

2003

03040



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

Instituto de Neurobiología
Campus UNAM-UAQ

**“DETECCIÓN DE PRL OCULAR Y SU POSIBLE ASOCIACIÓN
CON TRASTORNOS NEOVASCULARES DE LA RETINA”**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Presenta:

Biol. José Carlos Rivera López

Asesora:

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora

UNAM-Juriquilla

2003

M. 317503

RIVERA LOPEZ JOSE CARLOS





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| I. INTRODUCCIÓN | 3 |
| a. Estructura de prolactina | 3 |
| b. Variantes de PRL | 5 |
| c. Receptores a PRL | 8 |
| d. Vía de señalización del receptor de PRL | 9 |
| e. Tejidos productores de PRL | 11 |
| f. Funciones biológicas de PRL | 12 |
| g. Efecto de PRL 16K sobre la angiogénesis | 12 |
| II. ANTECEDENTES INMEDIATOS | 13 |
| a. Angiogénesis | 13 |
| b. Angiogénesis normal y patológica | 14 |
| c. Vascularización ocular normal | 15 |
| d. Trastornos oculares asociados a neovascularización | 16 |
| e. Reguladores de la angiogénesis ocular | 18 |
| f. PRL's y angiogénesis ocular | 19 |
| III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 19 |
| IV. HIPÓTESIS | 20 |
| V. OBJETIVOS | 20 |

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: JOSE CUELOS
ALBERTO LOPEZ

FECHA: 31/10/2013

FIRMA: [Firma]
DR. ALBERTO BELMONTINO LOPEZ

| | |
|---|-----------|
| VI. METODOLOGÍA Y MÉTODOS | 21 |
| a. Obtención de muestras | 21 |
| b. Prolactinas y anticuerpos | 22 |
| c. Bioensayo de PRL | 22 |
| d. Ensayo inmunoenzimático (ELISA) | 23 |
| e. Inmunoprecipitación | 23 |
| f. Western blot | 24 |
| g. Ensayo de angiogénesis | 25 |
| | |
| VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 26 |
| a. PRL en suero y fluidos oculares de pacientes con retinopatía del prematuro (RP). | 26 |
| b. PRL en fluidos oculares y suero de pacientes con RP <i>versus</i> pacientes con trastornos no neovasculares. | 28 |
| c. Presencia de PRL 23 y 16K en suero y líquido subretiniano de pacientes con RP. | 31 |
| d. Actividad antiangiogénica de PRL 16K presente en el líquido subretiniano. | 33 |
| | |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA | 38 |

RESUMEN

Las prolactinas (PRLs) pertenecen a una familia de proteínas estructuralmente relacionadas derivadas de un solo gen. Estas proteínas existen en todos los vertebrados estudiados y ejercen más de 300 funciones biológicas distintas. Dentro de sus acciones se ha incluido recientemente a la angiogénesis ó formación de nuevos vasos capilares sanguíneos. Este proceso es determinante en el crecimiento de los tejidos y juega un papel importante en enfermedades tales como el cáncer, la artritis reumatoide y las retinopatías vasoproliferativas. En estas últimas los neovasos destruyen y alteran el funcionamiento de la retina y conducen a la pérdida de la visión. Se ha propuesto que estas enfermedades neovasculares son inducidas por isquemia ocular, y resultan de la acción de factores angiogénicos producidos en la retina. Sin embargo, la neovascularización ocular, también puede involucrar la inhibición de la producción de factores antiangiogénicos. Investigaciones recientes apoyan la posibilidad de que PRLs endógenas participan en la inhibición natural de la angiogénesis ocular. En la rata, el tratamiento *in vivo* de córneas con implantes conteniendo anticuerpos policlonales y mono-clonales anti-PRL, en particular de aquellos dirigidos contra el fragmento amino-terminal de 16 kDa, uno de los fragmentos de la PRL con propiedades antiangiogénicas, estimuló la formación de vasos capilares sanguíneos en dicho órgano. En apoyo a estos hallazgos se observó también que la PRL de 16 kDa inhibe la neovascularización de la córnea inducida por el factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos y que la PRL está presente en extractos de córnea y en el humor acuoso de la rata. Además se detectó el ARN mensajero de PRL en el epitelio externo de la córnea y en células endoteliales de la retina. El objetivo de este trabajo consistió en analizar la presencia de PRL en el ojo de humanos y su posible asociación con trastornos neovasculares de la retina, específicamente con la retinopatía del prematuro (RP). Nuestros resultados muestran la presencia de PRL en el humor acuso y en el líquido subretiniano de pacientes con RP. La concentración (medida por ELISA) en el humor acuoso y en el suero de estos pacientes es significativamente mayor ($P < 0.05$) a la del grupo control de pacientes de la misma edad con trastornos oculares no vasoproliferativos (cataratas). Las PRLs del líquido subretiniano y del suero se asocian con proteínas inmunorreactivas de 23 y 16kDa. En el líquido subretiniano la concentración de PRL 16K es mayor que en la circulación. Además, la adición de anticuerpos anti-PRL al líquido subretiniano, estimuló la proliferación de células endoteliales en cultivo. Este efecto estimulador podría deberse a que los anticuerpos secuestran a la PRL 16K antiangiogénica presente en el líquido subretiniano. En conclusión los hallazgos de este trabajo muestran la presencia de PRLs de 16 y 23 kDa en el ojo de humanos. Asimismo, se muestra que aumenta PRL en los pacientes con RP posiblemente como un mecanismo compensatorio para frenar la angiogénesis en las etapas posteriores de este padecimiento.

ABSTRACT

Prolactin (PRL) belongs to a family of proteins, structurally related and derived from a single gene. This protein exists in all vertebrates studied and has over 300 different functions. Recently, prolactin proteins were shown to have effects on angiogenesis (the formation of new blood vessels). This process determines the growth of tissue and plays an important role in diseases such as cancer, arthritis and vasoproliferative retinopathies. In the latter, the neovasculature destroys the retina producing blindness. Neovascular eye diseases are induced by retinal ischemia that in turn induces and blocks the production of angiogenesis stimulators and inhibitors, respectively. However, ocular neovascularization can also involve the inhibition of anti-angiogenic factors. Recent investigations have suggested that prolactins may contribute to the natural inhibition of ocular angiogenesis. It was shown in the rat that treatment of the cornea with implants containing anti-prolactin antibodies induces a local angiogenic response. This result is particularly significant since the N-terminal 16 kDa fragment of PRL (16K PRL), is known to inhibit the neovascularization of the cornea induced by basic fibroblast growth factor (bFGF); and that PRL is present in cornea and in the aqueous humor. Actually, PRL mRNA has been detected in the external epithelium of the cornea and in endothelial cells from the retina. The objective of this work is to analyze the presence of PRL in the human eye and its possible association with vasoproliferative retinopathies, specifically with retinopathy of prematurity (ROP). Our results demonstrate the presence of PRL on the aqueous humor and in subretinal fluid in patients with ROP. In this patients the concentration of prolactin (determined by ELISA) in the aqueous humor and in serum was significantly higher ($P < 0.05$) that in control patients with non-vasoproliferative eye diseases such as cataracts. The prolactins present in the subretinal fluid and serum are associated with immunoreactive proteins of 23 and 16 kDa. In the subretinal fluid the proportions of the 16K PRL relative to PRL is higher than the one in serum. Moreover, in the presence of anti-prolactin antibodies, the subretinal fluid stimulated the proliferation of endothelial cells in culture. This stimulation could reflect the immunoneutralization of the antiangiogenic 16K PRL in the subretinal fluid. In conclusion, our results support the presence of 23K and 16K PRL in the human eye. The high levels of prolactin in ROP patients could reflect the contribution of a compensatory mechanism to stop angiogenesis in the late stages of this disease.

I. INTRODUCCIÓN

a. Estructura de Prolactina

Las prolactinas (PRLs) pertenecen a una familia de proteínas estructuralmente relacionadas derivadas de un mismo gen. El gen de la PRL humana está presente como una única copia en el cromosoma 6, abarca (10 kb) y está compuesto de 5 exones y 4 intrones (Fig. 1). El ARN mensajero maduro de PRL posee 1 kb de longitud y codifica para una proteína de 227 aminoácidos que incluye un péptido señal de 28 aminoácidos que es escindido posteriormente (Ben-Jonathan et al., 1996)

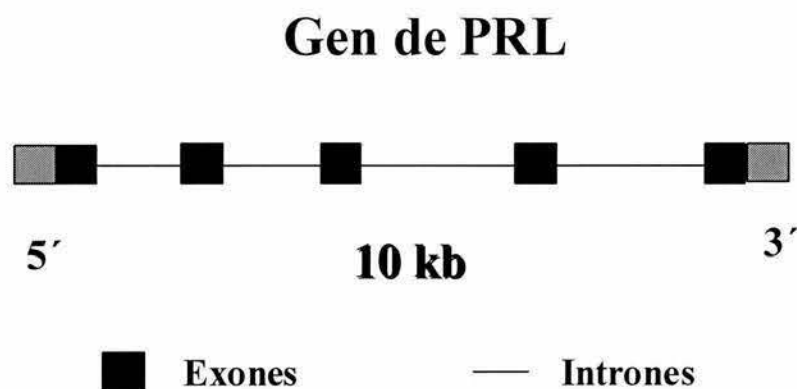


Figura 1. Esquema del gen de la prolactina que abarca 10 kilobases (kb) y está constituido por 5 exones separados por 4 intrones. Las barras rayadas representan ADN no traducido.

Con un peso de 23 kDa en su forma más común, la PRL consiste de una cadena polipeptídica de 197-199 aminoácidos según la especie, y presenta 6 residuos de cisteína, que se unen entre sí para formar tres puentes disulfuro: uno localizado cerca del extremo amino-terminal, otro en el extremo carboxilo-terminal y el tercero en la región intermedia, los cuales dan lugar a dos asas pequeñas (una amino y otro carboxilo terminal) y a una asa mayor intermedia (Fig 2).



Figura 2. Representación esquemática de la secuencia lineal de aminoácidos que conforman a la PRL de 23 kDa. Las líneas horizontales ilustran los 3 puentes disulfuro presentes en la molécula. Los círculos negros representan los aminoácidos conservados en las especies de rata, ratón, cerdo, bovino y humano (Tomada de Parlow & Shome, 1976).

b. Variantes de PRL

Si bien la PRL de 23 kDa es la forma molecular predominante de PRL (fig 3a), se ha documentado la presencia de isoformas moleculares estructuralmente relacionadas menos abundantes, que pueden originarse a partir del procesamiento alternativo del ARNm (fig. 3b) ó a través de modificaciones postraduccionales tales como sustituciones (fig. 3c), glicosilaciones (fig 3e), desaminaciones, fosforilaciones, agregación por puentes disulfuro (fig. 3f) y modificaciones proteolíticas (fig. 3d) (Sinha, 1995; Fig. 2).

