalan a la PRL de 23 kDa como un factor angiogénico *in vivo*, sin efectos detectables *in vitro* sobre la proliferación de las BBCEC. A pesar de esta discrepancia y cualquiera que sea su efecto, el hecho de encontrar al receptor de la PRL en el endotelio refuerza su posible acción sobre las CE, y por lo tanto, sobre la angiogénesis.

De manera similar a como acontece con muchos de los reguladores angiogénicos, la PRL también es producida por CE de diversos orígenes como lo son los capilares del endotelio de la retina de la rata, las CE de la vena de cordón umbilical humana (HUVEC) o las BBCEC. Esta producción se ha detectado tanto al nivel de la expresión de su ácido ribonucleico mensajero (mARN) como al nivel de la proteína completa y, en algunos casos, de ciertas variantes moleculares de la misma como lo es la PRL de 16 kDa en HUVEC (Corbacho, A. *et al.*, 2000b, Ochoa, A., *et al.* 2000, y Clapp, C. *et al.*, 1998).

También se han reportado los efectos de otras hormonas lactogénicas sobre la angiogénesis. Al respecto se ha planteado una correlación directa entre el grado de neovascularización inducida por hipoxia en la retina y los niveles de GH (Smith, L.E. *et al.*, 1997). Este hecho se refuerza con el hallazgo de que la GH humana es capaz de estimular la proliferación de células endoteliales de retina humana (Rymaszewski, Z. *et al.*, 1991), y de igual forma de tener efectos angiogénicos *in vivo* estimulando el crecimiento de vasos sanguíneos en el modelo de la CAM. Este efecto *in vivo* se ha reportado también para la GH bovina o de pollo (Gould, J. *et al.*, 1995).

Algunas hormonas lactogénicas placentarias también se han involucrado con el crecimiento de vasos sanguíneos. Tal es el caso del lactógeno placentario

(PL), de la Proliferina (PLF) y de la Proteína relacionada a la Proliferina (PRP). El PL es capaz de unirse con alta afinidad al receptor de la PRL, por lo que los efectos sobre angiogénesis que se han reportado para esta hormona son similares a los de la PRL: en modelos *in vitro* no tiene efecto, pero *in vivo* estimula el crecimiento de vasos sanguíneos (Jackson, D., *et al.*, 1994).

Por lo que respecta a la PLF y a la PRP, la primera ejerce efectos estimulatorios y la segunda inhibitorios sobre la angiogénesis tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Jackson, D. *et al.*, 1994).

La PRP ha sido considerada recientemente como un posible agente terapéutico anti-tumoral, dado que logra inhibir el crecimiento de tumores *in vivo*, a través de inhibir la vascularización de los mismos (Bengtson, N. y Linzer, D.I., 2000).

Como se mencionó anteriormente, la diversidad funcional de la PRL también es el resultado de la diversidad morfológica de los receptores a los que se une. Estos pertenecen a la clase 1 de la superfamilia de receptores para citocinas. Proviene de la edición alternativa del gen que los codifica, dando lugar a proteínas que difieren en la longitud y composición de sus dominios intracitoplasmáticos. La rata es la especie en la que mejor se han caracterizado estas isoformas que comprenden una forma larga (80-85 kDa), una forma intermedia (65 kDa) y una forma corta (45 kDa). Sin embargo, en todos los casos, el dominio extracelular de unión a la PRL es idéntico. La activación del receptor de la PRL comprende su homodimerización por efecto de unión de la hormona, y la posterior activación de la vía de la cinasa Janus (JAK) y de los translocadores activados por la transducción de señales (Stat) principalmente (Bole-Feysot, C. *et al.* 1998).

La expresión del receptor de PRL es ubicua, sin embargo la proporción de las variantes expresadas puede variar de tejido a tejido, y de igual forma depender del estado fisiológico del individuo, lo que ayuda a comprender la diversidad funcional de la PRL.

## La Angiogénesis en la retina

El estudio de la angiogénesis ocular tiene una gran relevancia clínica dado que la neovascularización de la retina es la causa más común de ceguera en todo el mundo, asociada principalmente a la retinopatía diabética. Sin embargo, existen otras enfermedades en la retina en las que también se presenta neovascularización como lo son la retinopatía del prematuro o la oclusión de la vena retiniana. Todas las patologías anteriores son originadas principalmente por hipoxia o isquemia y se les refiere como retinopatías isquémicas (Campochiaro, P.A., 2000).

El desarrollo vascular de la retina se origina a partir de la combinación de mecanismos de vasculogénesis y de angiogénesis. Ocurre tardíamente durante el desarrollo embrionario comparándolo con la mayoría de los procesos de la ontogenia. En algunas especies como en la rata, el establecimiento de la red vascular retiniana se completa después del nacimiento, mientras que en el humano se completa un poco antes del mismo (Campochiaro, P.A., 2000, y Stone, J. y Maslim, J., 1997).

A la retina ya irrigan dos lechos vasculares: los vasos retinianos y los vasos coroidales. Los vasos retinianos se forman a partir de la ramificación de la arteria retiniana central, la cual entra al ojo a través del nervio óptico. Estos vasos corren a lo largo de la superficie de la retina y se forman por vasculogénesis. Posteriormente<sup>1</sup> estos vasos se ramifican mediante angiogénesis irrigando los dos tercios internos de la retina. La retina externa se conserva completamente avascular recibiendo el aporte de nutrientes y de oxígeno de la circulación de la coroides (Campochiaro, P.A., 2000, y Stone, J. y Maslim, J., 1997).

En el adulto se puede encontrar remodelación de la red vascular retiniana ya establecida. Si aumenta la tensión de oxígeno se puede presentar regresión vascular, pero si se presentan isquemia moderada u oclusiones parciales de la vena retiniana central pueden resultar en la formación colateral de vasos sanguíneos no patológica, poniéndose de manifiesto la relevancia fisiológica de la hipoxia (Stone, J. y Maslim, J., 1997).



En la formación de vasos sanguíneos de la retina tanto patológica como fisiológica, intervienen muchos factores reguladores de la angiogénesis producidos localmente, siendo particularmente relevante el VEGF, el cual se expresa principalmente en respuesta a la hipoxia. En retinas de rata en desarrollo la expresión del VEGF se correlaciona en tiempo y espacio con los vasos en formación (Murata, T. *et al.*, 1996). Cuando se presenta hipoxia, el incremento de expresión del VEGF no solo se concentra en las células endoteliales, sino que también es expresado en otros tipos celulares de la retina como lo son astrocitos, células de Müller, o epitelio pigmentado. Asimismo, la expresión de los receptores que median las acciones del VEGF también aumenta cuando disminuye la concentración de oxígeno, solo que esta expresión se da principalmente en las células endoteliales de los capilares de la retina (Takagi, H. *et al.*, 1996).

El incremento de expresión del VEGF también se correlaciona con diversas patologías vasoproliferativas oculares como son la retinopatía diabética, la oclusión de la vena retiniana central o los tumores oculares (Pe'er, J. *et al.*, 1995 y Aiello, L.P. *et al.*, 1994).

La participación de otros factores angiogénicos como el bFGF sobre la proliferación de vasos en la retina no es del todo clara. Al respecto, trabajos con ratones transgénicos que expresan el bFGF fusionado con el promotor de la rodopsina, no muestran ningún cambio morfológico en la retina, ni en la vascularización de la misma, la cual no es modificada en respuesta a la hipoxia (Ozaki, H. *et al.*, 1998). El crecimiento de vasos sanguíneos en estos ratones se observa únicamente si hay daño celular en la retina (Yamada, H. *et al.*, 2000).

Otro mecanismo estimulador de la angiogénesis en la retina puede ser la expresión de factores permisivos que contribuyen a un incremento del efecto del VEGF. Al respecto se han reportado los efectos de la insulina incrementando la expresión del VEGF (Lu, M. *et al.*, 1999) o del estradiol incrementando la expresión de uno de sus receptores (Suzuma, I. *et al.*, 1999).

La posibilidad de un efecto de diversos miembros pertenecientes a la familia del factor de crecimiento tipo insulina (IGF) se ha propuesto sobre la angiogénesis secundaria a la isquemia, ya que se ha encontrado elevada la expresión de los

mismos en el humor vitreo de pacientes con diversas retinopatías (Meyer-Schwickerath, R. *et al.*, 1993).

Recientemente se ha planteado que la angiopoyetina 2, una proteína que participa en el ensamble de la red vascular durante el desarrollo, podría estar implicada en la angiogénesis retiniana tanto fisiológica como patológica, ya que los niveles del mRNA de la misma se encuentran elevados en la retina en desarrollo y en un modelo de retina isquémica (Hackett, S.F. *et al.*, 2000).

La presencia de factores inhibidores de la angiogénesis en diversos compartimentos oculares los involucra con su función reguladora en este proceso. Al respecto se ha encontrado que miembros de la familia del TGF- $\beta$  presentan una expresión constitutiva en la retina, la cual disminuye cuando hay isquemia (Mathura, J.R. *et al.*, 2000). Estos péptidos también han sido detectados en el humor acuoso (Hayasaka, K. *et al.*, 1998). En este mismo sentido se ha reportado el efecto de la trombospondina I, detectada en el vitreo y humor acuoso de ratas normales pero no en ratas diabéticas (Sheibani, N. *et al.*, 2000). Este incremento en la expresión de la trombospondina parece estar regulado por el VEGF en forma bifásica. En una fase temprana de la vascularización el VEGF la inhibe, y en una fase tardía la aumenta, deteniéndose, de esta forma, la angiogénesis inducida por el mismo (Suzuma, K. *et al.*, 1999).

El epitelio pigmentado produce un péptido denominado factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentado (PEDF) el cual tiene una potente actividad antiangiogénica en retinas isquémicas. Este factor es detectado en altas cantidades en el humor vitreo y en la retina en humanos (Dawson, D.W. *et al.*, 1999 y Stellmach, V. *et al.*, 2001).

En el establecimiento de los vasos sanguíneos de la retina se presenta toda una cascada de eventos en la que participan proteasas, inhibidores de proteasas, proteínas involucradas con la progresión del ciclo celular, moléculas de adhesión, etc. Es por ello que el desarrollo de estrategias para inhibir la vascularización patológica de la retina ha sido complicado. El principal blanco de acción, lo constituye el VEGF. Sin embargo, la vascularización inducida por este factor no ha logrado ser abolida completamente utilizando anticuerpos o secuencias

antisentido. Actualmente la principal estrategia inhibitoria que parece funcionar es aquella que bloquea la vía de señalización activada por el VEGF, y al respecto se ha encontrado que si se utiliza un inhibidor selectivo de cinasa que bloquea la actividad de cinasa del receptor del VEGF, se inhibe completamente la vascularización en un modelo murino de retinopatía del prematuro. (Ozaki, H. *et al.*, 2000).

## La PRL en el ojo

La posibilidad de la participación de hormonas lactogénicas en la neovascularización patológica ocular no es una idea reciente. En los años 50's el método paliativo para reducir la neovascularización en pacientes con retinopatía diabética era la hipofisectomía. Desde ese momento se planteó la hipótesis de que un factor hipofistario podría estar implicado en esta clase de angiogénesis (Wright, A.D. *et al.*, 1969). Sin embargo, los trabajos que se han hecho al respecto son pocos y los resultados controversiales.

A partir de los hallazgos iniciales se propuso a la GH como una de las hormonas involucradas en el crecimiento de vasos sanguíneos en las retinas diabéticas. Este hecho se fundamenta en los altos niveles de GH que presentan los pacientes con retinopatía diabética, y en la mejoría de los mismos al quitar la principal fuente productora de GH (Wright, A.D., *et al.*, 1969). Evidencias más recientes han mostrado que la GH estimula directamente la proliferación de células endoteliales de retinas humanas (Rymaszewski, Z. *et al.*, 1991) y que al inhibirse la secreción de esta hormona no se desarrolla neovascularización en un modelo de retinopatía isquémica murina (Smith, L.E. *et al.*, 1997). Sin embargo, la GH no es la única hormona lactogénica que parece participar en la angiogénesis ocular. Experimentos con implantes en córneas de rata conteniendo anticuerpos anti-PRL, mostraron una inhibición de la vascularización inducida por el bFGF (Dueñas, Z. *et al.*, 1999a). Estos hallazgos indican la presencia de PRLs antiangiogénicas en el ojo, las cuales podrían estar regulando la formación de vasos en ciertos tejidos. Una de estas PRLs antiangiogénicas podría ser el

fragmento de 16 kDa, el cual ya ha sido detectado en la córnea y en el humor acuoso de ratas (Dueñas, Z. *et al.*, 1999b).

La detección de la hormona completa en el humor acuoso y fluido subretiniano de pacientes con retinopatía del prematuro, también la involucran con la angiogénesis ocular. Cabe señalar que los niveles detectados de PRL en estos fluidos no están en proporción con los niveles circulantes de PRL, por lo que es probable que sea producida localmente. En apoyo a estos datos se ha encontrado la expresión del mRNA de PRL en membranas fibrovasculares del humor vítreo en pacientes con retinopatía del prematuro, y en el endotelio de retina de rata (Quiroz, H. *et al.*, 2000 y Ochoa, A. *et al.*, 2000).

La posibilidad de un efecto de PRL en el ojo, se pone en relieve por el hallazgo de sus receptores. Al respecto se ha encontrado el receptor de PRL en la glándula lagrimal y en la córnea (Wood, R.L. *et al.*, 1999 y Dueñas, Z. *et al.*, 1999b). A pesar de todas estas evidencias que involucran a la PRL con la angiogénesis ocular, hasta el momento no se ha estudiado la relación que existe entre esta hormona y el endotelio de la retina, relación que constituye uno de los objetivos principales del presente trabajo.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en cuenta las siguientes evidencias:

- A) La PRL es producida por células endoteliales bovinas y humanas tanto de la micro como de la macrocirculación.
- B) Parece estar implicada en la angiogénesis.
- C) Es producida por diversos tejidos y fluidos oculares,
- D) y está relacionada con la angiogénesis ocular;

se ha propuesto la siguiente hipótesis general de trabajo:

## HIPÓTESIS

" La prolactina es producida y secretada por el endotelio de la retina de rata, en el cual actúa como un factor autócrino "

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en cuenta las siguientes evidencias:

- A) La PRL es producida por células endoteliales bovinas y humanas tanto de la micro como de la macrocirculación.
- B) Parece estar implicada en la angiogénesis.
- C) Es producida por diversos tejidos y fluidos oculares,
- D) y está relacionada con la angiogénesis ocular;

se ha propuesto la siguiente hipótesis general de trabajo:

## HIPÓTESIS

" La prolactina es producida y secretada por el endotelio de la retina de rata, en el cual actúa como un factor autócrino "

## OBJETIVO GENERAL

---

Determinar si el endotelio de retina de rata produce y secreta PRL como un factor autócrino regulador de su proliferación.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Corroborar la expresión del mRNA de la PRL en el endotelio de retina de rata mediante hibridación *in situ*.
- 2.- Determinar la presencia de la proteína .
- 3.- Determinar si la PRL producida por el endotelio de retina de rata presenta actividad biológica.
- 4.- Analizar la posibilidad de un efecto autócrino sobre proliferación añadiendo anticuerpos anti-PRL y PRL a las células de retina de rata, y determinando la expresión de su receptor.
- 5.- Explorar si se activa la vía clásica de señalización del receptor de PRL en las células endoteliales de retina de rata.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Eí suero normal de conejo y los anticuerpos anti- IgG de conejo o anti-IgG de ratón acoplados a rodamina (TRITC) se obtuvieron de Jackson [mmunoresearch Laboratories (West Grove, PA) . La PRL de rata de 23 kDa (grado biológico), así como la PRL humana, ia GH humana y los anticuerpos anti-PRL de rata (S9 e IC5), fueron donados por Albert F. Parlow del Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis (NIH, Torance, CA). Un antisuero anti-PRL se produjo en conejos contra el estándar de PRL de rata de 23 kDa y se caracterizó como se ha descrito (Dueñas, Z. eí *al.*, 1999a). Las igGs preinmunes se obtuvieron del mismo conejo antes de inmunizarlo como se describe en Dueñas, Z., eí *al.* (1999a). La PRL de 16 kDa de rata se generó mediante Ea proteólisis enzimática de la PRL de rata de 23 kDa con una fracción microsomal de glándula mamaria de rata, filtración en gel y carbamidometilación, como se ha reportado (Clapp, C, 1987). El bFGF recombinante humano se obtuvo de Gibco, BRL (Rockvüle, MD).

<

### Cultivo de las células endoteliales de retina de rata

Las células endoteliales de retina de rata (CERR) se aislaron y caracterizaron como se ha descrito (Ochoa, A., eí *al.*, 2001). Para los experimentos se utilizaron células entre los pases 5 y 12. Para su mantenimiento se utilizó medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) supiéementado con heparina (100 jig/mí), 10% de suero fetal bovino (FBS), bFGF (2 ng/ml) y estreptomycin-penicilina (100 U/ml). Todos estos reactivos se obtuvieron de Gibco, BRL.

### Ensayos de proliferación de las CERR

Las CERR se cultivaron en medio definido libre de suero OPTIMEM (Gibco) a una concentración de  $2.5 \times 10^3$  células/pozos de 15 mm. Las incubaciones se realizaron durante 48 horas con los factores de crecimiento o las PRLs añadidas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



en dos ocasiones, una al inicio del experimento y otra 24 horas después. Al final de la incubación, las células se pulsaron con 0.6  $\mu$ Ci de timidina tritiada (Amersham, Piscataway, NJ) por pozo durante 20 horas. La incorporación de timidina tritiada al ADN celular se midió como un indicador de la proliferación celular. Para ello, se aspiró el medio, y se lavaron las CERR tres veces con ácido tricloroacético al 5% a temperatura ambiente. Finalmente las células se usaron con 0.25 N de NaOH a 37°C durante 1 hora. Se determinó mediante centelleo líquido el contenido de timidina tritiada en el lisado.

### **Modelo de la Monocapa Dañada**

Las CERR se dejaron crecer hasta alcanzar confluencia y la monocapa se dañó mecánicamente rasgando con la punta de una pipeta estéril en varios puntos de extremo a extremo. El medio se aspiró para quitar las células despegadas y se añadió medio definido OPTIMEM, en el que se incubaron durante 24 horas a 37-C. Este modelo se basó en el descrito por Merkle, C.J. *et al.* (2000).

### **Inmunocitoquímica**

Las CERR se sembraron sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina (Gibco, BRL) en OPTIMEM. El núcleo celular fue teñido con dihidrocloruro de diaminidina-fenilindola (DAPI, 1  $\mu$ g/ml, Boehringer, Mannheim, Germany) durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, se lavaron las células con PBS y se fijaron con paraformaldehido-PBS al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Los sitios de pegado inespecífico se bloquearon con Suero Normal de Cabra (Vectastain, Vector, Burlingame, CA) 1:10 en PBS-tritón al 0.3% durante dos horas a temperatura ambiente. El anti-PRL (IC5) se utilizó 1:1000 en PBS-tritón en el cual se incubaron las células durante dos horas a temperatura ambiente. Las células se lavaron tres veces con PBS-tritón y una vez con PBS solo. El anti-IgG de conejo acoplado a rodamina se utilizó 1:100 en PBS tritón, incubándose las CERR durante dos horas a temperatura ambiente. Al final de la incubación las CERR se lavaron tres veces con PBS-tritón y una vez con PBS solo. Los cubreobjetos se

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

montaron con PBS-glicerol 1:1 y la tinción se examinó en un microscopio de epifluorescencia (Olympus, modelo BX60, Lake Success, NY).

### **Retroíranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

El ARN total de las CERR se extrajo por un método de un solo paso (Chomczynski, P. y Sacchi, N., 1987). La retrotranscripción se realizó utilizando 10 µg del ARN extraído como se describió en Clapp, C. *et al.* (1994). Para la detección de la PRL de rata, se utilizaron cuatro combinaciones de primers complementarios a los exones 2 al 5 del gen de la PRL de rata. Del exón 2: 5'-TGTTCTGGTGGCGACTGCCAGACACCT-3<sup>1</sup>, del exón 3: 5'-ACTTCTTCCCTAGCTACTCCTGAAGAC-3<sup>1</sup>, del exón 4: 5'-TATCTTTTCGATCCCTTCGAGAAGCCG-3<sup>1</sup>, y del exón 5: 5'-GCAGTTGTTTTTATGGACAATTTGGCA-3<sup>1</sup>. Para la PCR de la PRL se utilizaron 30 ciclos y una temperatura de hibridación de 65°C. Para la amplificación del receptor largo de PRL de rata se utilizaron los siguientes primers: 5'-CCCAACTCCTGCTTCTTAG-3<sup>1</sup> para el 5' y el 3' 5'-TATTTTTGGCCCAGGAACTG-3<sup>1</sup>. Para el receptor se utilizó una temperatura de hibridación de 56°C, y 40 ciclos; en los 20 ciclos finales se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos complementarios para amplificar a la proteína ribosomal L19, como control de los niveles de expresión.

### **Análisis de Southern blot**

Veinte microlitros de la mezcla de reacción del RT-PCR se fraccionaron en gelés de agarosa al 1% y se transfirieron a membranas de Nylon (Hybond, Amersham). Las membranas se hibridaron con la sonda clonada de PRL de rata, con la sonda clonada del rPRLR, o con la sonda de L19 que consistió en un producto de PCR. Las sondas se marcaron con (cc-<sup>32</sup>P) deoxy-ATP (New England Nuclear, Beverly, MA) mediante el método de oligonucleótidos al azar, y se hibridizó a 42°C toda la noche. Para detectar la señal se realizó una autoradiografía (Kodak X-OMAT, Rochester, NY) con una pantalla intensificadora a -70°C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Hibridación *in situ***

Sondas en dirección sentido y antisentido conteniendo el ácido desoxiribonucleico complementario (cADN) para la rPRL se transcribieron *in vitro* a partir del plásmido linealizado (pcDNA3, Invitrogen, Carlsbad, CA) con las polimerasas T7 y SP6 y se marcaron con trifosfato de digoxigenínuridina (Boehringer, Mannheim). Las CERR se sembraron sobre portaobjetos cubiertos con fibronectina y se fijaron con 4% de paraformaldehído, 5% de ácido acético, y 0.9% de NaCl-PBS a temperatura ambiente por 30 minutos. La hibridación *in situ* se desarrolló de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células se deshidrataron con etanol, se lavaron con xileno al 100% para quitar los lípidos, y luego se rehidrataron. Se trataron con 0.1% de pepsina en 0.1N de HCl, se postfijaron con 1% de formaldehído, se lavaron, y se prehibridaron durante 1 hora a 37°C en buffer de hibridación: 4X SSC pH 7.0, 10% de sulfato de dextran, 1X de solución de Denhardt's, 2mM de EDTA, 50% de formamida y 500 µg/ml de ADN de espermatozoos de salmón. Las sondas se desnaturalizaron a 80°C durante 10 minutos y la hibridación se realizó en buffer de hibridación por 16 horas a 37°C. Las CERR se lavaron con SSC 2X a temperatura ambiente. La sonda hibridada se detectó mediante anticuerpos fluorescentes anti-digoxigenina (Boehringer, Mannheim). El mRNA de las CERR se observó mediante microscopía confocal (PCM 2000, Nikon, Melville, NY).

## **Lisados de las CERR y medios condicionados**

Las CERR se sembraron a una densidad de  $10^6$  células/caja de 100 mm, y se incubaron por 24 horas en medio definido OPTIMEM. El medio condicionado se concentró diez veces por centrifugación (Centricon 3, Amicon, Beverly, MA) y se almacenó a -70°C. Las células se usaron con buffer de lisis RIPA (Nonidet P-40 al 1%, SDS al 0.1%, 50 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 1 µg/ml de aprotinina, y 100 µg/ml de fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF)). La concentración de proteína se determinó por ensayos de Bradford (Bradford, M., 1976).

### **Análisis de Western blot**

Dos microgrannos de proteína de los usados de las CERR y del medio condicionado se hirvieron en buffer de Laemmli conteniendo p-mercaptoetanol. Se resolvieron en geles de poliacríamida-SDS (15% acrilamida-bisacrilamida). Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, y se utilizaron distintos antisueros anti-PRL 1:500 (S9 ó el producido localmente). El blot se reveló con un kit de anticuerpos secundarios acopiados a fosfatasa alcalina (Bio-Rad, Hercules, CA).

### **Inmunoprecipitación**

Para inmunoprecipitar a la proteína Stat 5b fosforilada, se incubaron los usados celulares (1 microgramo) de las CERR durante 1 hora con 50  $\mu$ l de proteína A-sefarosa (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) a temperatura ambiente. Se centrifugaron, se recuperó el sobrenadante y se incubó con un anticuerpo antifosfotirosina (anti-pY) policlonal por 3 horas a 4°C. A la incubación anterior se le añadieron 60  $\mu$ l de proteína A-sefarosa, y las proteínas inmunoprecipitadas se resolvieron en un gel de SDS-PAGE al 7.5%. El análisis de Western blot se realizó como se describió anteriormente, utilizando un anticuerpo policlonal anti-Stat5b (Transduction Laboratories, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) diluido 1:2500.

### **Ensayo de ELISA**

El ELISA se desarrolló como se describe en Dueñas, Z. *et al.* (1999a). Se utilizaron placas de 96 pozos cubiertas con 10 ng de PRL de 23 kDa de rata, una dilución 1:8000 del antisuero producido (localmente, y una dilución 1:2000 de anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (Vector).

La reacción se reveló con el dihidrocloruro de o-fenilendiamina en presencia de peróxido de hidrógeno. La densidad óptica se midió a 490 nm.