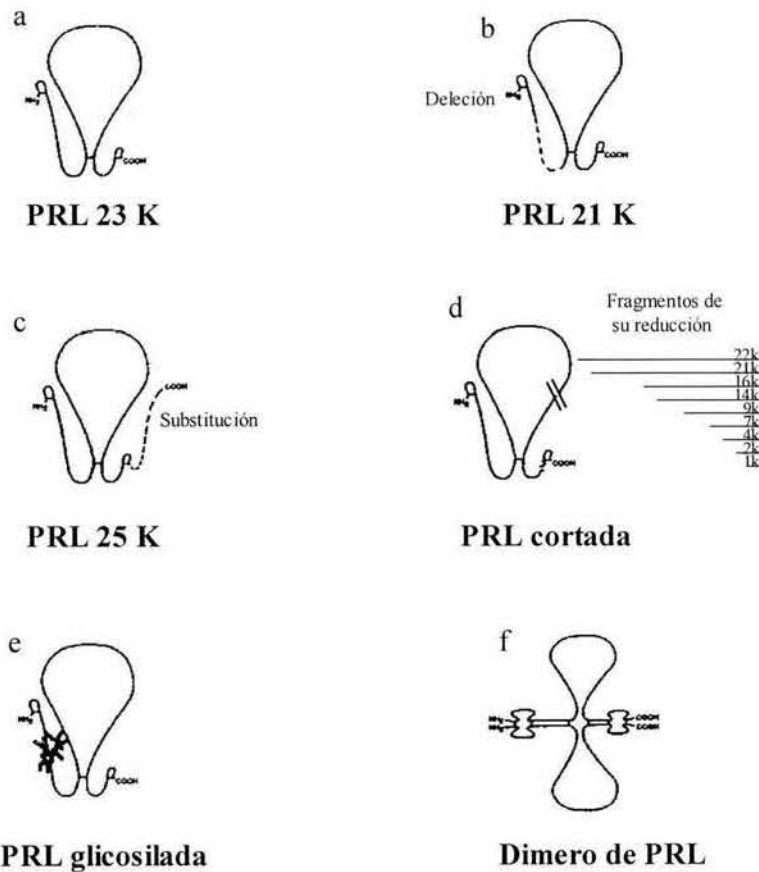


Figura 3. Isoformas moleculares de PRL generadas a partir de modificaciones postraduccionales (c, d, e y f) de la forma molecular predominante (a). Así como por el procesamiento alternativo del ARN mensajero (b).

El procesamiento alternativo del RNAm es un mecanismo común en la naturaleza, que genera heterogeneidad molecular en las proteínas. Existen evidencias de la existencia de un procesamiento alternativo del RNAm de PRL en la pituitaria y en tejidos cerebrales de la rata (Emanuele et al., 1992). Sin embargo, el producto proteico de este procesamiento no ha sido identificado, por lo que se considera controversial su contribución a la heterogeneidad estructural de la PRL.

La glicosilación es otra de las modificaciones postraduccionales que sufre la PRL, ocurre en los residuos de asparagina ubicados en la posición 31 de la molécula. La PRL glicosilada se ha detectado en la leche (Kacsoh et al., 1991), en el fluido amniótico (Lewis et al., 1985), en la pituitaria (Corcoran, et al 1991) y en el suero (Shoupe et al 1983) de muchas especies. Se ha determinado que la glicosilación puede influir en la actividad biológica de la PRL a través de disminuir su capacidad de unión al receptor (Hoffman et al., 1993).

Por otra parte, se ha determinado que una proporción significativa de moléculas de PRL están fosforiladas en muchas especies tales como el ratón (Oetting et al., 1986), los bovinos (Brooks et al., 1990) y las aves (Aramburo et al., 1992). Estas PRLs están fosforiladas en residuos de serinas (posición 26,34,133 y 177 de la molécula) y treoninas (posición 63). En algunas especies, como es el caso de bovinos, la PRL fosforilada constituye del 20 al 80 % de toda la PRL hipofisiaria. La fosforilación así como la glicosilación, generalmente disminuyen la actividad biológica de la PRL en los bioensayos clásicos para esta hormona (Wang et al., 1993).

El procesamiento de PRL por enzimas proteolíticas puede resultar en fragmentos con significado funcional. Se ha demostrado que este procesamiento proteolítico puede ocurrir en los tejido productores de PRL como es el caso de la pituitaria anterior (Mitra, 1980, Anthony et al., 1993) y el cerebro (De Vito, 1988) así como en tejidos que responden a la acción de PRL tales como la glándula mamaria (Clapp, 1987) y la próstata (Compton and Witorsch, 1984). Dos tipos de

corte a PRL se han estudiado a detalle, uno realizado por Kalikreina una proteasa de serina que es abundante en los lactotrofos de la glándula pituitaria y que corta a la PRL entre los aminoácidos 173 y 174. Este corte enzimático resulta en un fragmento de PRL de 22 kDa (Anthony et al., 1993). En apoyo a un posible significado funcional se ha mostrado que el procesamiento de PRL por Kalikreina varia de acuerdo al sexo y su regulación es dependiente de bromocriptina y agonistas de dopamina. El otro tipo de corte lo hace la catepsina D una enzima lisosomal capaz de cortar a la PRL entre los aminoácidos tirosina 145 y serina 149. La reducción subsecuente de su puente disulfuro intermedio resultan en la generación de un fragmento amino terminal de 16 kDa (PRL 16K) y uno carboxilo-terminal de 6 kDa (fig 4). La PRL 16K, más no la PRL completa inhibe la formación de vasos capilares sanguíneos (Clapp et al., 1993).

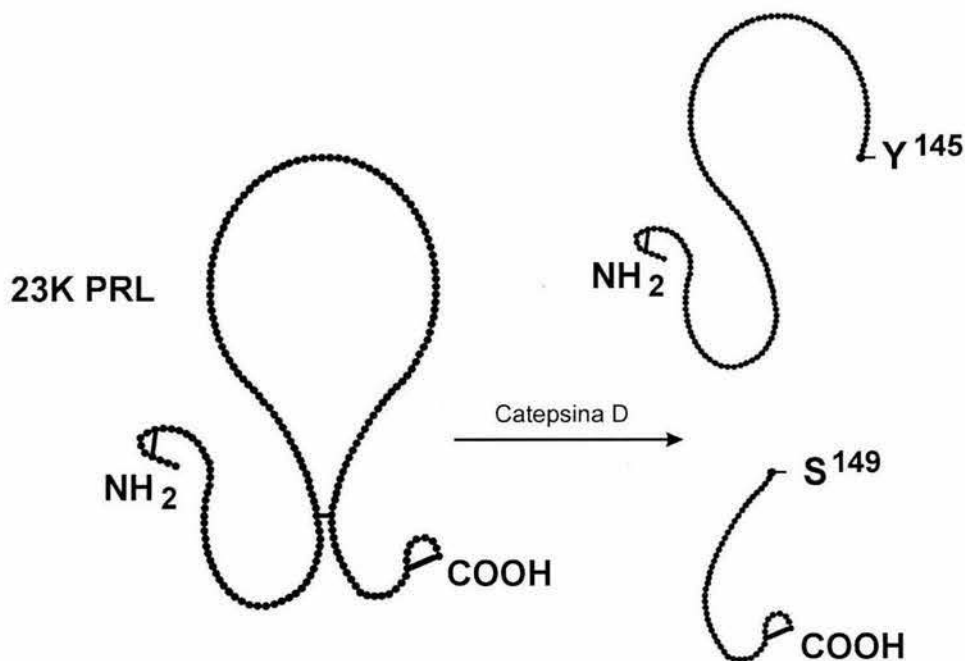


Figura 4. Esquema que representa el corte enzimático de la PRL entre los aminoácidos tirosina 145 y serina 149 por catepsina D. La reducción del puente disulfuro intermedio genera un fragmento N-terminal de 16 kDa y un C-terminal más pequeño de 6 kDa.

c. Receptores a PRL

Se conocen tres tipos de receptores a PRL que difieren en el tamaño de su dominio intra-citoplásmico. El primero de ellos, es considerado como la forma "larga" y fue clonado del ovario de la rata y se sabe que codifica para una proteína de 591 aminoácidos (Kelly et al., 1991); la forma "corta" del receptor se clonó del hígado de rata y codifica para una proteína de 291 aminoácidos (Kelly et al., 1991). Por último, se ha identificado una tercera forma "intermedia" que contiene 393 aminoácidos y que se localiza en la línea celular Nb2 proveniente de un linfoma murino (Ali et al., 1991; Fig 5).

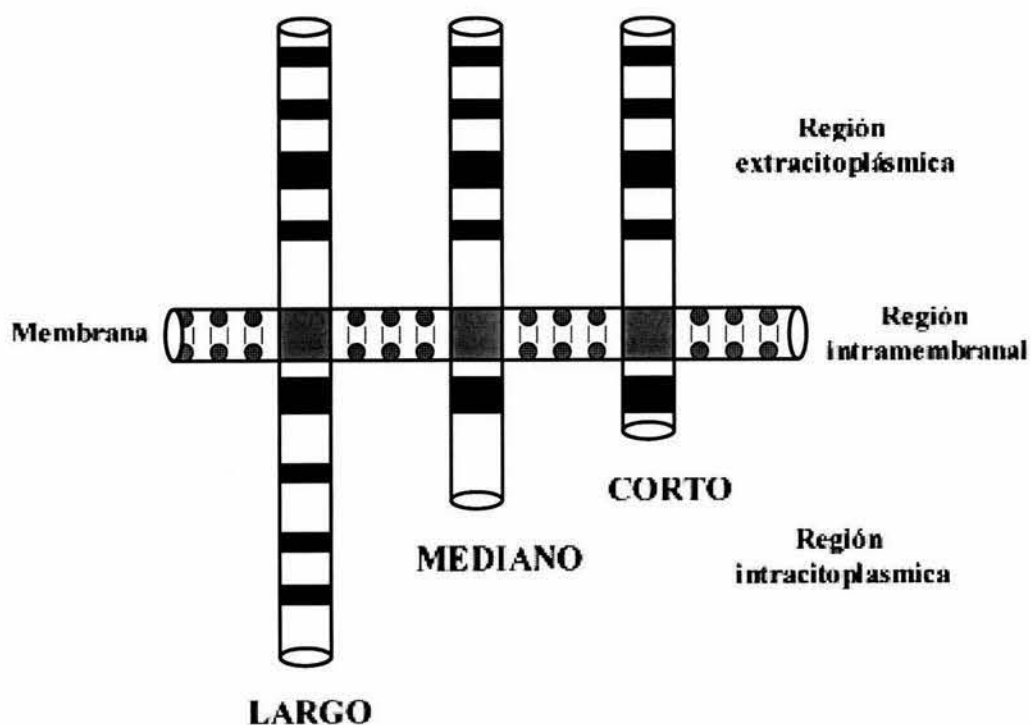


Figura 5. Receptores para PRL que varían en el tamaño de su región intracitoplásmica.