### **Bioensayo en las células Nb2**

La presencia de PRL bioactiva se determinó en el medio condicionado de las CERR utilizando las células Nb2 como se ha descrito (Tanaka, T. *et al.*, 1980).

Las incubaciones se desarrollaron por 48 horas en ausencia o presencia de diferentes diluciones del medio condicionado de las CERR, de medio no condicionado, o del estándar de PRL de 23 kDa de rata, con y sin el anticuerpo producido localmente diluido 1:500. La proliferación de las células Nb2 se midió por el ensayo colorimétrico del bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl-2,5)-difeniltetrazolio (MTT, Sigma), la absorbancia se midió a 595 nm (Carley, W. *et al.*, 1992).

### **Análisis estadístico**

Los datos se evaluaron mediante ANOVA para los casos en los que se compararon varios tratamientos y mediante prueba *t* de Student para los casos en los que se compararon dos tratamientos. En cada experimento de la sección de resultados se muestra el promedio de tres o más repeticiones de cada condición. Los resultados que se muestran son representativos de tres o más experimentos individuales. En todos los casos se consideraron diferencias significativas cuando  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

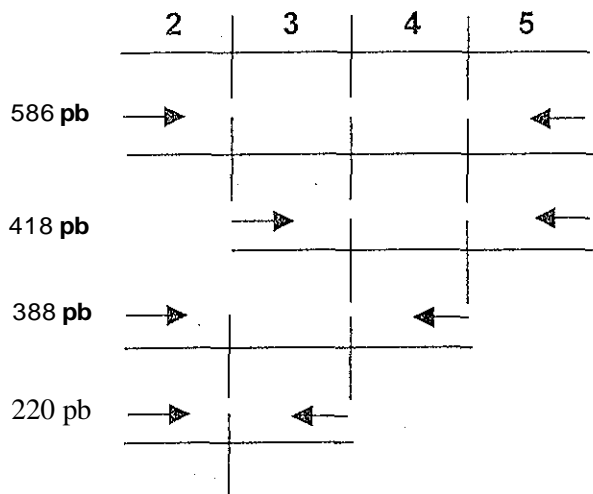
### Expresión del mRNA de la Prolactina en las CERR

#### Análisis de Southern Blot

Mediante análisis de Southern Blot, se detectó la expresión del mRNA completo de la PRL en las CERR. El ARN total de las CERR se sometió a una RT-PCR, en la que se utilizaron 4 combinaciones de oligonucleótidos correspondientes a sitios localizados dentro de los exones 2 al 5 del gen de la PRL de rata (Figura 1A). La amplificación del RT-PCR del mRNA de las CERR produce fragmentos de 388, 586, 220 y 418 pares de bases (bp) (Figura 1B, líneas 6-9), los cuales corresponden a aquellos que se amplifican a partir del control positivo del cADN de PRL de rata (Figura 1B, líneas 2-5). No se detecta señal positiva en ausencia de la transcriptasa reversa (Figura 1B, línea 10) o en el control negativo sin ARN (Figura 1B, línea 1).

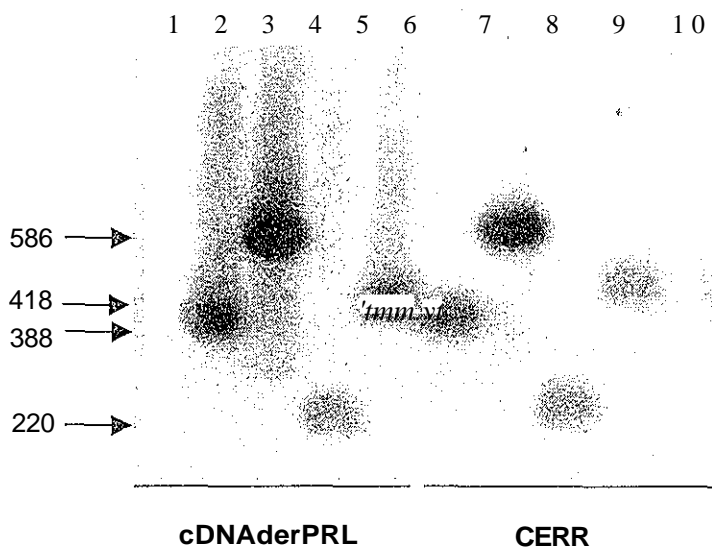
**A**

#### Productos de PCR



**B**

#### Análisis de Southern Blot



**FIGURA 1.-** Expresión del mRNA de la PRL en las CERR mediante análisis de Southern Blot. A) Representación esquemática de los productos de PCR esperados utilizando los oligonucleótidos (flechas) complementarios a los exones 2 al 5 del gen de la PRL. Los tamaños esperados de los productos de PCR para cada combinación de oligonucleótidos están dados en pares de bases (pb). B) Análisis de Southern blot de los productos de RT-PCR de las CERR (líneas 6-9), amplificados con 30 ciclos de las combinaciones de oligonucleótidos mostradas en A. Productos de tamaño similar se amplifican del cADN de la prolactina de rata (rPRL) (líneas 2-5). Los controles negativos consisten en ausencia de ARN (línea 1) y en ausencia de transcriptasa reversa (línea 10).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Hibridación *in situ*

Utilizando hibridación *in situ* se confirmó la expresión del mRNA de la PRL en las CERR. Esta se realizó empleando ribosondas en dirección antisentido que hibridan con el mRNA de la PRL. Más del 90% de las CERR mostraron tinción positiva en regiones perinucleares (Figuras 2B y 2C). Es posible que en estas zonas se encuentren los ribosomas conteniendo el mRNA. Para determinar la especificidad de esta tinción, se utilizó una sonda sentido para el mRNA de la PRL. Como se muestra en la Figura 2A, no hay tinción positiva en las CERR en presencia de este tipo de sondas.

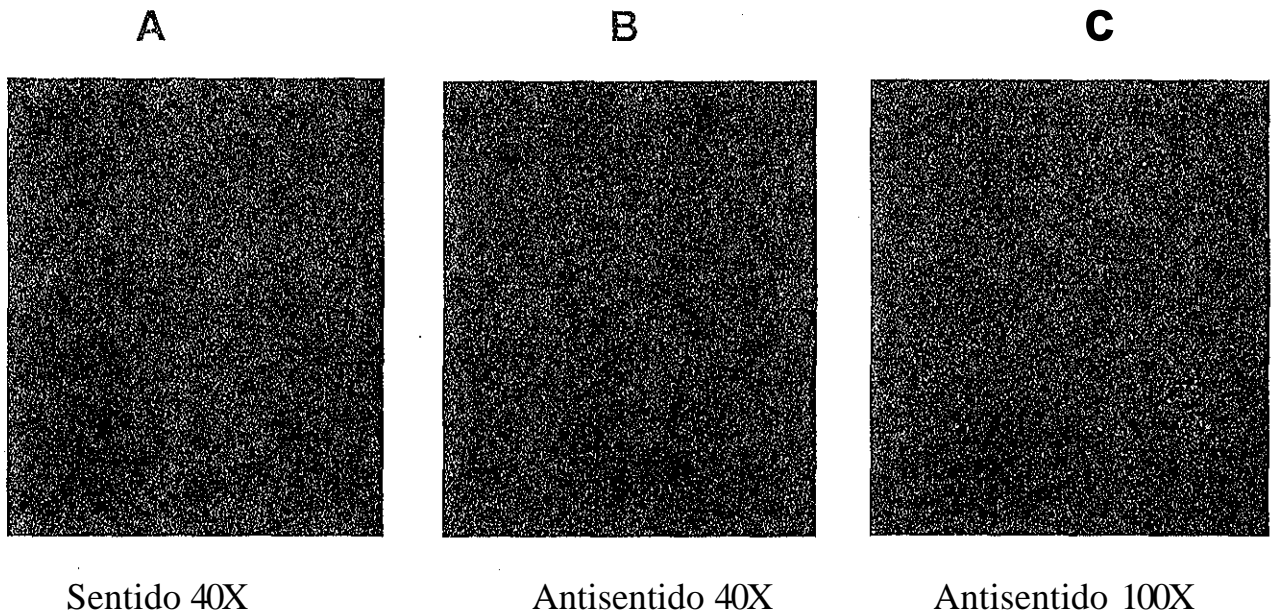
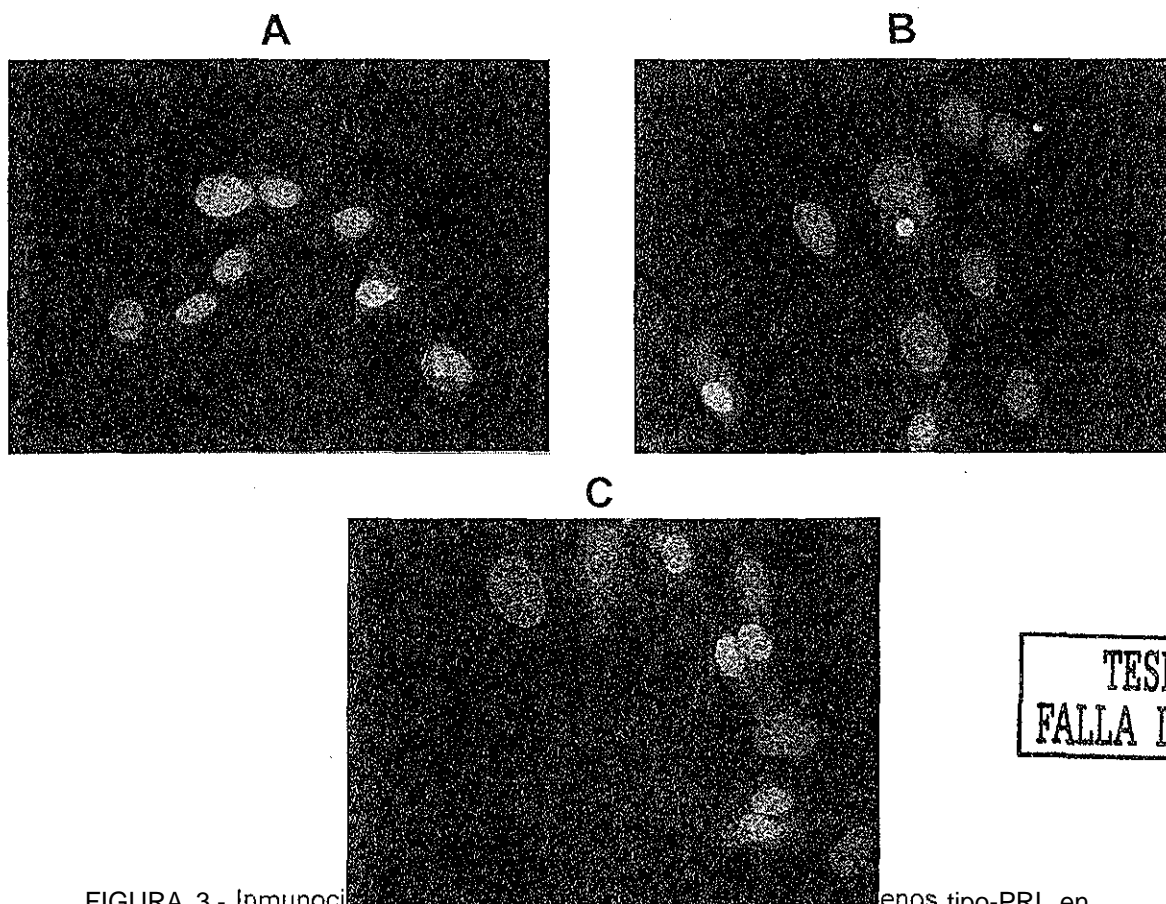


FIGURA 2.- Hibridación *in situ* que muestra la presencia del mRNA de la PRL en las CERR. A) El uso de una sonda sentido no muestra tinción, mientras que en presencia de una sonda con secuencia antisentido se marcan regiones perinucleares de las células (B y C). Estas imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal. La escala de la barra es de 30 nm para la figura B y de 6  $\mu$ m para la C.

## Expresión de la proteína Prolactina en las CERR

### *Determinación de la proteína intracelular por inmunocitoquímica*

Mediante el empleo de métodos inmunocitoquímicos, se observó la presencia de antígenos tipo-PRL en las CERR. El citoplasma de las CERR se tiñó en más del 90% de las células, utilizando el antisuero IC5, y revelando con segundos anticuerpos acoplados a marcadores fluorescentes. Esta tinción se muestra en la Figura 3A en la que se observa el citoplasma teñido de rojo. La especificidad de esta reacción se demostró con el bloqueo del antisuero con PRL de rata de 23 kDa a una concentración de 1 $\mu$ M (Figura 3B) y mediante la sustitución del primer anticuerpo por Suero Normal de Conejo (Figura 3C). Para poder visualizar mejor a las células a las que se les realizó la inmunocitoquímica, se tiñó el núcleo de las mismas previamente con DAPI (tinción en azul).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 3.- Inmunocitoquímica para la presencia de antígenos tipo-PRL en las CERR. A) CERR en presencia del antisuero IC5 1:1000, B) en presencia del IC5+rPRL 1 JJM y C) en presencia de Suero Normal de Conejo. Las células se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia a un aumento de 40X. La escala de la barra es de 30  $\mu$ m, y se aplica para las tres figuras.



### **Análisis de la expresión y secreción de PRL en las CERR por Western Blot**

La expresión y secreción de PRL por las CERR se demostró por análisis de Western Blot. Para ello, se utilizaron los medios condicionados (MC) de las CERR así como los usados celulares (LC). Se observó la presencia de una banda inmunoreactiva para PRL que, de acuerdo con el estándar utilizado, corresponde a la PRL nativa o madura de 23 kDa (Figura 4A). Este resultado indica que la PRL es producida y secretada por las CERR y confirma lo observado mediante la inmunocitoquímica. La presencia de otras variantes moleculares de esta hormona no se detectan. La especificidad de este análisis se demuestra con la ausencia de señal en presencia del primer anticuerpo bloqueado con 1  $\mu$ M de PRL (Figura 4B) o al sustituirlo con Suero Normal de Conejo (Figura 4C).

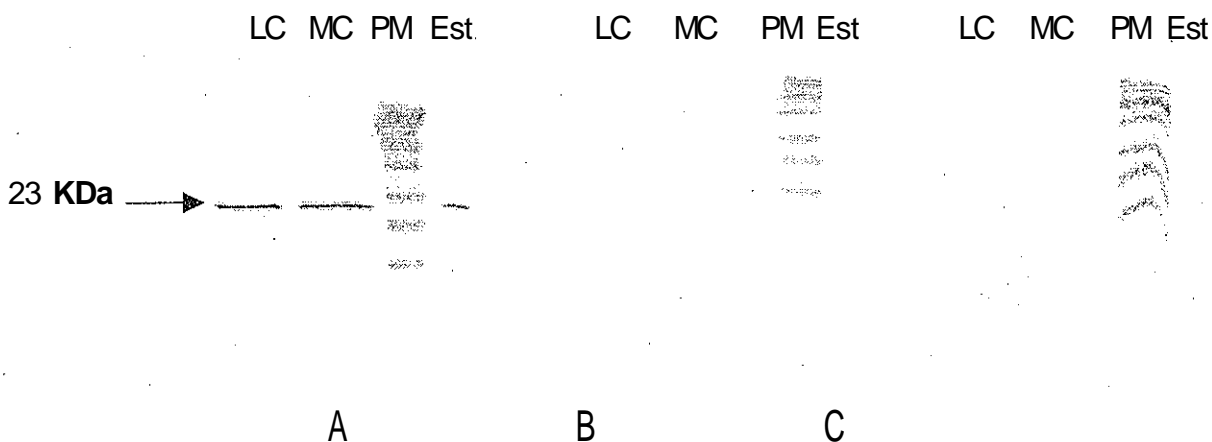


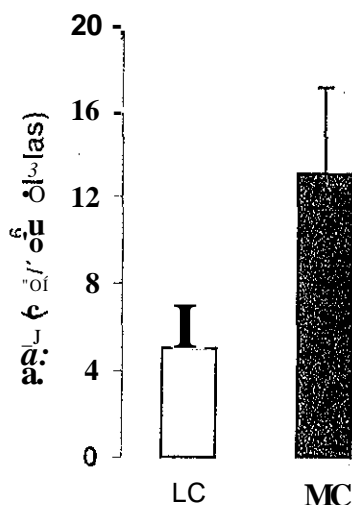
FIGURA 4.- Detección de PRL en las CERR mediante análisis de Western blot de los LC y MC. A) Blot revelado con el antisuero anti-rPRL generado localmente 1:500. B) Blot con anti-rPRL preadsorbido 24 horas con rPRL 1  $\mu$ M. C) Blot en el que el primer anticuerpo se sustituyó con Suero Normal de Conejo. PM=Marcador de peso molecular. Est=Estándar de rPRL de 23 kDa.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **Cuanti ficación de la Prolactina producida y secretada por las CERR por ELISA**

Con el propósito de valorar la concentración de PRL producida y secretada por el endotelio de retina de rata, se realizó un análisis de ELISA. Los resultados de este ensayo extienden los resultados obtenidos mediante el Western Blot, ya

que muestran la presencia de PRL inmunoreactiva tanto intracelular (detectada en los LC) como secretada (detectada en los MC) por las CERR (Figura 5). Con este ensayo se puede apreciar que la concentración de PRL secretada por las CERR en 24 horas es aproximadamente dos veces mayor que la que almacenan (13 ng de PRL/10<sup>6</sup> células *versus* 5 ng de PRL/10<sup>6</sup> células). Estos datos sugieren que una gran parte de la PRL producida por las CERR es secretada al medio de cultivo, hecho que abre la posibilidad de que pueda tener algún efecto sobre diversos tipos celulares.

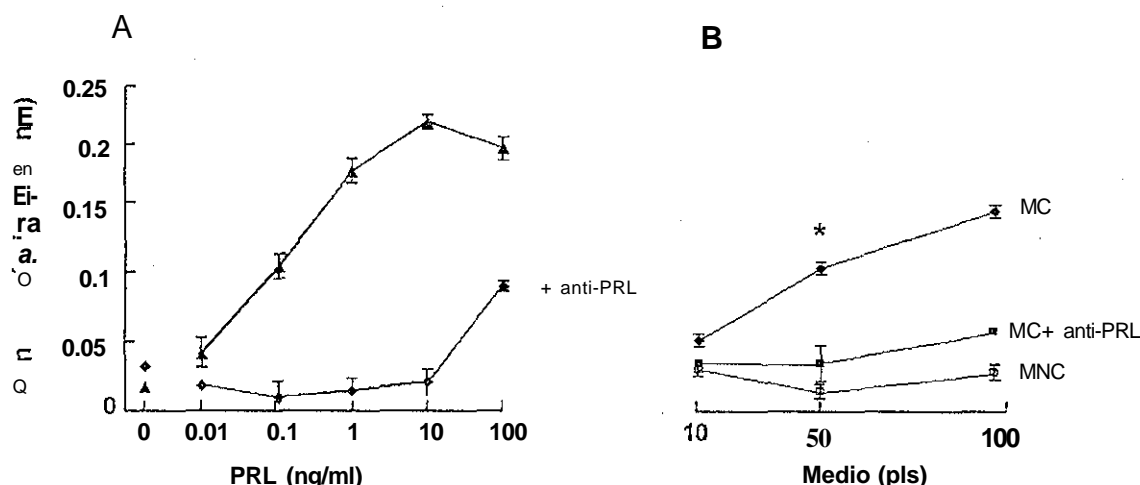


**FIGURA 5.-** Determinación de ELISA que muestra la concentración de PRL en los LC y en los MC de las CERR. Se muestra la concentración de PRL producida por 10<sup>6</sup> células cultivadas durante 24 horas en medio definido OPTIMEM. Los datos son el promedio  $\pm$  Err Std de tres experimentos independientes.

### **Bioactividad de la PRL producida por las CERR**

Con base en los resultados obtenidos mediante ELISA y Western Blot que muestran la secreción de PRL de 23 kDa por las CERR, se exploró si esta PRL presenta actividad biológica. Para ello, se utilizó el bioensayo en la línea de linfoma de rata Nb2, la cual es una línea celular que prolifera en respuesta a PRL. En la Figura 6B se muestra que concentraciones crecientes del MC por las CERR estimulan la proliferación de las Nb2. Este efecto es específico ya que su efecto se inhibe al añadir un antisuero anti-PRL, además de que no ocurre en respuesta a medio de cultivo no condicionado (MNC) por las CERR. A juzgar por la proliferación obtenida en respuesta a concentraciones crecientes de la preparación de referencia de rPRL (Figura 6A), el nivel de actividad del MC de las

CERR es equivalente al que ejercen 10 ng/ml de PRL pura (una vez realizada la corrección del factor 10X de la concentración del MC) (ver Materiales y Métodos). Estos resultados son consistentes con la determinación de la concentración de PRL realizada mediante el ELISA, y demuestran que la PRL producida por las CERR es biológicamente activa.



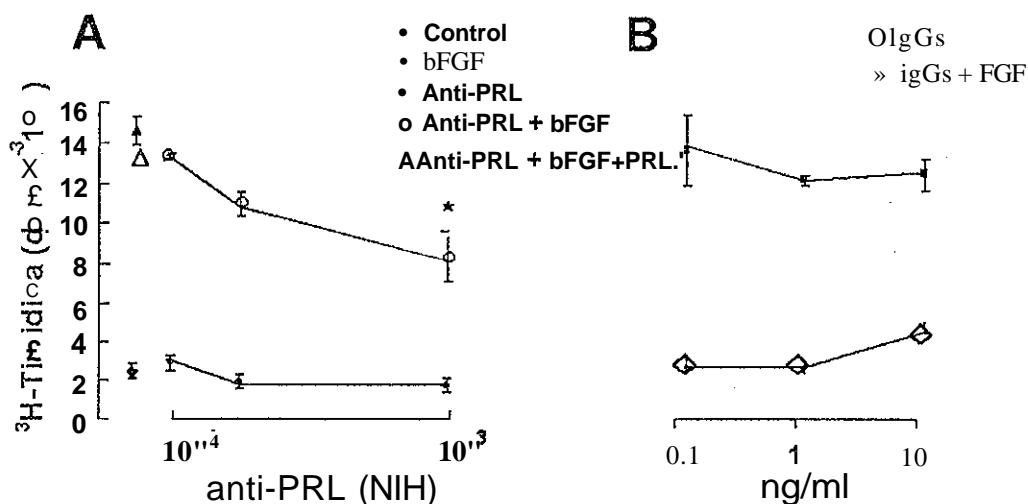
**FIGURA 6.-** Secreción de PRL bioactiva por las CERR. A) Proliferación de las Nb2 estimulada por PRL (estándar del NIH) soya o en presencia de un antisuero anti-PRL (generado localmente). B) Proliferación de las Nb2 en presencia de concentraciones crecientes de MC de las CERR. Este efecto se bloquea en presencia de antisuero (1:500) a niveles similares a los que lo hace el medio no condicionado (MNC). Tanto el MC como el MNC se concentraron 10 veces. La proliferación de las células Nb2 se determinó mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTT, seguido por la medición de la densidad óptica a 595 nm. Los datos son el promedio  $\pm$  Err Std de triplicados y se muestra un experimento representativo. \* $P < 0.05$  versus las células sin PRL o sin MC.

### Efecto autócrino de la PRL producida por las CERR

#### *Inhibición de la proliferación celular estimulada por el bFGF en respuesta a un antisuero anti-PRL*

Con el objeto de determinar si la PRL producida por las CERR ejerce algún tipo de efecto sobre la proliferación de las mismas, se desarrolló un ensayo de proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada ( $^3\text{H}$ -timidina) al ADN

celular. Para ello se utilizaron concentraciones crecientes del antisuero anti-PRL (S9, NIH) sobre las células. En la Figura 7A se muestra que el antisuero inhibió de manera dependiente de la dosis la proliferación estimulada por 2 ng/ml del bFGF, mientras que no modificó la proliferación basal. Este efecto es específico para PRL, en la medida en que fue bloqueado por la coadministración de rPRL de 23 kDa a una concentración de 1  $\mu$ M. En este mismo sentido, la Figura 7B muestra que IgG's de conejo preinmunes no modifican la proliferación estimulada por el bFGF ni la proliferación basal. Estos resultados sugieren que la PRL producida por las CERR puede estar participando en la regulación de la proliferación de las mismas, posiblemente a través del incremento en la expresión de PRL o de su receptor en respuesta al bFGF.



**FIGURA 7.-** Inhibición de la proliferación estimulada por el bFGF en presencia de un antisuero anti-PRL A) Proliferación de las CERR determinada por la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en presencia de concentraciones crecientes de un antisuero anti-rPRL de 23 kDa, solo o en conjunto con 2 ng/ml del bFGF. Se muestra el efecto del bFGF solo y del antisuero 1:1000 preabsorbido con 1  $\mu$ M de rPRL + bFGF. B) Proliferación de las CERR en presencia de concentraciones crecientes de IgG's de conejo preinmunes, solas o en conjunto con el bFGF. Los tratamientos se aplicaron por 48 horas en medio definido OPTIMEM. Los datos son el promedio  $\pm$  Err Sid de triplicados y se muestra un experimento representativo. \*P<0.05 versus las células tratadas con el bFGF solo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Ausencia de efecto de PRL exógena sobre la proliferación de las CERR

Dados los resultados anteriores, se propuso determinar el efecto de PRL exógena sobre la proliferación de las CERR. Para ello se midió la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina en presencia de concentraciones crecientes de rPRL de 23 kDa, y de otras dos hormonas lactogénicas como lo son la PRL de 23 kDa humana (hPRL) y la hormona de crecimiento humana (hGH). Como se muestra en la Figura 8, no se observó ningún efecto sobre la proliferación de las CERR en respuesta a las hormonas lactogénicas.