Receptor a PRL 16K

Evidencias directas apoyan la existencia de un receptor específico para la PRL 16K en membranas de células endoteliales (Clapp et al., 1992). Estas evidencias se basan en ensayos utilizando PRL 16K marcada isotópicamente que muestran su unión específica, saturable y de alta afinidad a membranas aisladas de células endoteliales. En estos experimentos se observó que la PRL integra no compitió por este sitio de unión con la PRL 16K. Tampoco lo hizo la hormona de crecimiento humana (hGH) que es lactogénica y capaz de activar a los receptores clásicos de PRL, ni el bFGF (Clapp et al., 1992).

d. Vía de señalización del receptor de PRL

La PRL inicia sus efectos a través de inducir la dimerización de sus receptores en la membrana de sus células blanco, lo cual conlleva a la activación de la vía denominada JAK/STAT ("Jannus Kinases" / "Signal Transducer and Activator of Transcription"). Las JAK representan a una familia de tirosinas cinasas capaces de fosforilar a los factores de transcripción STAT. La fosforilación de STAT permite su translocación al núcleo y su unión subsecuente a secuencias consenso en el ADN, llamadas GAS (Gamma Activation Site) lo que permite la transcripción de diferentes genes entre los que se incluye a la caseína, la lactoalbumina y los interferones α , β , y γ , entre otros (Bole-Feysot et al., 1998; Fig. 6).

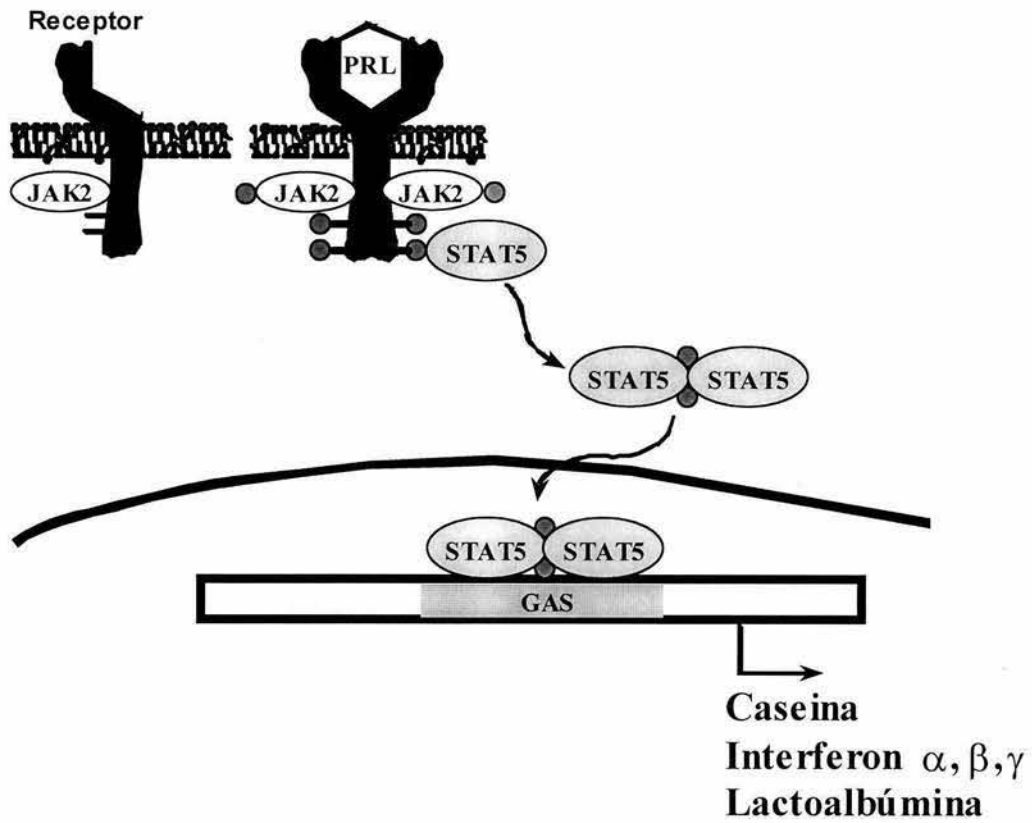


Figura 6. Cascada de activación intracelular iniciada por PRL. Esta vía se activa por la dimerización del receptor y resulta en la fosforilación de la activación de JAK/STAT y la subsecuente inducción de la transcripción de diferentes genes asociados a procesos de proliferación y diferenciación celular (Tomada de Yu Lee., 1997).

e. Tejidos productores de PRL

La PRL es producida principalmente por una clase de células de tinción ácida conocidas como mamotropos y somatotropos en la glándula pituitaria humana (Frawley, 1989). La producción de esta hormona fue considerada por mucho tiempo exclusiva de esta glándula. Sin embargo, su síntesis no está limitada a la hipófisis, ya que se ha demostrado que se encuentra presente en una gran variedad de tejidos no pituitarios que incluyen al sistema nervioso central, al sistema inmune, a la placenta, a la glándula mamaria y al endotelio vascular, entre otros (Ben-Jonathan et al., 1996; Fig. 7).

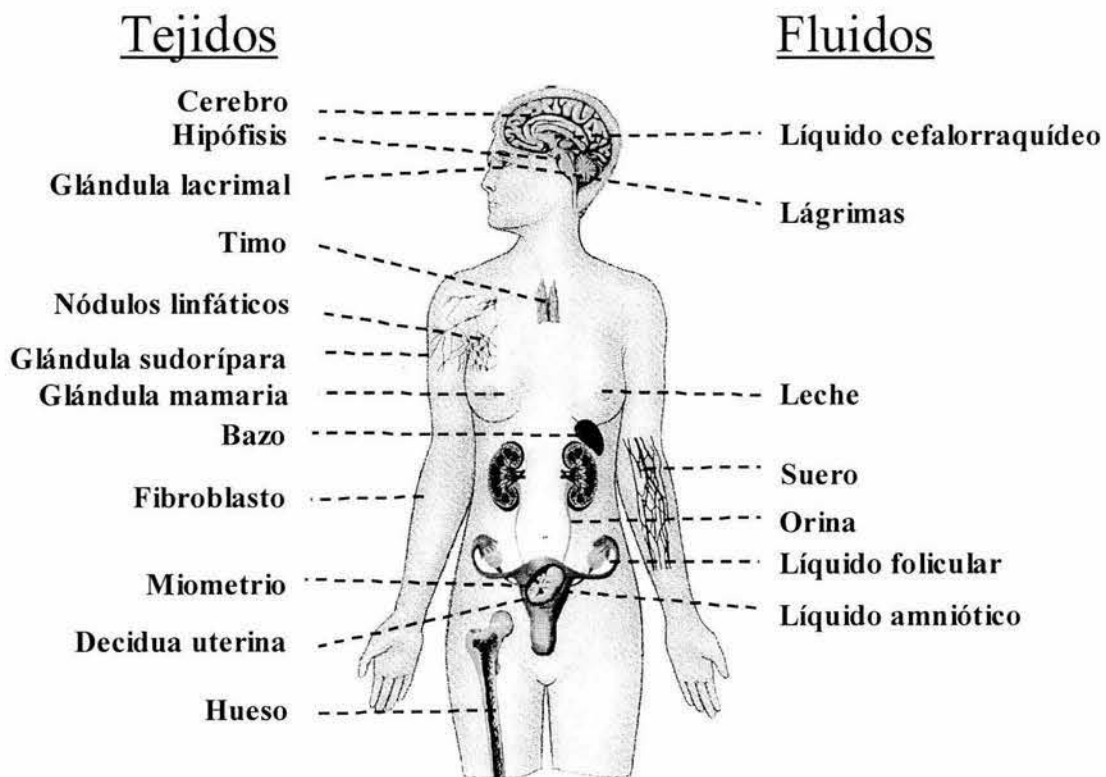


Figura 7. La PRL se produce en diferentes tejidos y se encuentra presente en la mayoría de los fluidos corporales (Tomada de Ben-Jonathan et al., 1996)

f. Funciones biológicas de PRL

La prolactina es una de las hormonas más versátiles del organismo. Encontrada en todos los vertebrados estudiados tiene participación en más de 300 diferentes efectos, en un rango que va desde el desarrollo mamario y la iniciación y mantenimiento de la lactancia en mamíferos, hasta la osmoregulación en peces, conducta de anidación en aves, crecimiento y metamorfosis en anfibios (De Vlaming, 1979, Nicoll, 1980, Kelly et al., 1991, Sinha, 1992, Ben-Jonathan et al., 1996, Bole-Feysot et al., 1998 y Fremman et al., 2000). Además, la PRL puede procesarse hacia fragmentos con actividades nuevas que amplían aún más el universo de efectos de esta hormona. Por ejemplo, la PRL 16K inhibe la formación de vasos sanguíneos a través de acciones directas sobre el endotelio vascular (Clapp et al., 1993).

g. Efecto de PRL 16K sobre la angiogénesis

La PRL 16K es capaz de inhibir la proliferación de células endoteliales de diversas especies y lechos vasculares (Clapp et al., 1993, Corbacho et al., 2002). Otro de los mecanismos por los cuales la PRL 16K ejerce su efecto antiangiogénico es mediante la inhibición de la urokinasa activadora del plasminógeno (uPA). La activación de uPA es fundamental en la regulación del anangiogénesis porque activa la cascada de proteasas que degradan la matriz extracelular y por lo tanto, juegan un papel esencial en la migración de las células endoteliales y en la reparación de los tejidos. El tratamiento de células endoteliales derivadas de capilares de cerebro bovino con PRL 16K, inhibe la actividad de la uPA a través de estimular la expresión del inhibidor del plasminógeno-1 (PAI-1), uno de los inhibidores de uPA (Lee et al., 1998). La PRL 16K también inhibe la asociación de las células endoteliales en estructuras tubulares semejantes a capilares, que ocurre cuando estas son cultivadas en geles de colágena (Clapp et al., 1993). Este efecto se interpreta como que PRL 16K es inhibidor de la organización de la red capilar. De hecho estas acciones sobre el endotelio se

traducen en una inhibición del proceso integral de la angiogénesis que ocurre *in vivo*. La PRL 16K inhibe la angiogénesis en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo (Clapp et al., 1993), así como la angiogénesis inducida por bFGF en córnea de la rata (Dueñas et al., 1999).