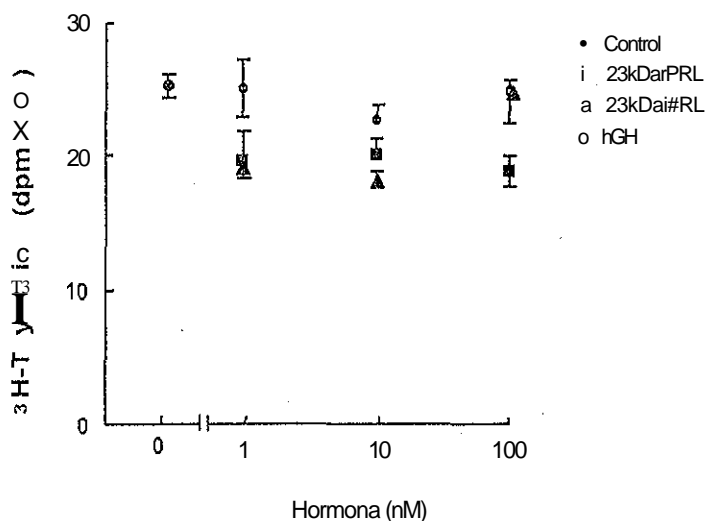


FIGURA 8.- Ausencia de efecto de hormonas lactogénicas sobre la proliferación de las CERR. Se muestra la proliferación determinada por  $^3\text{H}$ -timidina tritiada de las CERR en respuesta a concentraciones crecientes de rPRL, hPRL y hGH. Los tratamientos se aplicaron por 48 horas en medio sin suero OPTÍMEM. Los datos son el promedio  $\pm$  Err Std de triplicados y se muestra un experimento representativo.

### Efecto inhibitorio de PRL de 16 KDa sobre la proliferación de las CERR

Dado que no se detectó efecto alguno de la PRL de 23 KDa sobre la proliferación de las CERR, se investigó si el fragmento de 16 KDa era capaz de inhibir la proliferación de las CERR de manera similar a como lo hace en otros tipos de endotelio. En la Figura 9 se muestra que la PRL de 16 KDa de rata inhibe la proliferación estimulada por 2 ng/ml del bFGF (barras claras) de manera dependiente de la dosis, mientras que no modifica la proliferación basal (resultado

no mostrado). En este mismo sentido se investigó el efecto que podría ejercer la rPRL de 23 KDa sobre la proliferación estimulada por el bFGF. Este posible efecto se planteó también a partir de los resultados obtenidos con el anti-PRL sobre la proliferación estimulada por el bFGF (Figura 7A). Al respecto, no se detectó ninguna modificación de la proliferación estimulada por el bFGF (Figura 9, barras oscuras) por la PRL completa.

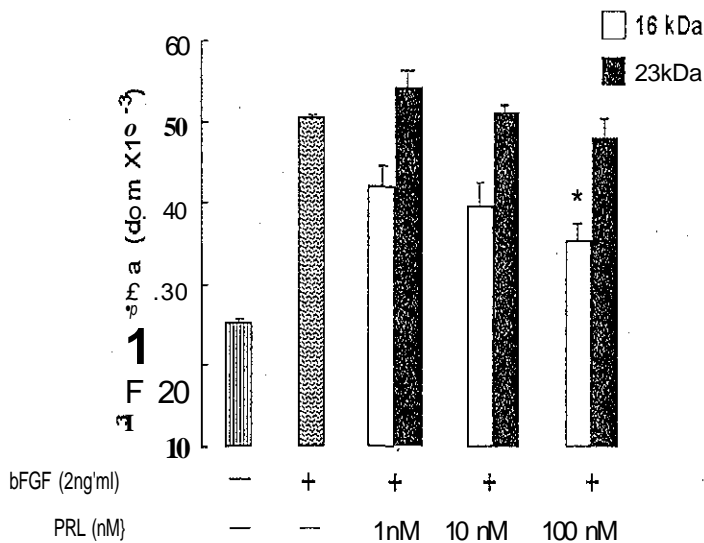


FIGURA 9.- Inhibición de la proliferación de las CERR estimulada por el bFGF por PRL de 16 KDa. Proliferación determinada por incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. Se muestra un efecto inhibitorio de la PRL de 16 KDa pero no de la PRL completa sobre la proliferación estimulada por 2 ng/ml del bFGF. Los tratamientos se aplicaron por 48 horas en medio definido OPTIMEM. Los datos son el promedio ± Err Std de triplicados y se muestra un experimento representativo. \*P<0.05 versus las células tratadas con el bFGF soio.

### Expresión del receptor de PRL (PRLR) en las CERR

La posibilidad de un efecto autócrino de PRL sobre el endotelio de retina de rata quedaría confirmada con la demostración de la expresión de su receptor en las CERR. Con este propósito, se realizó un análisis de Southern blot de productos de RT-PCR para determinar la expresión del receptor de PRL en estas células. La Figura 10A muestra un análisis densitométrico de dos Southern blots independientes, y se observa que el PRLR se expresa en condiciones basales en

las CERR (subconfluencia). Además, la expresión del PRLR se incrementa bajo ciertas condiciones como el tratamiento con bFGF o en monocapas de las CERR dañadas mecánicamente. Los resultados del Southern blot se estandarizaron utilizando la expresión de la proteína ribosomal L19. En la Figura 10B se muestra un experimento de Southern blot representativo en el que se observa la expresión del PRLR y de la proteína L19. El control negativo para ambas amplificaciones consistió en la sustitución del cADN por ARN. La reacción de PCR fue la misma para el PRLR y L19 (ver Materiales y Métodos), y los tamaños de los productos de amplificación corresponden con los esperados (582 pb para el PRLR y 350 pb para L19).

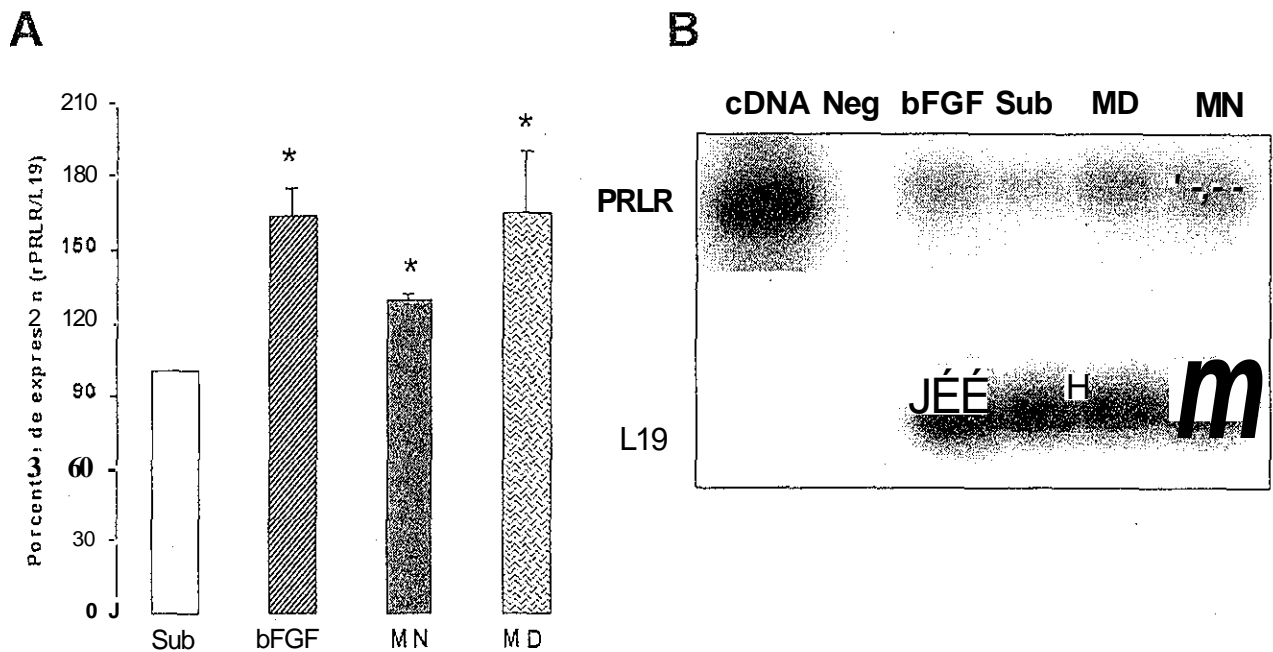


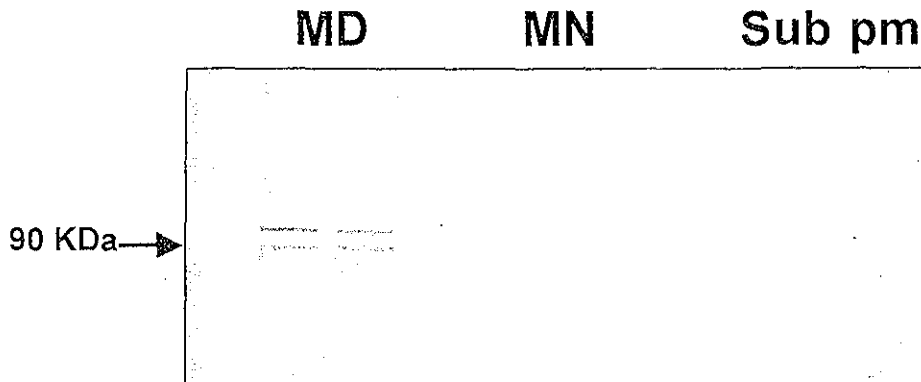
FIGURA 10.- Expresión del receptor de Prolactina en las CERR (PRLR). A) Análisis de densitometría de dos Southern blots independientes. Se muestra la expresión del PRLR con respecto a la expresión de la proteína ribosomal L19 en CERR bajo distintas condiciones: subconfluencia (sub), tratadas con 2 ng/ml de bFGF, CERR en monocapa normal (MN) y CERR en monocapa dañada (MD). Todos los tratamientos se realizaron durante 24 horas en medio definido OPTIMEM. B) Southern blot representativo que muestra la expresión del PRLR y de la proteína L19 de las condiciones antes descritas. El control negativo consistió en la sustitución del cADN por ARN, y el positivo para el receptor consistió en el PRLR donado en pcDNA3. Los datos son el promedio  $\pm$  Err Std de duplicados. \* $P < 0.05$  versus las células subconfluentes.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Estudio de la vía de señalización activada por PRL en las CERR**

### **Fosforilación de la proteína Stat 5b**

Dado que los resultados anteriores muestran que en las monocapas dañadas de las CERR hay un incremento en la expresión del mRNA del PRLR, se exploró si ese incremento está relacionado con la activación de la transducción de señales que se ha reportado para este receptor. Uno de los componentes de la vía de señalización del PRLR es la activación de la proteína Stat 5b, la cual requiere de la fosforilación en residuos de tirosina. La Figura 11 muestra un análisis de Western blot utilizando un anti-Stat 5b de LC de las CERR inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-fosfotirosina (anti-pY). Los resultados de este análisis muestran que hay una mayor cantidad de Stat 5b fosforilada en las monocapas dañadas (MD) de las CERR que en las monocapas normales (MN) o en las células subconfluentes (Sub), hecho que apoya los resultados anteriores en los que se muestra un incremento en la expresión del mRNA del PRLR bajo condiciones de daño mecánico.



**FIGURA 11.-** Activación de Stat 5b en las CERR. Análisis de Western blot para Stat 5b de LC de las CERR tratadas durante 24 horas en medio definido OPTIMEM en condiciones de monocapa dañada (MD), monocapa normal (MN) y subconfluencia (Sub). Los LC se inmunoprecipitaron con anti-pY, y el Western blot se reveló con un anticuerpo policlonal anti-Stat 5b 1:2500. pm=marcador de peso molecular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## DISCUSIÓN

---

El presente trabajo demuestra que células endoteliales obtenidas de los capilares de la retina de rata producen y secretan PRL, hormona que ha sido implicada en una gran variedad de procesos, entre los que se encuentra el crecimiento de vasos sanguíneos. El hecho de que la PRL sea producida y secretada por las células endoteliales de retina de rata (CERR) sugiere que esta hormona puede estar involucrada con el crecimiento de vasos sanguíneos de la retina, tanto en condiciones de angiogénesis patológica como de angiogénesis fisiológica.

En esta tesis se demuestra la expresión de PRL por las CERR a dos niveles: expresión del ARN mensajero y expresión de la proteína, así como la secreción de la misma.

Con respecto a la expresión del mARN, utilizando análisis de Southern blot de productos de RT-PCR y la hibridación *in situ* se demuestra y confirma la expresión del mARN de la PRL. El análisis de Southern blot, muestra la amplificación e hibridación de transcritos de un tamaño consistente con el mARN de la PRL que codifica para una proteína madura de 23 kDa. A diferencia de lo que ocurre con otros tipos de endotelio, en las CERR no se detectaron transcritos de otro peso molecular, sugiriendo que no están presentes variantes moleculares originadas por la edición alternativa del gen de la PRL. El resultado del Southern blot se confirmó por la presencia del mARN detectada por hibridación *in situ*, y coincide con lo observado mediante Western blot, en el que solo se aprecia la presencia de una banda inmunoreactiva de un peso de 23 KDa. Una vez determinada la expresión del mARN de PRL en las CERR, se exploró si este era traducido a proteína. Mediante inmunocitoquímica, análisis de Western blot y ELISA, se proveen evidencias de que el mARN de la PRL es traducido a una proteína en las CERR. De acuerdo con estos resultados, el citoplasma de las CERR contiene antígenos tipo PRL, la cual puede tratarse de la isoforma nativa de 23 kDa con respecto a lo obtenido en el Western blot de los Usados celulares. El Western blot detectó una banda que migra de manera similar a como lo hace el estándar de la hormona de rata (NIH). La presencia de PRL en las CERR se

confirmó mediante ELISA. Cabe la posibilidad de la existencia de otro tipo de variantes que no hayan podido ser detectadas con los anticuerpos empleados en las metodologías antes mencionadas.

La posibilidad de que la PRL de las CERR es secretada hacia el medio de cultivo es confirmada por Western blot, por ELISA y por el bioensayo en las células Nb2. El ELISA muestra que, en 24 horas, la mayor parte de la hormona producida en las CERR es detectada en el medio de cultivo, dado que se cuantificaron  $13 \text{ ng}/10^6$  células de PRL en los medios condicionados *versus*  $5 \text{ ng}/10^6$  células en los usados celulares. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos con el bioensayo en las células Nb2, en el que se detectaron aproximadamente  $10 \text{ ng}/10^6$  células. Para la realización del bioensayo, también se estandarizó con la PRL de rata proveniente del NIH. Cabe señalar, que el bioensayo de las células Nb2 es utilizado ampliamente para valorar hormonas lactogénicas, ya que la proliferación de estas células depende de estas hormonas, y se sabe que la PRL de 23 kDa es el ligando conocido que activa la transducción de señales del receptor para PRL en estas células (Bole-Feysot, C, *et al.*, 1998).

Estos resultados coinciden con lo observado en otros tipos de endotelio, como lo es el proveniente de capilares de corteza bovina o el de vena de cordón umbilical humana, en los que también se ha reportado la presencia de PRL (Clapp, C. *et al.*, 1998, y Corbacho, A. *et al.*, 2000). Sin embargo, las CERR expresan el mRNA completo y lo traducen a una sola proteína, mientras que los otros endotelios producen diferentes mensajeros para PRL, productos de la edición alternativa del gen, y los traducen a proteínas de distinto peso molecular (23, 21, 16 y 14 kDa). Existen también diferencias con respecto a la cantidad de PRL producida por los distintos endotelios, dado que en las CE de capilares de corteza bovina se han detectado  $30 \text{ pg}/10^6$  células en medios condicionados durante un periodo de 24 horas, y en las HUVEC la cantidad de PRL producida es tan poca, que no ha podido ser cuantificada. Esta diferencia en la concentración de PRL secretada por un millón de células en un periodo de 24 horas es de aproximadamente 500 veces mayor en las CERR que en las BBCEC, y puede deberse a la heterogeneidad del endotelio, dependiendo del tejido en el que se

encuentre o si proviene de la micro o de la macrovasculatura (Lelkes, P.I. *et al.*, 1996). En el caso del endotelio de retina se sabe que, a diferencia de otros endotelios, conserva muchas de sus características *in vitro*, como lo es por ejemplo, la expresión del VEGF bajo condiciones básicas (Simorre-Pínatel, V. *et al.*, 1994). Otra posible explicación a estas diferencias entre endotelios es la diferencia entre especies, y al respecto el endotelio de la rata ha sido poco estudiado (Greenwood, J., 1992 y Gerritsen, M. *et al.*, 1988).

La secreción de concentraciones altas de PRL por las CERR sugiere que esta hormona puede estar ejerciendo efectos locales en la propia retina y en otros tejidos del ojo. Las evidencias que apoyan esta hipótesis son la detección de PRL en el humor acuoso y fluido subretiniano de pacientes con retinopatía del prematuro, y en el humor acuoso de las ratas (Dueñas, Z. *et al.*, 1999b y Quiroz, H. *et al.*, 2000). Sin embargo, se desconoce si hay alguna relación entre la PRL de los capilares de la retina y las otras PRLs detectadas intraocularmente. Existe la posibilidad de que existan otras fuentes para la PRL intraocular, las cuales pueden ser otros tipos celulares u otros endotelios, dado que el mRNA de la PRL se ha detectado en membranas fibrovasculares de pacientes con retinopatía del prematuro (Quiroz, H. *et al.*, 2000).

Muchos de los factores producidos por el endotelio, son factores autócrinos que participan en diversas fases del proceso angiogénico. Un ejemplo de factor autócrino es el VEGF. La posibilidad de que la PRL estuviera regulando autocrinamente a las CERR se exploró en este trabajo. Los resultados aquí mostrados, apuntan hacia posibles efectos autócrinos de la PRL sobre la proliferación de las CERR. Al respecto se encontró que la proliferación de las CERR estimulada por el bFGF es inhibida por un antisuero anti-PRL, que las CERR expresan al receptor para la PRL, y que la proteína Stat 5b es activada mediante fosforilación en residuos de tirosina. Parece que existe una correlación entre los efectos ejercidos por la PRL y el bFGF. Los hechos de inhibición de la proliferación estimulada por el bFGF al añadir un anticuerpo anti-PRL y de incremento de la expresión del rPRLR en respuesta al factor de crecimiento en las CERR, sugieren que el bFGF induce la expresión del receptor de PRL. Hasta el

momento, solo se ha reportado que el bFGF induce la expresión del mRNA de PRL en cultivos de lactotropos primarios y transformados, GH3 y GH4, pero no se ha estudiado el efecto que ejerce sobre el receptor (Baird, A. *et al.*, 1985 y Schweppe, R.E., *et al.*, 1997). En las CERR no hay incremento en la producción de PRL en respuesta al bFGF (datos no mostrados), por lo que el aumento de expresión del rPRLR al añadir bFGF observado en las CERR, sugiere nuevos mecanismos de regulación durante la angiogénesis. Esta hipótesis es apoyada por resultados obtenidos en CE de capilares de cerebro bovino. En estas células la adición del anticuerpo anti-PRL inhibe la proliferación basal, además de la estimulada por el bFGF (Cíapp, C. *etal.*, 1998).

El mecanismo de acción del bFGF y la PRL en el endotelio se desconoce, pero con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se propone un modelo de acción como se esquematiza en el Diagrama 1. El bFGF al unirse a su receptor localizado en la CE induce una gran variedad de respuestas, entre ellas aquellas que activan vías mitogénicas. Además de activar estas vías, el bFGF induce la expresión del rPRLR. Una vez expresado, el receptor es capaz de unirse a la PRL, y esta a su vez, induce una señal mitogénica en la CE. El resultado que se detecta en los experimentos de proliferación de las CERR al añadir bFGF, es la suma del efecto propio del factor de crecimiento y de los otros eventos que desencadena, como lo es la unión de la PRL a su receptor, al incrementarse la expresión del mismo. Por eso, si se añade un anticuerpo que no permita la unión de la PRL con su receptor, el resultado es una inhibición de la proliferación estimulada por el bFGF.

A pesar de que los resultados aquí mostrados sugieren efectos autócrinos de PRL, no se detectó efecto alguno por la aplicación exógena de esta hormona, ni de hGH o hPRL de 23 kDa sobre la proliferación basal de las CERR o la estimulada por el bFGF. Una posible explicación a esta aparente discrepancia de los resultados, se refiere a que las CERR, bajo condiciones basales, están produciendo una gran cantidad de PRL, y de acuerdo con la cinética de acción reportada para la unión de la PRL con su receptor, es posible que en las CERR los receptores para la PRL ya se encuentran saturados en condiciones basales, por lo

que no es posible observar un efecto adicional cuando se añade hormona exógena. La misma explicación puede ser aplicable al hecho de no encontrar efecto al añadir PRL de 23 kDa sobre la proliferación estimulada por el bFGF.

Hasta el momento, no se ha logrado bloquear la PRL producida endógenamente por las CERR con el objeto de demostrar un efecto claro y directo de PRL exógena sobre este endotelio.

Los resultados aquí presentados también muestran que la expresión del rPRLR se incrementa en respuesta al daño celular. El modelo de la monocapa endotelial dañada semeja *in vitro* una condición de reparación tisular, en la cual se presenta angiogénesis (Marucha, P.T. *et al*, 1998). El hecho de que el receptor de PRL aumente su expresión bajo estas condiciones, coincide con lo reportado para el endotelio de arteria pulmonar bovina (Merkle, C, *et al*, 2000). El incremento en la expresión del receptor de PRL en las CERR dañadas es concordante con lo observado bajo el estímulo del bFGF. Este factor de crecimiento carece de péptido señal, por lo que no puede ser secretado bajo los mecanismos de secreción convencionales. La liberación del bFGF al espacio extracelular se ha observado en condiciones de daño celular o bajo un mecanismo de exocitosis independiente de la vía del retículo endoplásmico-Golgi (Ornitz, D. y Itoh, N., 2001). En el caso de la reparación del endotelio, es necesaria la presencia del bFGF y de otros factores angiogénicos para que activen señales cuyo resultado sea la reparación del tejido (D'Amore, P. 1999 y Yancopoulos, G. *et al*, 1998). Es por ello que al modelo de la monocapa dañada se le considera un modelo en el que está activa la proliferación celular en contraparte con la monocapa normal en la que las células mantienen inhibida su proliferación por contacto. Dado lo anterior, de los resultados aquí mostrados y con las evidencias de otros endotelios, se desprende la siguiente hipótesis: en la monocapa dañada de las CERR se secreta el bFGF, y este a su vez induce la expresión del receptor de PRL (Diagrama 2).

Se desconoce cual es la función que podría estar ejerciendo la PRL en la reparación de tejidos. De acuerdo con los datos del presente trabajo podría ser un factor que activa la proliferación del endotelio. Sin embargo, los datos de Merkle,

C. *et al.* (2000) sugieren un efecto opuesto al que aquí se propone, dado que la PRL en su modelo de monocapa dañada inhibe la movilidad celular y altera el citoesqueleto. La movilidad endotelial y un buen estado del citoesqueleto son condiciones necesarias para que se presente la angiogénesis. Por lo tanto, según los resultados de este grupo de investigación, la PRL estaría inhibiendo algunos eventos del proceso angiogénico. Esta discrepancia puede explicarse con base en la heterogeneidad del endotelio, o bien deberse a un efecto de la dosis utilizada de PRL, dado que en el modelo de monocapa dañada del endotelio de arteria pulmonar bovina se simuló una condición de hiperprolactinemia (1 $\mu$ M).

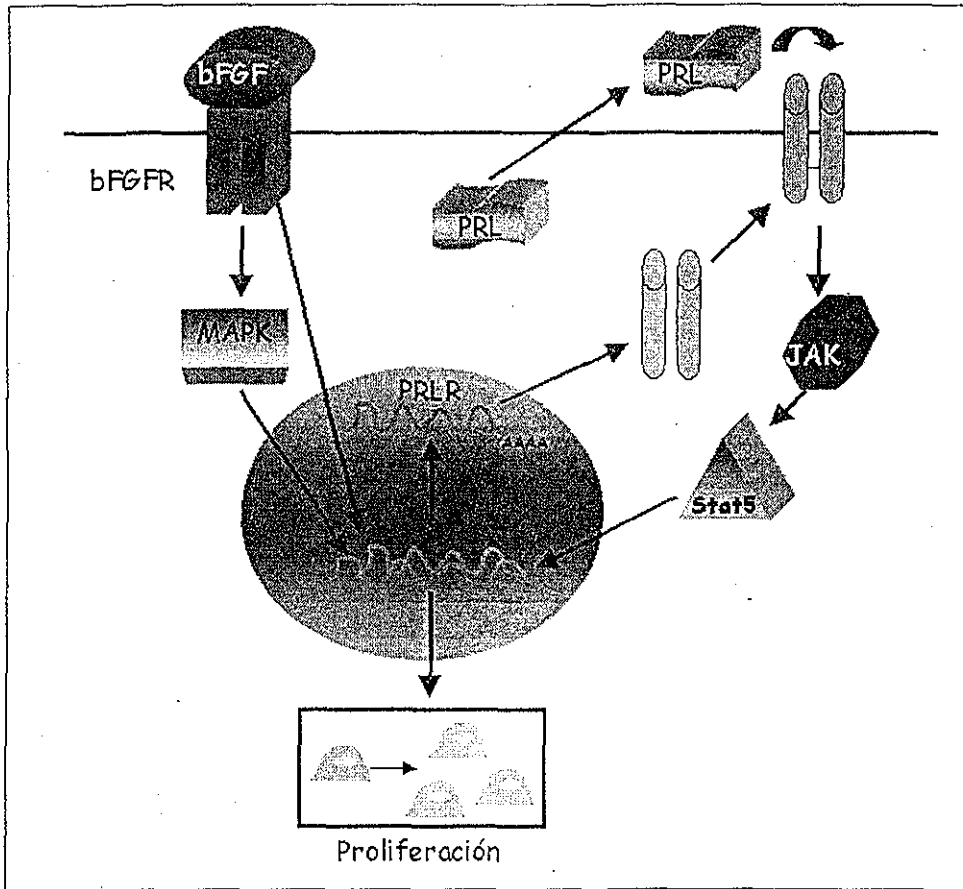
De acuerdo con lo propuesto en el Diagrama 1 y al incremento de expresión del rPRLR en condiciones de daño, la vía de transducción del receptor debería de activarse en el modelo de la monocapa dañada. En apoyo a esta hipótesis, mediante Western blot se detectó que en la monocapa dañada de las CERR se activa Stat 5b. Esta proteína está implicada en la vía de señalización empleada por diversas citocinas pertenecientes a las superfamilias de citocinas clase I y clase II, a las cuales pertenece la PRL. La activación de Stat 5b induce su translocación al núcleo y, de esta manera, reguía la transcripción de diversos genes, muchos de ellos implicados con el ciclo celular (Grimley, P.M. *et al.*, 1999). El hecho de que bajo el daño celular se active Stat 5b refuerza el modelo presentado en el Diagrama 2, donde el daño al endotelio induce la unión de la PRL a su receptor vía el aumento de expresión del receptor por efecto del bFGF. Sin embargo, con respecto a estos experimentos aún falta por determinarse si el aumento en la activación de Stat 5b que se observa en las CERR dañadas, se debe a la PRL o a otra citocina, dado que son muchas las proteínas que pueden activar Stat 5b.