II. ANTECEDENTES INMEDIATOS

a. Angiogénesis

El proceso de formación de nuevos vasos capilares sanguíneos a partir de vasos pre-existentes se conoce con el nombre de "angiogénesis". Este proceso se divide en cuatro fases principales que incluyen: la degradación local de la membrana basal del capilar por acción de proteasas secretadas en su mayor parte por el endotelio, que permite la migración de las células endoteliales, su proliferación y posterior organización en estructuras tubulares. Finalmente, los nuevos capilares completan su diferenciación formando una nueva membrana basal (Folkman & Klagsbrun, 1987 y Birchhoff, 1995) (Fig. 8).

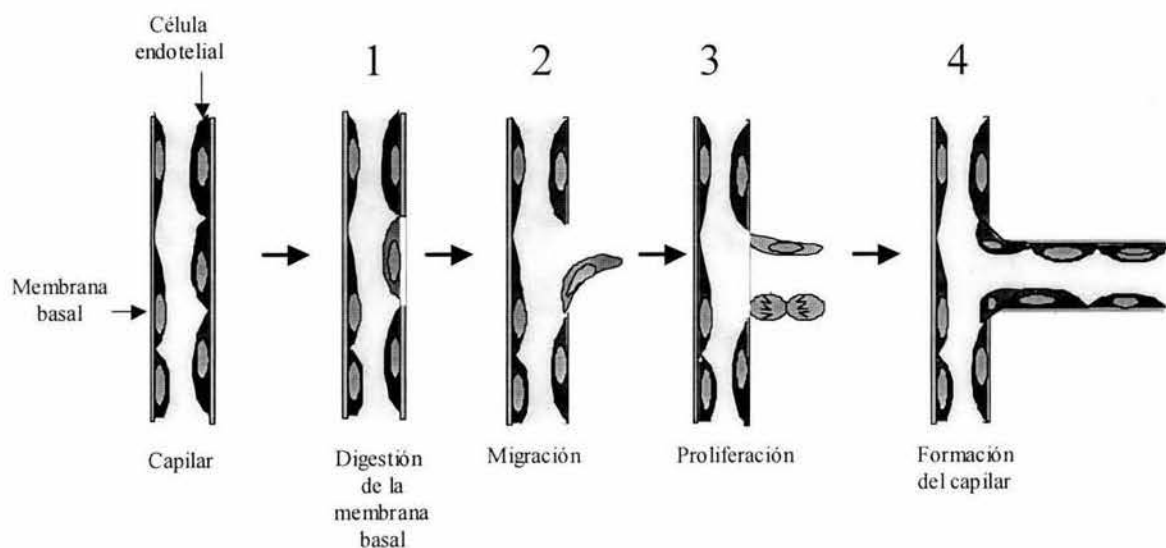


Figura 8. Esquema que representa las diferentes etapas de la angiogénesis.

b. Angiogénesis normal y patológica.

El proceso angiogénico determina el crecimiento y diferenciación de los tejidos durante el desarrollo embrionario y fetal. Sin embargo, después del nacimiento la angiogénesis disminuye y en el adulto ocurre muy raramente a excepción de eventos en el aparato reproductor femenino. Por ejemplo, en el ovario, la angiogénesis participa en el desarrollo de los folículos, en la ovulación y determina la función del cuerpo lúteo. Asimismo la formación de nuevos vasos sanguíneos es esencial para los procesos de implantación, embarazo y lactancia. La angiogénesis también forma parte de procesos de reparación tisular, cicatrización de heridas y reacciones inflamatorias (Battegay, 1995 y Folkman, 1997)

Si bien la angiogénesis es determinante de diversos procesos fisiológicos el enorme interés por el entendimiento de los mecanismos que subyacen a la formación de nuevos vasos sanguíneos ha sido consecuencia del reconocimiento de diversas patologías que dependen de la sobreproducción de neovasos. Por ejemplo, el desarrollo y metástasis de los tumores sólidos dependen de los nuevos vasos sanguíneos que permiten al tumor alcanzar una tasa de crecimiento máxima, a través de aportar oxígeno y nutrientes y extraer sustancias de desecho. Asimismo, los nuevos capilares proveen de una ruta para la migración de las células tumorales hacia la formación de tumores secundarios (Folkman, 1997) Otros padecimientos dependientes de la angiogénesis, son la artritis reumatoide, donde los nuevos vasos invaden y destruyen el cartílago de la articulación (Weber and Bandt, 2000) y las retinopatías vasoproliferativas que son el tema de estudio de este trabajo y que resultan de la formación de neovasos que destruyen y desprenden la retina y son las principales causas de ceguera en el mundo (Battegay, 1995 y Polverini, 1995)

c. Vascularización ocular normal.

El ojo es considerado un órgano de alta especialización que nos permite la detección y el análisis de los patrones de distribución de la luz en el tiempo y el espacio. El ojo funciona de manera semejante a una cámara fotográfica. La luz pasa a través de la córnea, una membrana transparente localizada al frente del globo ocular y el cristalino, el cual la enfoca hacia la retina. El iris, la parte coloreada del ojo, define a la pupila, la cual controla la cantidad de luz que penetra hacia la retina. Los rayos de luz pasan a través de la cavidad del vítreo que esta lleno de un material gelatinoso transparente y finalmente llega a la retina, donde estimula a los fotorreceptores y dicha activación es transmitida hacia el cerebro a través del nervio óptico (Hart, 1992) (fig. 9)

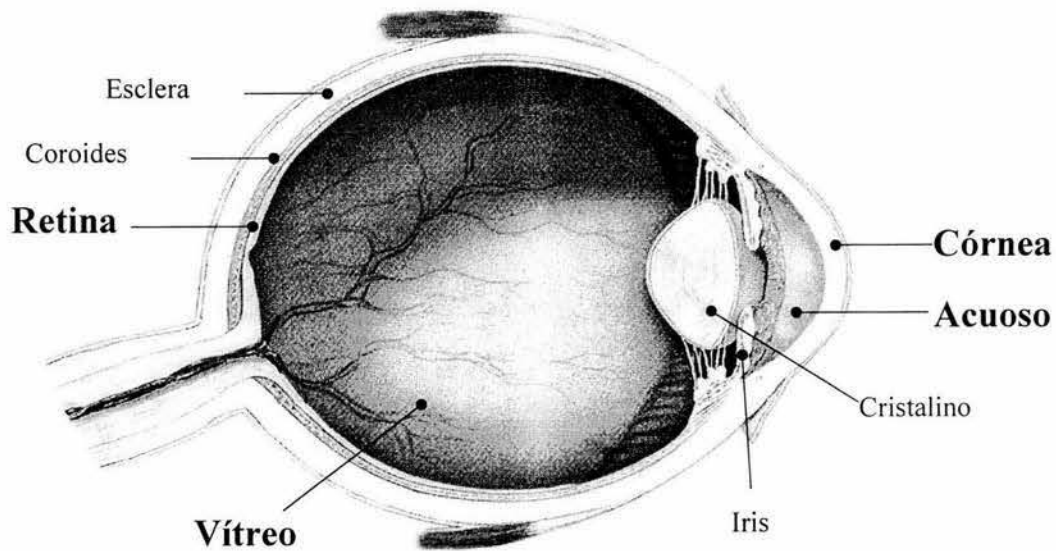


Figura 9. Principales estructuras del ojo humano.

El ojo se nutre a partir de dos sistemas vasculares importantes que son los vasos sanguíneos de la retina y los vasos sanguíneos de la uvea, estos últimos incluyen los vasos sanguíneos del iris, del cuerpo ciliar y de la coroides. En mamíferos inferiores, el principal aporte de circulación sanguínea a la retina lo da la coroides ya que los vasos de la retina ocupan una pequeña área, mientras que en mamíferos superiores el aporte de sangre a la retina lo dan ambos lechos capilares, es decir los de la retina y los de la uvea. La irrigación de la retina está distribuida en los dos primeros tercios de las capas celulares internas, mientras que las capas externas (incluyendo a los fotorreceptores) son avasculares y se nutren principalmente de la coroides (Adamis, 1999, Campochiaro, 2000).

d. Trastornos oculares asociados a neovascularización

Bajo ciertas condiciones ambientales y patológicas, el flujo sanguíneo de la retina puede alterarse y producir dos tipos patológicos de neovascularización ocular: la primera es la neovascularización retinal (que incluye a la retinopatía diabética y del prematuro), en la que los vasos provenientes de las capas más externas de la retina atraviesan las capas internas avasculares y llegan hasta el vítreo. La segunda es la neovascularización coroidal (degeneración macular asociada con la edad) en la que los vasos provenientes de la coroides penetran la membrana de Bruch's, destruyen el epitelio pigmentario de la retina y a los fotorreceptores. (Campochiaro, 2000).

El desarrollo de angiogénesis intraocular es el resultado de la acción de factores angiogénicos inducidos por hipoxia (Patz, 1980). La hipoxia puede originarse de alteraciones en la concentración de oxígeno ambiental (retinopatía del prematuro) o de una reducción del flujo sanguíneo en la microcirculación de la retina (retinopatía diabética). En todos los casos la hipoxia resulta en la formación de nuevos vasos que invaden la retina y el humor vítreo. Los neovasos son muy permeables, generan edema y atraen células vecinas involucradas en la formación

de tejido fibroso que con el tiempo puede ocasionar el desprendimiento de la retina y la pérdida total de la visión (Gopal et al, 2000).