A pesar de todas las implicaciones que se pueden desprender del presente trabajo, el objetivo principal radica en la función que puede estar ejerciendo la PRL de las CERR en este tejido o en el resto del ojo. Como ya se mencionó, una de sus funciones en el endotelio de la retina puede ser la regulación sobre la proliferación del mismo. Con respecto al ojo completo, la PRL de las CERR puede ser una fuente de la PRL de 23 kDa intraocular o ser la fuente de otras variantes,

como de la PRL de 16 kDa. Los resultados obtenidos con el Western blot no muestran la presencia del fragmento de 16 kDa en las CERR. Sin embargo, observaciones no publicadas, han demostrado que la PRL de 23 kDa puede ser cortada proteolíticamente a PRL de 16 kDa por enzimas presentes en el humor vitreo. En homogenados de retina también se ha encontrado a este fragmento (Dueñas, Z. y Clapp, C. observaciones no publicadas, 2000). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la PRL de 23 kDa de las CERR puede ser procesada a PRL de 16 kDa en diversos compartimentos oculares. La presencia de diferentes variantes de la PRL podría regular entonces a la angiogénesis ocular, y en particular, a la angiogénesis de la retina. Esta idea es apoyada por la inhibición que ejerce la PRL de rata de 16 kDa sobre la proliferación de las CERR estimulada por el bFGF. Este resultado coincide con y apoya los efectos antiangiogénicos reportados para el fragmento de 16 kDa de la PRL (Ferrara, N. *et al.*, 1991).

En el Diagrama 3 se resumen los hallazgos reportados en esta tesis, y se esquematizan algunas de sus implicaciones en la regulación de la angiogénesis ocular. La PRL (mARN y proteína) es producida por las CERR como un factor autócrino regulador de su proliferación dado que expresan al PRLR. Esta PRL puede ser una fuente de la PRL detectada intraocularmente con base en la presencia de la hormona en diversos tejidos y fluidos del ojo (córnea, iris, humor acuoso), o bien ser un factor parácrino que actúe sobre otros tipos celulares que expresen a su receptor (córnea). La PRL de 23 kDa de las CERR puede además ser convertida a PRL de 16 kDa en ciertos tejidos (retina, córnea) y fluidos oculares (humor acuoso). La presencia de ambas variantes puede regular el desarrollo de la angiogénesis ocular, en particular el de la retina, aunque se desconoce su función tanto en la angiogénesis ocular patológica como en la fisiológica.

DIAGRAMA 1

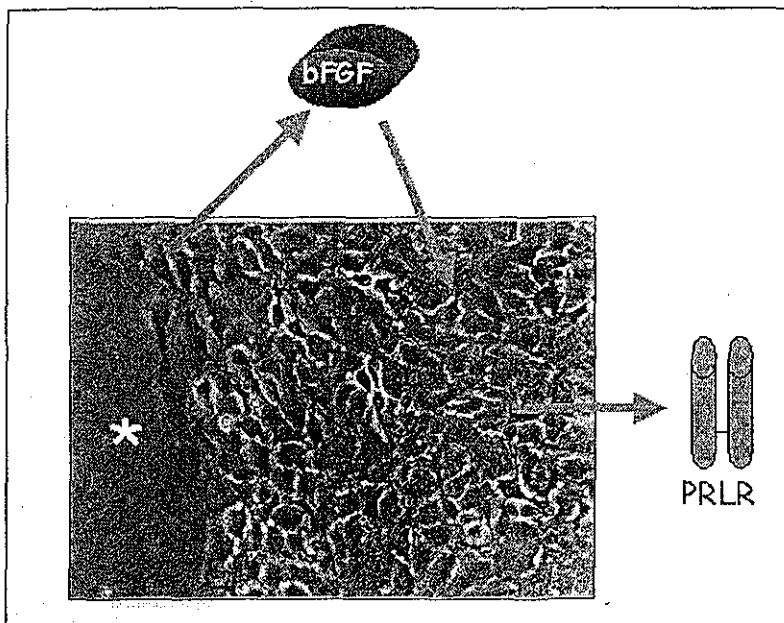


**Efecto del bFGF en las CERR**

El bFGF se une a su receptor en las CERR y, por una parte, induce la proliferación de estas células, y por otra induce la expresión del rPRLR. Una vez expresado el receptor, este es capaz de unir a la prolactina producida por las CERR (efecto autócrino), evento que va a activar la vía de transducción de señales que también va a dar lugar a la proliferación de las CERR.

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

DIAGRAMA 2



**Modelo de la Monocapa Dañada**

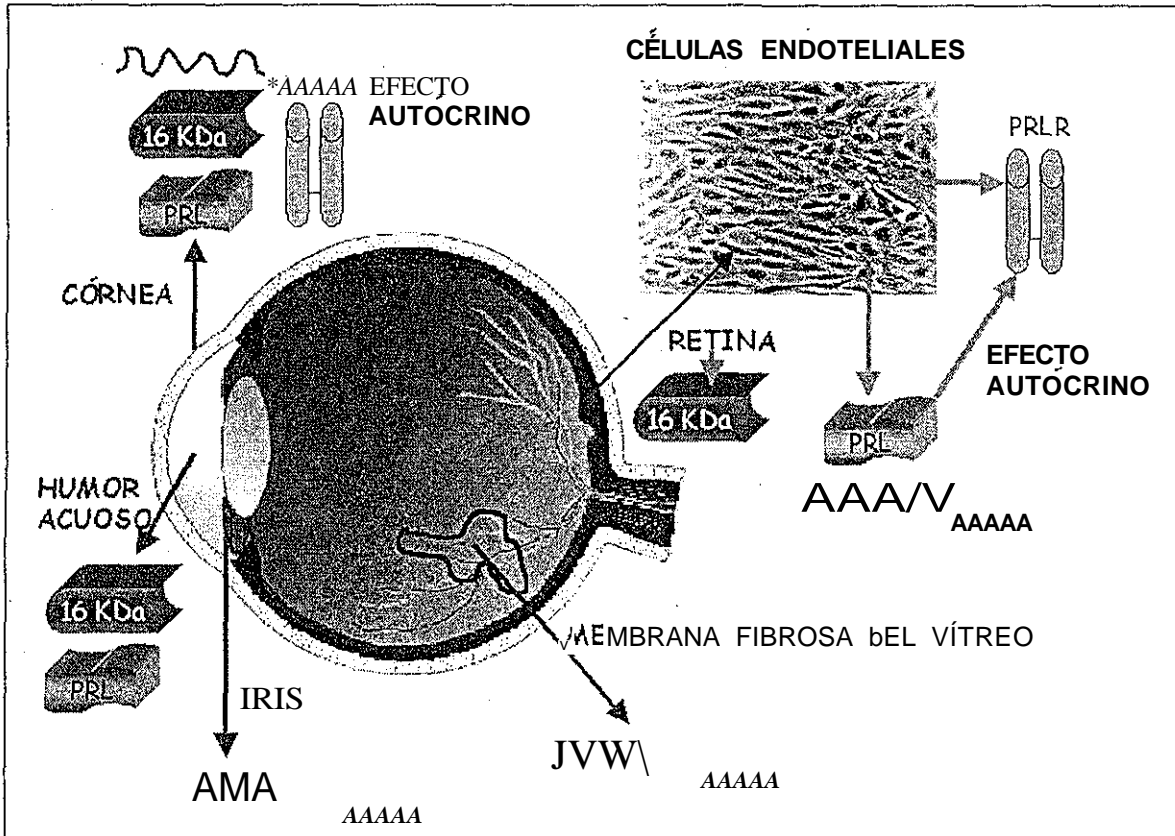
En CERR confluentes dañadas mecánicamente se secreta el bFGF, el cual entonces puede inducir la expresión del PRLR, y desencadenar los eventos que se describen en el Diagrama 1.

La foto que aquí se muestra corresponde a 24 horas de daño mecánico de las CERR en medio definido OPTIMEM.

\* Sitio en el que se realizó el daño mecánico a la monocapa.



DIAGRAMA 3



**La prolactina en el ojo: aportaciones del endotelio de retina de rata**

La PRL (mARN y proteína) es producida por las CERR como un factor autocrino regulador de su proliferación dado que expresan al PRLR. Esta Prolactina puede ser una fuente de la Prolactina detectada intraocularmente con base en la presencia de la hormona en diversos tejidos y fluidos del ojo (córnea, iris, humor acuoso), o bien ser un factor parácrino que actúe sobre otros tipos celulares que expresen a su receptor (córnea). La Prolactina de 23 kDa de las CERR puede además ser convertida a PRL de 16 kDa en ciertos tejidos (retina, córnea) y fluidos oculares (humor acuoso). La expresión del mARN de la prolactina también se ha detectado en el iris y en membranas fibrovasculares de niños con retinopatía del prematuro. Los datos aquí presentados conjuntan las evidencias reportadas en ratas y humanos.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## CONCLUSIONES

---

Dei presente trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

- \* El endotelio de retina de rata expresa el mRNA de la PRL de acuerdo con el análisis de Southern blot y la hibridación *in situ*.
- \* La PRL producida por las CERR es secretada como la isoforma madura de 23 kDa, a juzgar por los experimentos de Western blot, el ELISA y el bioensayo en las células Nb2.
- \* La PRL de las CERR puede ser un factor autócrino de acuerdo con la expresión de su receptor.
- \* La PRL en las CERR podría regular la proliferación de las mismas con base en los experimentos de inhibición de la proliferación estimulada por el bFGF al añadir un anticuerpo anti-PRL, y con el incremento de expresión del PRLR en CERR tratadas con bFGF y dañadas mecánicamente.

Los resultados mostrados en esta tesis proponen las siguientes perspectivas:

- Determinar la función que ejerce la PRL de las CERR en la angiogénesis patológica y fisiológica de la retina.
- Explorar si está implicada en otro tipo de función más allá de la angiogénesis, como puede ser la osmoregulación ocular.
- Determinar los mecanismos que regulan la expresión de PRL en el endotelio de la retina.
- Explorar la relación que existe entre el bFGF y la PRL en la regulación de la angiogénesis.

## BIBLIOGRAFÍA

Aiello, P., Avery, R., Arrigg, P., Keyt, B., Jampel, H., Shah, S., Pasquaie, L., Thieme, H., Iwamoto, M., Park, J., Nguyen, H., Aiello, M., Ferrara, N. y King, G. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *The New England Journal of Medicine*, 1994,331(22): 1480-1487.

Baird, A., Mormede, P., Ying, S., Wehrenberg, W., Ueno, N., Ling, N. y Guillemin, R. A nonmitogenic pituitary function of fibroblast growth factor: regulation of thyrotropin and prolactin secretion, *PNAS*, 1985, 82: 5545-5549.

Bengtson, N. y Linzer, D. Inhibition of tumor growth by the antiangiogenic placental hormone, proliferin-related protein. *Molecular Endocrinology*, 2000, 14(12): 1934-1943.

Ben-Jonathan, N., Mershon, J., Alien, D. y Steinmetz, R. Extrapituitary prolactin: **distribution**, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews*, 1996, 17(6): 639-669.

Bentzien, F., Struman, i., Martini, J.F., Martial, J. y Weiner, R. Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in *Rag 1<sup>-A</sup>* mice. *Cancer Research*, 2001, 61: 7356-7362.