En la retinopatía diabética se han propuesto varias causas de hipoxia en la retina. Por ejemplo, se ha observado que los pacientes diabéticos tienen una proporción importante de hemoglobina glicosilada y que este cambio interfiere con su capacidad de transportar oxígeno (Adamis et al., 1999). Asimismo, la formación de trombos ocasionados por una acumulación de plaquetas y fibrina en la luz de los capilares retinales puede contribuir también con una falta de oxigenación retinal (Boeri et al., 2001). La incidencia de la retinopatía vaso-proliferativa en diabéticos es alta y se incrementa con los años del padecimiento. Así, las estadísticas indican que este padecimiento se presenta en el 99% de los pacientes diabéticos insulino-dependientes con 20 años de enfermedad y que el 66% de diabéticos no insulino-dependientes poseen algún grado de retinopatía vasoproliferativa (Gopal et al., 2000)

Por otra parte, se encuentra la degeneración macular asociada con la edad (AMD) la cual es considerada como la principal causa de ceguera en personas mayores de 60 años. En esta patología ocular, los neo-vasos se generan de la circulación coroidal, estos vasos atraviesan la membrana de Bruch's, llegan al epitelio pigmentario retinal y al espacio subretinal. Por una razón desconocida, la neovascularización ocurre más exclusivamente en la macula central y en la región perimacular de la retina donde produce un gran daño. Los vasos son permeables y producen acumulación de fluido, lípidos y sangre que conduce a la muerte de los fotorreceptores centrales (Adamis et al., 1999)

Otro de los trastornos oculares de alto impacto clínico en países subdesarrollados, es la retinopatía del prematuro. Este padecimiento se presenta en niños prematuros como consecuencia de su exposición a niveles altos de oxígeno cuando son puestos dentro de la incubadora. La hiperoxia produce la oclusión y la regresión de los capilares, de manera que el retorno a la normoxia

ambiental se registra en la retina como una hipoxia local. En el 10% de los prematuros, el endotelio de los capilares retinales reacciona a esta hipoxia con angiogénesis. De la misma forma que en los pacientes diabéticos, los nuevos capilares provenientes de la circulación retinal penetran por la membrana limitante interna de la retina y crecen hacia la cavidad del vítreo produciendo un tejido fibroso que eventualmente desprende la retina (Campochiaro, 2000). La fotocoagulación temprana de neovasos evita el padecimiento, sin embargo este tratamiento no siempre es posible en los países subdesarrollados, donde la mayoría de estos niños pierden la visión (Gopal et al, 2000 y Kent et al., 2000)

e. Reguladores de la angiogenesis ocular

Aunque existen muchos factores involucrados en el desarrollo de la neovascularización ocular, la hipoxia es uno de los estímulos más potentes para inducir angiogénesis (Campochiaro, 2000 y Lonchampt et al., 2001). Entre los factores angiogénicos más importantes inducidos por hipoxia se encuentran el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual actúa de manera específica sobre células endoteliales y el factor de crecimiento insulínico tipo-1 (IGF-1) (Adamis et al., 1993 y Aiello et al., 1994). Si bien, estos padecimientos oculares involucran diversos factores estimuladores de la angiogénesis, no podemos descartar la participación de factores antiangiogénicos que permiten mantener un equilibrio en el proceso de formación de vasos sanguíneos intraoculares (Ferrara et al., 1992). Por ejemplo, se ha observado que el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) una molécula de 50 kDa producida en grandes cantidades por el epitelio pigmentario de la retina, forma parte de los principales inhibidores naturales de la angiogenesis en la cornea, vítreo y retina (Dawson, et al., 1999 y Stellmach et al., 2000).

De esta forma, es clara la importancia que ha despertado en los últimos 20 años el descubrimiento de nuevos factores involucrados en la regulación de la angiogenesis ocular, incluidos dentro de estos factores a la familia de la PRL.

f. PRL y angiogénesis ocular

Investigaciones recientes son consistentes con la posibilidad de que PRLs endógenas participan en la inhibición natural de la angiogénesis a nivel ocular (Dueñas et al., 1999) Se sabe que la córnea es un órgano avascular, esta característica la comparte con el cartílago y parece ser consecuencia de un predominio de la acción de factores inhibidores sobre los estimuladores de la angiogénesis (Polverini, 1995) El tratamiento *in vivo* de córneas con implantes conteniendo anticuerpos poli y mono-clónales anti-PRL de rata, en particular de aquellos dirigidos contra el fragmento amino-terminal 16 kDa, uno de los fragmentos de la PRL con propiedades antiangiogénicas, estimuló la formación de vasos capilares sanguíneos en dicho órgano (Dueñas et al., 1999). En apoyo a la especificidad de este efecto, no se observaron cambios vasculares en córneas implantadas con concentraciones similares de IgGs pre-inmunes ó proteínas no específicas (albúmina de suero bovino). Estos hallazgos sugieren que PRLs con efectos antiangiogénicos, capaces de ser neutralizadas con anticuerpos, podrían formar parte de los factores que inhiben la vascularización de la córnea. En apoyo a estos hallazgos se observó que la PRL de 16 kDa inhibe la vascularización de la córnea inducida por el factor de crecimiento básico derivado de fibroblastos (bFGF) (Dueñas et al., 1999) y que PRL inmunoreactiva (ELISA) está presente en extractos de córnea y en el humor acuoso de la rata (Rivera, 2001). Si bien, no se puede descartar la contribución de PRL sistémica, parte de esta PRL ocular parece producirse localmente. El epitelio externo de la córnea *in situ* (Dueñas et al., 1999) y el endotelio de capilares retinales *in vitro*, expresan el RNA mensajero de PRL y secretan PRL al medio de cultivo (Ochoa et al., 2001).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la importancia de la angiogénesis tanto en procesos fisiológicos como patológicos, es necesario dedicarle un importante esfuerzo a la identificación, caracterización y cuantificación de factores químicos que intervienen en su

regulación, con la esperanza de que aquellos agentes capaces de controlar el crecimiento vascular podrían ser utilizados como una opción para el tratamiento de las patologías mencionadas. En este trabajo se propuso analizar la presencia de PRL en el ojo humano y su posible asociación con trastornos neovasculares de la retina (retinopatía del prematuro) *versus* trastornos no neovasculares (cataratas). Además se caracterizó el peso molecular y la actividad angiogénica de las PRLs presentes en ambos grupos de pacientes. Al respecto ya se tenían resultados preliminares que muestran la presencia de PRL inmunoreactiva en biopsias de tejidos y fluidos oculares de niños con retinopatía del prematuro (Quiroz et al., 2000).

IV. HIPÓTESIS

La PRL y la PRL 16K están presentes en el ojo de pacientes con retinopatía del prematuro y su concentración se asocia al padecimiento.

V. OBJETIVOS

1. Comparar las concentraciones de PRL inmunorreactiva y bioactiva en fluidos oculares y suero de pacientes con retinopatía del prematuro *versus* pacientes con trastornos oculares no vasoproliferativos.
2. Analizar el peso molecular de las PRLs presentes en los fluidos oculares y en el suero de los pacientes con retinopatía del prematuro.
3. Determinar si la PRL presente en los fluidos oculares de los pacientes con retinopatía del prematuro tiene acciones sobre proliferación de células endoteliales en cultivo.

VI. METODOLOGÍA Y MÉTODOS

a. Obtención de muestras

La recolección de las muestras se hicieron en colaboración con el Dr. Hugo Quiroz, Jefe del Servicio de Retina, Hospital Luis Sánchez Bulnes de la Asociación para Evitar la Ceguera en México. El diagnóstico y las cirugías de los pacientes fueron realizados por el equipo médico del Dr. Quiroz. El protocolo de recolección de las muestras biológicas fue previamente autorizado por los pacientes y aprobado por el comité de ética e investigación del Hospital.

Las biopsias obtenidas pertenecieron a pacientes de ambos sexos, cuyas edades oscilaban entre 6 meses y 3 años de edad y que fueron diagnosticados con retinopatía del prematuro grado 5, el grado más alto de esta patología, que se caracteriza por presentar un tejido fibroso muy vascularizado en la cámara del humor vítreo y cuyo tratamiento requiere de la intervención quirúrgica (Gopal et al., 2000).

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

Como grupo testigo se utilizaron biopsias de pacientes con trastornos oculares no neovasculares (cataratas congénitas y cataratas traumáticas) los cuales se caracterizan por presentar una opacidad del cristalino. De tal forma que los niños tienen que ser operados para corregir el daño. En este grupo la edad de los pacientes oscilo entre 1 y 7 años. Las biopsias obtenidas de estos pacientes fueron solamente humor acuoso y suero.

b. Prolactinas y anticuerpos.

La PRL humana fue donada por el Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis de los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos de Norteamérica (NHPP-NIH, Bethesda, MD). La PRL 16K utilizada fue generada por mutagénesis dirigida del ADN complementario de la PRL humana, de acuerdo a los procedimientos descritos previamente (Clapp et al., 1993). Anticuerpos monoclonales anti-PRL humana fueron adquiridos comercialmente (GENZYME, Corp. Framingham, MA) y los policlonales fueron aislados de antiseros generados localmente en conejo de acuerdo al método publicado (Dueñas et al., 1999)

c. Bioensayo de PRL

Las células Nb2 es una línea celular derivada de un linfoma murino cuya proliferación es función directa de la concentración de PRL y representa un bioensayo específico y sensible de esta hormona (Tanaka et al., 1980). Las células Nb2 son cultivadas en medio de mantenimiento (Medio DMEM, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 10 % de suero de caballo (HS), 3.3 µl de β-mercaptoetanol y antibióticos). Veinticuatro horas antes del ensayo las células Nb2 se colocaron en medio estacionario (DMEM suplementado con 0.1 % FBS, 10 % de HS, 3.3 µl de β-mercaptoetanol y antibióticos) para sincronizar sus ciclos de división celular. 1.5×10^3 células/pozo fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos y llevadas a un volumen final de 100 µl con medio de bioensayo (DMEM libre de FBS y suplementado con 10 % de HS, 3.3 µl de β-mercaptoetanol y antibióticos). Concentraciones crecientes de PRL se adicionaron por triplicado para obtener una curva dosis-respuesta contra la cual comparar las respuestas proliferativas a distintas diluciones de las muestras problema. La especificidad del efecto se evaluó a través de su bloqueo con anticuerpos anti-PRL humana. La placa fue incubada por 72 horas a 37 °C

(Tanaka et al., 1980). La proliferación celular se midió a través de un ensayo colorimétrico basado en la reducción mitocondrial de sales de tetrazolium MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)- 2,5 difenil bromuro de tetrazolium) a cristales de formazan (color azul oscuro). El producto colorido fue leído en un espectrofotómetro a 595 nm y la absorbancia resultante fue directamente proporcional al número de células presentes en cada pozo (Mosmann, 1983).

d. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Se utilizó un ELISA comercial ya establecido y caracterizado para la PRL humana (Genzyme Diagnostics, San Carlos, CA. USA.) El ELISA utiliza anticuerpos policlonales anti-prolactina como fase sólida. Cuando se incuba la muestra biológica estos anticuerpos capturan a la PRL presente formando un complejo. Este complejo es detectado utilizando un segundo anticuerpo monoclonal anti-PRL humana acoplado a peroxidasa que reacciona con un sustrato (TMB (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina) y H₂O₂), y produce una coloración la cual es cuantificada en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 450 nm.

e. Inmunoprecipitación

Doscientos µL de muestra se incubaron con suero preinmune de conejo (1:100) durante una hora. Posteriormente se les adicionó pansorbina al 10 % (Sigma, Cat. 507058) y se les incubó por 30 minutos a 4 °C. Las muestras se centrifugaron y al sobrenadante se le agregó proteína A-sefarosa (Sigma, Cat. P-3391) y se le incubó durante 2 horas a 4 °C con agitación constante. Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se recuperó y se llevó a un volumen de 1 ml con amortiguador net-gel (Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 0.1 %, EDTA 1 mM, pH 8.0, Gelatina 0.25 % y Azida de sodio 0.02 %). A este volumen se le añadió suero anti-PRL humana generado localmente (C-1, 1:500) y se incubó por 4 °C con agitación constante durante 24 h. Al termino de este tiempo se adicionó más proteína A-sefarosa y las muestras se incubaron por 1 hora a 4 °C.