Bole-Feysot, C, Goffin, V., Edery, M., Nadine, B. y Kelly, P. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in prolactin receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 1998, 19(3): 225-268.

Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *AnalBiochem*, 1976, 72: 248-54.

Campochiaro, P.A. Retinal and choroidal neovascularization. *Journal of Cellular Physiology*, 2000, 184: 301-310.

Carley, W., Niedbala, M. y Gerritsen, M. Isolation, cultivation, and partial characterization of microvascular endothelium derived from human lung. *Ame J Respir Cell Mol Biol*, 1992, 7:620-630.

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.

Clapp, C. y Weiner, R. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of human prolactin on capillary endothelial cells, *Endocrinology*, 1992, 130: 1380-1386.

Clapp, C, Lopez-Gomez, F., Nava, G., Corbacho, A., Torner, L., Macotela, Y., Dueñas, Z., Ochoa, A., Noris, G., Acosta, E., Garay, E., y Martínez de la Escalera G. Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells; evidence for autocrine effects. *Journal of Endocrinology*, 1998, 158: 137-144.

Clapp, C, Martial, J., Guzman, R.C., Rentier-Delrue, F. y Weiner, R. The 16 kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*, 1993, 133: 1292-1299.

Clapp, C, Torner, L, Gutiérrez-Ospina, G., Alcántara, E., López-Gómez, F.J., Nagano, M., Kelly, P., Mejía, S., Morales, M. y 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. *PNAS*, 1994, 91: 10384-10388.

Corbacho, A., Nava, G., Eiserich, J., Noris, G., Macotela, Y., Struman, I., Martínez de la Escalera, G., Freeman, B. y Clapp, C. Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000a, 275(18): 13183-3186.

Corbacho, A.M., Macotela, Y., Nava, G., Torner, L, Dueñas, Z., Noris, G., Morales, M., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *Journal of Endocrinology*, 2000b, 166: 53-62.

Corbacho, A.M., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. Angiogenesis: Actions of prolactin and of other members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family. *Journal of Endocrinology*, 2001, en revisión.

Chomczynski, P. y Sacchi, N. Single step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162: 156-159.

D'Amore, P., Ng, Y. y Darland, D. Angiogenesis. *Science and Medicine*, May/June, 1999:44-53.

D'Angelo, G., Martini, J.F., Liri, T., Fantl, W., Martial, J. y Weiner, R. 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Molecular Endocrinology*, 1999, 13: 692-704.

D'Angelo, G., Struman, I., Martial, J. y Weiner, R. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16 kDa N-terminal fragment of prolactin. *PNAS*, 1995, 92: 6374-6378.

Dawson, D., Volpert, O., Gillis, P., Crawford, S., Xu, H., Benedict, W. y Bouck, N. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*, 1999,285:245-248.

Dueñas, Z., Nava, G., Rivera, C. Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. Detection of prolactin expression and of the prolactin receptor in ocular tissues and fluids of the rat (Abstract). *Endocrine Society meeting*, 1999b, 81(158): P1-112.

Dueñas, Z., Torner, L., Corbacho, A., Ochoa, A., Gutierrez-Ospina, G., Lopez-Barrera, F., Barrios, F., Berger, P., Martínez de la Escalera G. y Clapp, C. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16 kDa prolactin by endogenous prolactin-like molecules. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1999a, 40: 2498-2505.

Fajardo, L., Kwan, H., Kawalski, J., Prionas, S. y Aílison.A. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *American Journal of Pathology*, 1992, 140(3): 539-544.

Ferrara, N., Clapp, C. y Weiner, R. The 16 K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology*, 1991, 129: 896-900.

Gerritsen, M., Carley, W. y Miñici, L. Microvascular endothelial cell[s]:isolation, identificación, and cultivation. En: *Advances in Cell culture*. Academic press, 1988, 6:35-65.

Greenwood, J. Characterization of a rat retinal endothelial cell culture and the expression of P-glycoprotein in brain and retinal endothelium in vitro. *Journal of Neuroimmunology*, 1992, 39:123-132.

Grimley, P., Dong, F. y Rui, H. Stat3a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine and Growth Factors*, 1999, 10: 131-157.

Gould, J., Arámburo, C., Capdevielle, M. y Scanes, C. Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the chick embryo chorio-allantoic membrane: a novel action of GH. *Life Sciences*, 1995, 56(8): 587-594.

Hackett, S., Ozaki, H., Strauss, R., Wahlin, K., Suri, Ch., Maisonpierre, P., Yancopoulos, G. y Campochiaro, P. Angiopoietin 2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization. *Journal of Cellular Physiology*, 2000, 184: 275-284.

Hayasaka, K., Oikawa, S., Hashizume, E., Kotake, H., Midorikawa, H., Sekikawa, A., Hoshi, K., Hará, S., Ishigaki, Y. y Toyota, T. Antiangiogenic effect of TGF $\beta$  in aqueous humor. *Life Sciences*, 1998, 63(13): 1089-1096.

Jackson, D., Volpert, O., Bouck, N. y Linzer, D. stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein. *Science*, 1994, 266: 1581-1584.

Klagsbrun, M. y D'Ámore, P. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine and Growth Factor Rev*, 1996, 7(3): 259-270.

Klagsbrun, M. y Moses, M. Molecular Angiogenesis. *Chemistry and Biology*, 1999, 6:R217-R224.

Lee, H., Struman, I., Clapp, C, Martial, J. y Weiner, R. Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology*, 1998, 139(9): 3696-3703.

Lelkes, P., Manolopoulos, V., Silverman, M., Zhang, S., Karmiol, S. y Unsworth, B. On the possible role of endothelial cell heterogeneity in angiogenesis. In: *Molecular, Cellular, and Clínica! aspects of Angiogenesis*. Ed. Maragoudakis, E., Plenum Press, New York, 1996: 1-17.

Lu, M., Amano, S., Miyamoto, K., Garland, R., Keough, K., Qin, W. y Adamis, A. Insulin-induced vascular endothelial growth factor expression in retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences*. 1999, 40(13): 3281-3286.

Martini, J.F., Piot, C, Humeau, L, Struman, I., Martial, J. y Weiner, R. The antiangiogenic factor 16K Prolactin induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Molecular Endocrinology*, 14(10): 1536-1549.

Marucha, P., Klecot-Glaser, J. y Favagehi, M. Mucosal wound healing is impaired by examination stress. *Psychosomatic Medicine*, 1998, 60: 362-365.

Mathura, J., Jafari, N., Chang, J., Hackett, S.F., Wahlin, K., Della, N., Okamoto, N., Zack, D. y Campochiaro, P. Bone morphogenetic proteins-2 and-4: negative growth regulators in adult retinal pigmented epithelium, *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences*, 2000, 41: 592-600.

Merkle, C, Schuler, L, Schaeffer, R., Gribbon, J. y Montgomery, D. Structural and functional effects of high prolactin levels on injured endothelial cells. *Endocrine*, 2000, 13(1): 36-46.

Meyer-Schwickerath, R., Pfeiffer, A., Blum, W., Freyberger, H., Klein, M., Losche, C, Rollmann, R. y Schatz. Vitreous levels of the insulin-like growth factors I and II, and the insulin like growth factor binding proteins 2 and 3, increase in neovascular eye disease. *Journal of Clinical Investigation*, 1993, 92:2620-2625.

Murata, T., Nakawaga, K., Khalil, A., Ishibashi, T., Inomata, H. y Sueishi, K. The temporal and spatial vascular endothelial growth factor expression in retinal vasculogenesis of rat neonates. *Laboratory Investigation*, 1996, 74(1): 68-77.

O'Reilly, M., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lañe, W., Flynn, E., Birkhead, J., Olsen, B. y Folkman, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, 88: 227-285.

O'Reilly, M., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R., Moses, M., Lañe, W., Cao, Y., Sage, E. y Folkman, J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, 79:315-328.

Ornitz, D. y Itoh, N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology*, 2001, 2(3): 30051-300512.

Ochoa, A., Montes de Oca, P., Rivera, J.C., Dueñas, Z., Nava, G., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2001, 42 (7): 1639-1645.

Ochoa, A., Rivera, C., Dueñas, Z., Nava, G., Clapp, C. and Martínez de la Escalera, G. Secretion of 23 kDa prolactin by endothelial cells from rat retinal capillaries. (Abstract). *Endocrine Society meeting*, 2000, 82: P-682.

Ozaki, H., Okamoto, N., Ortega, S., Chang, M., Ozaki, K., Sadda, S., Vinore, M., Derejjanik, N., Zack, D., Basilico, C. y Campochiaro, P. Basic fibroblast growth factor is neither necessary nor sufficient for the development of retinal neovascularization. *American Journal of Pathology*, 1998, 153(3): 757-765.

Ozaki, H., Seo, M., Ozaki, K., Yamada, H., Yamada, E., Okamoto, M., Hofmann, F., Wood, J. y Campochiaro, P. Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *American Journal of Pathology*, 2000, 156(2): 697-707.

Pe'er, J., Shweiki, D., Itin, A., Hemo, I., Gnessin, H. y Keshet, E. Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Laboratory Investigation*, 1995, 72: 638-645.

Pepper, M.S. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine and Growth Factor Rev*, 1997, 8: 21-43.

Quiroz, H., Dueñas, Z., López-Barrera, F., Nava, G., Ochoa, A., Noris, G., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. Detection of prolactin and prolactin mRNA in the eye of patients with retinopathy of prematurity (Abstract). *The 2000 ARVO annual meeting*, 1766-B12.

Rymaszewski, Z., Cohen, R. y Chomczynski, P. Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells *in vitro*. *PNAS*, 1991, 88:617-621.

Schweppe, R., Frazer-Abel, A., Gutiérrez-Hartmann, A. y Bradford, A. Functional components of fibroblast growth factor (FGF) signal transduction in pituitary cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(49): 30852-30859.

Sheibani, N., Sorenson, C., Corneüus, L. y Frazier, W. Thrombospondin-1, a natural inhibitor of angiogenesis, is present in vitreous and aqueous humor and is modulated by hyperglycemia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 267: 257-261.

Simorre-Pinatel, V., Guerrin, M., Chollet, P., Penary, M., Clamens, S. Malecaze, F. y Plouet, J. Vasculotropin-VEGF stimulates retinal capillary endothelial cells through an autocrine pathway. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1994, 35: 3393-3399.

Smith, L., Kopchick, J., Chen, W., Knapp, J., Kinose, F., Daley, D., Foley, E., Smith, R. y Schaeffer, J. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science*, 1997, 276: 1706-1709.

Stellmach, V., Crawford, S., Zhou, W. y Bouck, N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *PNAS*, 2001, 98(5): 2593-2597.

Stone, J. y Maslim, J. Mechanisms of retinal angiogenesis. *Progress in retinal and eyeresearch*, 1997, 16(2): 157-181.

Struman, I., Bentzien, F., Lee, H., Mainfroid, V., D'Angelo, G., Goffin, V., Weiner, R. y Martini, J. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *PNAS*, 1999, 96: 1246-1251.

Suzuma, L., Mandai, M., Takagi, H., Suzuma, K., Otani, A., Oh, H., Kobayashi, K. y Honda, Y. 17  $\beta$ -estradiol increases VEGF receptor-2 and promotes DNA synthesis in retinal microvascular endothelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences*. 1999, 40(9): 2122-2129.

Suzuma, K., Takagi, H., Otani, A., Oh, H. y Honda, H. Expression of thrombospondin-1 in ischemia induced retinal neovascularization. *American Journal of Pathology*, 1999, 154(2): 343-354.

Takagi, H., King, G., Ferrara, N. y Aiello, P. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor *KDR/flk* gene expression through adenosine  $A_2$  receptors in retinal capillary endothelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Sciences*, 1996, 37(7): 1311-1321.

Tanaka, T., Shiu, R., Gout, P., Beere, C. Noble, R.L., Friesen, J. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *Clin Endocrinol Metab*, 1980, 51: 1058-1063.



Wood, R., Zhang, J., Huang, Z., Gierow, P., Schechter, J., Mircheff, A. y Warren, D. prolactin and prolactin receptors in the lacrimal gland. *Experimental Eye Research*, 1999, 69: 213-226.

Wright, A., Kohner, E., Oakley, N., Hartog, M., Joplin, G. y Fraser, T. Serum growth hormone levels and the response of diabetic retinopathy to pituitary ablation. *British Medicine Journal*, 1969, 2:346-348.

Yamada, H., Yamada, E., Kwak, N., Ando, A., Suzuki, A., Esumi, N., Zack, D. y Campochiaro, P. Cell injury in masks a latent proangiogenic phenotype in mice with increased expression of FGF2 in the retina. *Journal of Cellular Physiology*, 2000, 185: 135-142.

Yancopoulos, G., Klagsbrun, M. y Folkman, J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell*, 1998, 93: 661-664.

Zetter, B. Angiogenesis and tumor metastasis. *Ann Rev Med*, 1998, 49: 407-424.