Por último, la proteína A-sefarosa se lavó por tres ocasiones utilizando tres amortiguadores diferentes net-gel, net-gel+10 % de SDS y 0.1 % Nonidet - 0.05 Tris M, pH 7.5. En cada lavado las muestras fueron centrifugadas, el sobrenadante descartado y el pellet resuspendido consecutivamente en un 1 ml de cada uno de los amortiguadores mencionados en el orden señalado. En el último lavado el líquido fue eliminado completamente y el sedimento resuspendido en 40 µl de Laemmli. Las muestras se corrieron en un gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS) y se analizaron por Western blot de acuerdo al procedimiento descrito (Torner, et al., 1995).

f. Western blot

Los geles de acrilamida se equilibraron durante 10 min. en amortiguador de transferencia (25 mM tris, 192 mM Glicina, 20 % Metanol) y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 40 V y 4 °C durante toda la noche. Las membranas se bloquearon con 2 % de BSA y 0.05% Tween-20 en PBS durante una hora y posteriormente se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-PRL policlonal generado localmente (C-1) y/o con el anticuerpo anti-PRL monoclonal (MIPO202, Genzyme). Los anticuerpos se aspiraron y los blot se lavaron tres veces con 0.9 % NaCl y 0.05 % Tween-20 en PBS durante 5 minutos y se incubaron por una hora con segundos anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina. Finalmente las membranas se lavaron y la presencia de la enzima se reveló utilizando un sustrato de fosfatasa alcalina de acuerdo a un estuche comercial (Kit Bio-Rad, Hercules, CA. USA).

g. Ensayo de angiogénesis

En el ensayo se utilizaron células aisladas de la vena umbilical bovina (BUVEC) de acuerdo al método descrito (Cajero et al., 2002). Las células fueron sembradas (5×10^3 células por pozo en placas de cultivo de 48 pozos utilizando medio de mantenimiento F-12K suplementado con 10 % de suero fetal bovino y antibióticos. A las 24 horas se les quitó el medio y se lavaron con PBS. Subsecuentemente se les agregó diferentes diluciones de las muestras problema con medio de bioensayo (F-12K, sin suero), hasta un volumen final de 200 μ l. Algunas células fueron tratadas con anticuerpos policlonales anti-PRL (C-1, 1:300). Las células se incubaron por 48 horas a 37 °C bajo una atmósfera de 95 % de aire y 5 % de CO₂. La proliferación celular se midió a través del procedimiento descrito anteriormente para las células Nb2 (Mosmann, 1983).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. PRL en suero y fluidos oculares de pacientes con retinopatía del prematuro.

Las concentraciones de PRL valoradas mediante ELISA en humor acuoso, líquido subretiniano y suero de niños con retinopatía del prematuro se muestran en la figura 10.

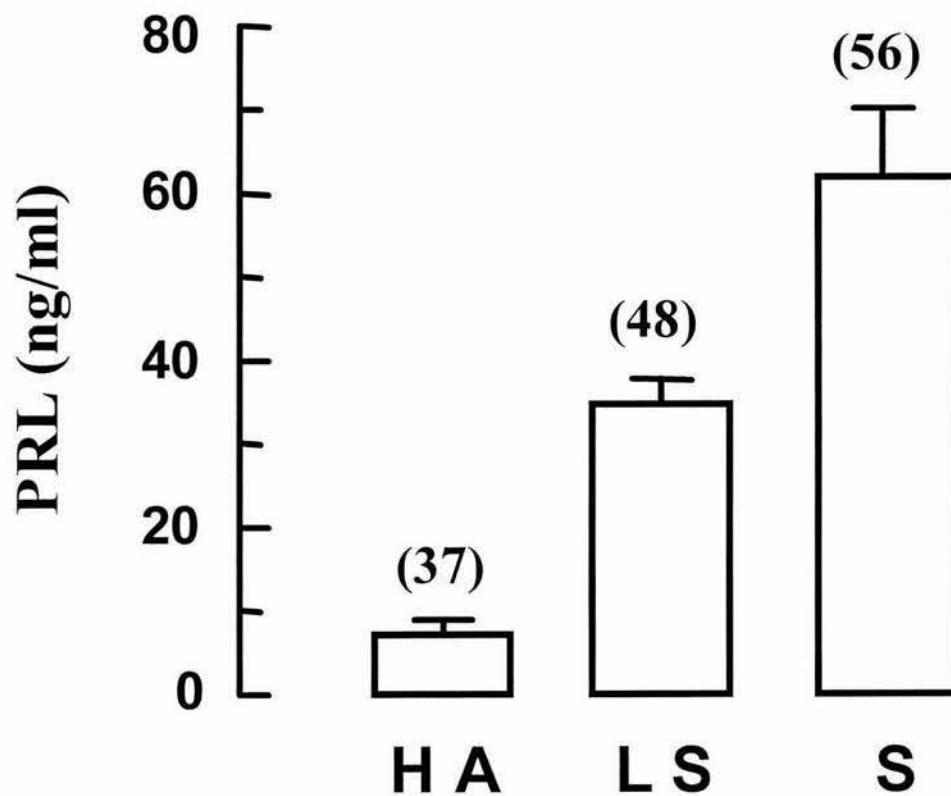


Figura 10. Detección de PRL mediante ELISA en el humor acuoso (HA), líquido subretiniano (LS) y suero (S) de pacientes con retinopatía del prematuro. En paréntesis se muestra el número de pacientes analizados.

En el humor acuoso el nivel de PRL fue cercano al límite de detección del ensayo (2 ng/ml) y fue claramente menor al detectado en el líquido subretiniano y en el suero. Estos niveles de PRL fueron validados mediante el bioensayo de las células Nb2, que tiene un límite de sensibilidad 100 veces mayor (20 pg/ml). La especificidad del ensayo biológico se valoró mediante el efecto de las muestras problema en presencia o ausencia de anticuerpos anti-PRL. Se observó que en todos los casos los anticuerpos anti-PRL, pero no los anticuerpos pre-inmunes bloquearon el efecto de las muestras problema (datos no mostrados). Los resultados del bioensayo coincidieron con las determinaciones del ELISA en un grupo de muestras analizadas simultáneamente por ambos métodos (Tabla 1). De esta forma, la correspondencia entre ambas determinaciones apoya la naturaleza de la proteína como PRL y muestra que esta PRL es biológicamente activa.

| | SUBRETINIANO (ng/ml) | ACUOSO (ng/ml) | SUERO (ng/ml) |
|------------------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| ELISA | 47.6 ± 12.5 n = 8 | 4.2 ± 1.6 n = 5 | 76.6 ± 2.7 n = 9 |
| BIOENSAYO | 32.1 ± 1.9 n = 8 | 3.3 ± 0.6 n = 5 | 74.1 ± 6.1 n = 9 |

Tabla 1. Concentración de PRL medida por dos métodos diferentes (ELISA y bioensayo) en los mismos fluidos oculares y suero de pacientes con retinopatía del prematuro.

Los altos niveles de PRL medidos en el suero son consistentes con la posibilidad de que la PRL sistémica pudiera ser fuente de la PRL ocular. Al respecto, se sabe que PRL marcada isotópicamente, inyectada en el corazón de la rata, es capaz de incorporarse a las células del cuerpo ciliar y a los fotorreceptores de la retina (O'Steen and Sundberg, 1982). Asimismo, por estudios previos sabemos que el receptor de PRL está presente en el órgano ciliar de la rata (Dueñas, 2001) y por lo tanto que es posible que la incorporación de la PRL a los fluidos oculares pudiera ocurrir vía un mecanismo activo de transporte. Sin embargo, parte de la PRL podría también sintetizarse localmente en el ojo de estos pacientes. Ensayos de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) han mostrado que el ARN mensajero de PRL se expresa en la cornea, iris y retina de la rata (Dueñas et al., 1999). En la cornea estudios de hibridación *in situ* localizaron la expresión del ARN mensajero de PRL en el epitelio externo (Montes de Oca, Rivera y Clapp, resultados no publicados). Asimismo, mediante hibridación *in situ* se detectó la presencia del ARN mensajero de PRL en el endotelio vascular de las membranas fibrosadas de pacientes con retinopatía del prematuro (Montes de Oca, Rivera y Clapp, resultados no publicados).

b. PRL en fluidos oculares y suero de pacientes con RP versus pacientes con trastornos no neovasculares.

Una pregunta importante en este trabajo fue: ¿guarda la PRL alguna relación con los trastornos vasoproliferativos de la retina?. Al respecto comparamos los niveles de PRL inmunorreactiva presente en el humor acuoso y en el suero de pacientes con retinopatía del prematuro *versus* pacientes con trastornos no neovasculares (cataratas). En un grupo grande de pacientes observamos que la concentración de PRL en el humor acuoso y suero de niños con retinopatía del prematuro fue significativamente mayor ($P < 0.05$) a los niveles de PRL medidos en el grupo control (Fig. 11)

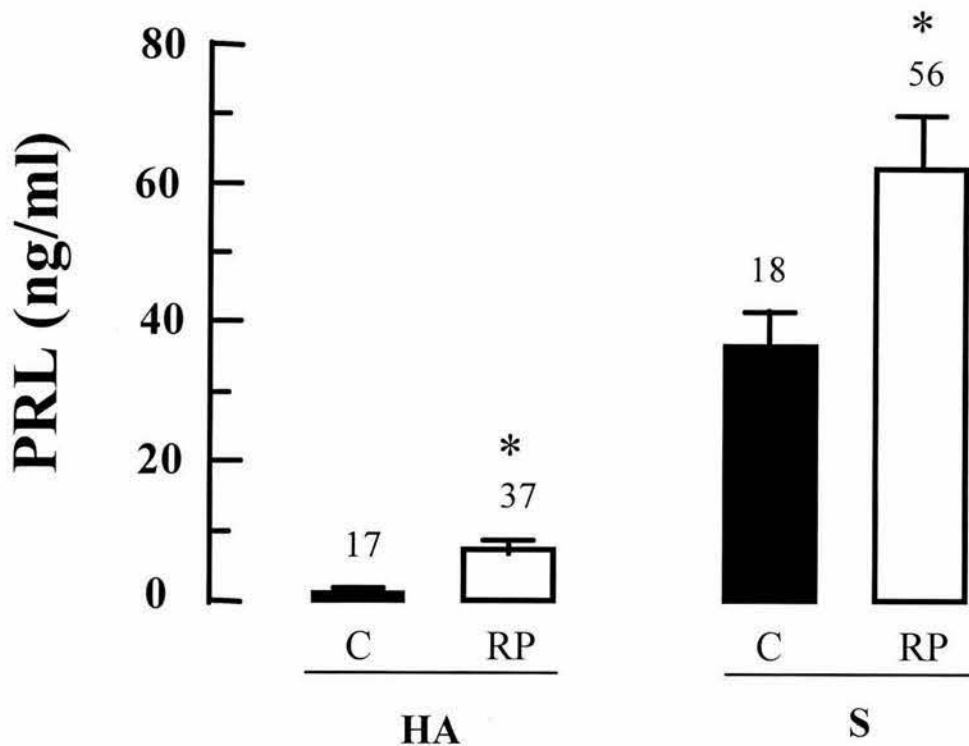


Figura 11. Niveles de PRL medidos por ELISA en humor acuoso (HA) y suero (S) de pacientes control (C) (barras negras) *versus* pacientes con retinopatía del prematuro (RP) (barras blancas). En la parte superior de las barras se indica el número de pacientes analizados. * ($P < 0.05$) vs control.

Cabe señalar que los niveles de PRL circulante determinados en este estudio tanto para los niños con retinopatía del prematuro como para los niños con cataratas fueron mayores (4 a 7 veces) a los niveles reportados en niños sanos concientes (9 ng/ml) en edades cercanas (1 a 12 años) (Gäsler et al., 2000 y Hardan et al., 1999). Sin embargo, fueron similares a los niveles circulantes (40-78 ng/ml) medidos en niños y jóvenes con edades entre 2 y 20 años intervenidos quirúrgicamente bajo anestesia general (Khilnani et al., 1993). Por lo tanto es posible, que los altos niveles de PRL circulante determinada en este estudio

pueda deberse a las condiciones generales de la anestesia y cirugía. Al respecto se sabe que anestésicos generales derivados del éter se acompañan de una liberación de PRL circulante (Pontiroli et al., 1984).

Lo más relevante de estas determinaciones es que la concentración de PRL tanto en el suero como en el humor acuoso de pacientes con retinopatía del prematuro fue mayor que en los pacientes control sin retinopatía. Se desconoce si esta diferencia en las concentraciones de PRL está relacionada con la participación de esta hormona en la patofisiología de la retinopatía del prematuro. Es interesante observar que hallazgos similares se han reportado en pacientes diabéticos, en los cuales un alto grado de retinopatía vasoproliferativa se asoció con un aumento en los niveles circulantes de PRL (Pontiroli et al., 1988). Sin embargo, hay datos controversiales al respecto, ya que también se ha reportado que pacientes diabéticos con retinopatía severa presentan niveles normales de PRL con respecto a pacientes diabéticos con retinopatía leve (Hunter et al., 1974).

De acuerdo a nuestros resultados podríamos especular que el aumento en los niveles de PRL asociados a este padecimiento, represente un aumento tanto de PRL como de PRL 16K. La PRL 16K al ser un factor antiangiogénico podría contribuir a favorecer una mayor regresión de los neovasos en el ojo de estos pacientes y por lo tanto, representar un mecanismo compensatorio para frenar la neovascularización ocular. Alternativamente, el aumento en PRL asociado al padecimiento neovascular podría representar una reducción en su procesamiento hacia la PRL de 16K. Como la PRL 16K es menos inmunorreactiva que la PRL (Clapp et al., 1988), la disminución en su producción resultaría en más PRL completa y por lo tanto en un aumento en la inmunorreactividad medida por el ELISA.

Para analizar la posible participación de la PRL 16K en el control de dicho padecimiento, investigamos si este fragmento de la PRL está presente en fluidos oculares y suero de pacientes con retinopatía del prematuro.

c. Presencia de PRL 23 y 16K en suero y liquido subretiniano de pacientes con retinopatía del prematuro

Muestras de líquido subretiniano y suero de pacientes con retinopatía del prematuro, fueron sometidas a inmunoprecipitación-Western blot, utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales anti-PRL (Figuras 12 y 13).

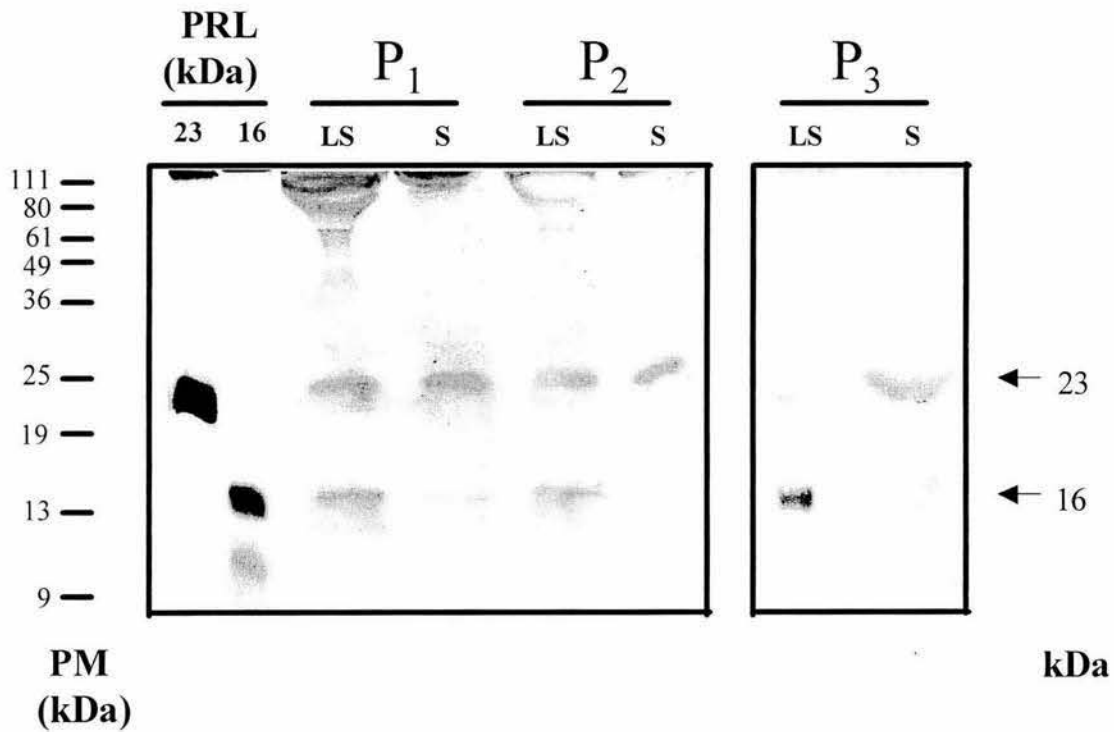


Figura 12. Western blot revelado con un anticuerpo policlonal anti-PRL que indica la presencia de proteínas inmunoreactivas de 23 y 16 kDa (flechas) en el liquido subretiniano (LS) y suero (S) de tres pacientes (P1, P2 y P3) con retinopatía del prematuro. Las preparaciones estándar de PRL 23 y 16K se muestran como referencia para la migración de las proteínas problema. El peso molecular de proteínas marcadas (PM) se ilustra al margen.

Los Western blots con anticuerpos policlonales anti-PRL mostraron la presencia de proteínas inmunorreactivas de 23 y 16 kDa tanto en el suero como en el líquido subretiniano. En apoyo a la especificidad de la inmunorreacción se observaron resultados similares cuando los blots se revelaron con un anticuerpo monoclonal anti-PRL (Fig. 9). Si bien, esta técnica no es cuantitativa se pudo apreciar por densitometría que la proteína tipo PRL de 16 kDa presente en el líquido subretiniano se encuentra en una proporción de 2:1 con respecto a la proteína de 16 kDa presente en el suero del mismo paciente. Estos resultados sugieren que tanto la PRL como la PRL 16K están presentes en el ojo de pacientes con retinopatía del prematuro.

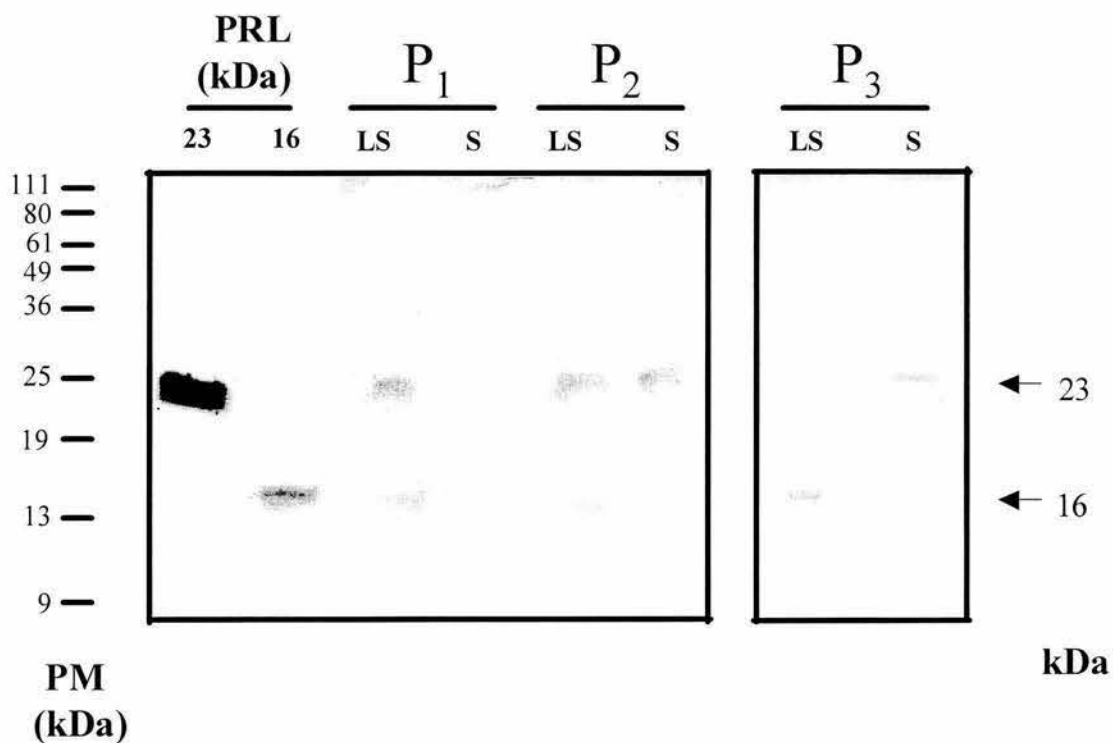


Figura 13. Inmunoprecipitación-Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PRL que indica la presencia de proteínas inmunoreactivas de 23 y 16 kDa en el líquido subretiniano (LS) y suero (S) de los tres pacientes con retinopatía del prematuro mostrados en la Figura 7. El peso molecular de las proteínas marcadas (PM) se ilustra al margen.

El aumento de la PRL 16K intraocular *versus* la sistémica sugiere la activa participación de proteasas capaces de generar a la PRL 16K en los compartimientos oculares de pacientes con retinopatía del prematuro. Al respecto, se ha reportado que el humor vítreo contiene catepsina D (Wolanska, et al 1995) que es la enzima propuesta como responsable de la proteólisis de la PRL hacia la PRL 16K (Baldocchi et al., 1993). Además en la rata la incubación de PRL con proteínas del humor vítreo resulta en su proteólisis hacia PRL 16K (Macotela, Rivera y Clapp, resultados no publicados).

d. Actividad antiangiogénica de PRL 16K presente en líquido subretiniano.

Para investigar la posible naturaleza de la proteína inmunorreactiva de 16 kDa, analizamos si las PRLs presentes en el líquido subretiniano de los pacientes con retinopatía del prematuro tienen acciones sobre la angiogénesis. Células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC) fueron tratadas con diferentes concentraciones de líquido subretiniano en presencia y ausencia de anticuerpos anti-PRL (Fig 14).

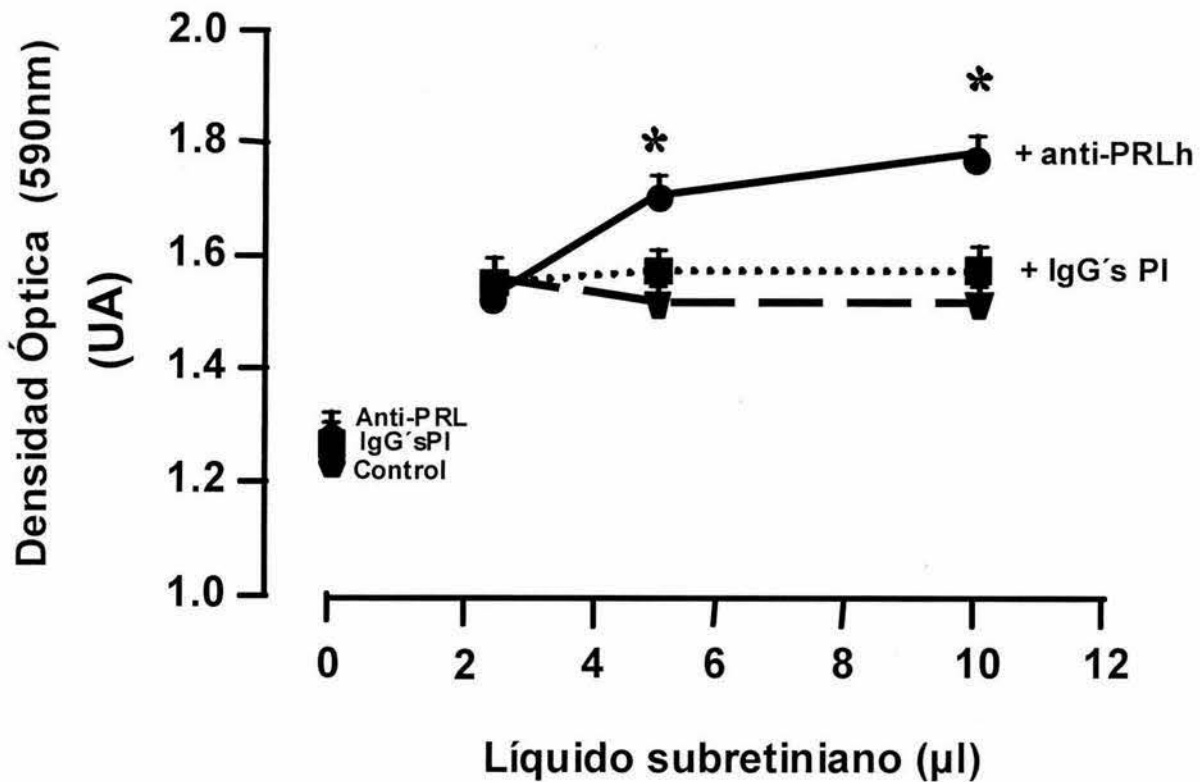


Figura 14. Efecto de concentraciones crecientes del líquido subretiniano de pacientes con retinopatía del prematuro en presencia y ausencia de anticuerpos policlonales anti-PRL sobre la proliferación de células endoteliales (BUVEC) en cultivo. Cada punto representa el promedio \pm el error estándar de triplicados. * $P < 0.05$ *versus* anticuerpos pre-inmunes (IgGs PI). Las unidades arbitrarias (UA) representan la absorbancia del producto colorido generado por la reducción de las sales de MTT y su valor es directamente proporcional al índice de proliferación.

El líquido subretiniano por si solo estimuló la proliferación de las células endoteliales. Sin embargo, en presencia de anticuerpos anti-PRL se observó una estimulación mayor de dicha proliferación con respecto al grupo control sin anticuerpos o con anticuerpos pre-inmunes.

Es posible que el efecto estimulador de los anticuerpos anti-PRL pudiese deberse a que los anticuerpos secuestran prolactinas anti-angiogénicas presentes en el líquido subretiniano, presumiblemente a la PRL 16K. De esta manera estos hallazgos apoyan la presencia de PRL 16K en el líquido subretiniano de estos pacientes.

En este estudio no se comparó la concentración de PRL 16K en fluidos oculares de pacientes con retinopatía del prematuro *versus* pacientes control, sin embargo, sí encontramos que hay un aumento en la PRL inmunorreactiva total en relación al padecimiento (Fig 7). Como ya se mencionó, el aumento en PRL inmunorreactiva podría reflejar una menor proteólisis hacia la PRL 16K que es menos inmunorreactiva (Clapp et al., 1988). Alternativamente, el aumento en PRL podría representar un aumento de las isoformas de 23 y 16 kDa. Si esto es así, la mayor generación de PRL 16K antiangiogénica en los pacientes con RP podría representar un mecanismo homeostático capaz de promover la regresión de la neovascularización en estos pacientes. De hecho las muestras se obtienen en una fase tardía cuando la angiogénesis ya paró y los neovasos se encuentran en regresión. De ser así las muestras de los pacientes con RP no permiten investigar la participación de PRL sobre la patogénesis de este padecimiento.

Existe un modelo experimental de retinopatía del prematuro donde puede ponerse a prueba la participación de factores angiogénicos y antiangiogénicos en la patogénesis y el desarrollo de las retinopatías vasoproliferativas. En este modelo crías de ratas se exponen a hiperoxia durante 5 días (del día 7 al día 12 después del nacimiento) y posteriormente a normoxia. Los cambios en la presión de oxígeno resultan en la formación de vasos sanguíneos en la retina, la cual es

máxima hacia el día 16 (4 días después de la hiperoxia). En este modelo se observó que un inhibidor de la neovascularización ocular, el factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF), mantiene concentraciones altas durante la hiperoxia mientras que el VEGF principal inductor de la angiogénesis ocular disminuye (Gao et al., 2001). Sin embargo, una vez que las ratas se colocan en normoxia (día 13), los niveles en la retina de estos dos factores se invierten y esta nueva relación se asocia con la progresión de la neovascularización retinal, que cuando es máxima (día 16) el PEDF ocular está en sus niveles más bajos. Finalmente, hacia el día 18 los niveles de PEDF se van recobrando progresivamente y hacia el día 22-26 cuando la neovascularización retinal es esencialmente inexistente, el PEDF vuelve a sus niveles normales (Gao et al., 2001).

La posibilidad de que PRLs anti-angiogénicas participen en el control de la angiogénesis ocular puede tener relevancia en la fisiopatología de las retinopatías vasoproliferativas. Es bien sabido que la homeostasis de la angiogénesis está regulada por un balance entre dos sistemas opuestos representados por factores estimuladores e inhibidores de la neovascularización. Bajo condiciones patológicas como es el caso de la retinopatía diabética y la retinopatía del prematuro, este equilibrio se inclina a favor de los factores estimulatorios. La hipótesis más aceptada en estas enfermedades oculares es que la retina en respuesta a hipoxia, incrementa la producción de los factores estimuladores y reduce la producción de los inhibidores de la angiogénesis (Miller et al., 1997 y Gao et al., 2001). Bajo estos antecedentes nuestros resultados sugieren que la PRL 16K está presente en el líquido subretiniano de pacientes con retinopatía del prematuro y que podría estar participando en la regresión de los nuevos capilares determinantes de la enfermedad. Sin embargo, faltaría determinar si los niveles de PRL 16K están disminuidos durante la fase más severa de la retinopatía vasoproliferativa, probablemente debido a una reducción en la actividad de las proteasas responsables de su producción. Para analizar esta hipótesis y como continuación de este proyecto se piensa establecer un modelo de retinopatía del prematuro en ratones sometidos a hiperoxia que nos permita saber si los niveles

de PRL 16K y la actividad de la proteasa varían y participan en la progresión de esta patología. Mas importantemente nos interesa explorar si el tratamiento con PRL 16K intraocular puede controlar la progresión neovascular.

Por último cabe resaltar que la identificación de inhibidores angiogénicos endógenos (como podría ser el caso de la PRL 16K), que se alteran en condiciones patológicas de neovascularización retinal pueden ayudarnos a dilucidar posibles agentes terapéuticos capaces de controlar estos padecimientos.

En resumen, los hallazgos de esta tesis apoyan las siguientes **Conclusiones**:

1. En la retinopatía del prematuro tiene lugar un aumento en la PRL ocular y en la PRL circulante.
2. La PRL 16K está presente en el líquido subretiniano de pacientes con retinopatía del prematuro y su concentración es mayor a la de la circulación.

Estas conclusiones son consistentes con la **hipótesis** de que isoformas moleculares de la PRL participan en la fisiopatología de la retinopatía del prematuro.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Adamis A.P., Aiello L.P. & D'Amato R.A. (1999). Angiogenesis and ophthalmic disease. *Angiogenesis*. 3:9-14.
2. Adamis A.P., Shima D.T., Yeo K.T., et al. (1993). Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 193:631-638.
3. Aiello L.P., Ferrara N., King G.L. (1994). Hypoxic regulation and bioactivity of vascular endothelial growth factor: characterization in retinal microvascular pericytes and pigment epithelial cell. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 35:1868.
4. Ali S., Pellegrini I., Kelly P.A. (1991). A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *J.Biol. Chem*. 266:20110-20117.
5. Anthony P.K., Stoltz R.A., Pucci M.L. Powers CA. (1993). The 22K variant of rat prolactin: evidence for identity to prolactin (1-173), storage in secretory granules, and regulated release. *Endocrinology*. 132:806-814.
6. Aramburo C., Montiel J.L., Proudman J.A., Berghman L.R. Scanes CG. (1992). Phosphorylation of prolactin and growth hormone. *J. Mol. Endocrinol*. 8:183-191.
7. Baldocchi R.A., Tan L., King D.S. and Nicholl C.S. (1993). Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology*. 133:935-938.
8. Battegay B.J. (1995). Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospect. *J.Mol Med*. 73: 333-346.
9. Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen D.L., and Steinmetz R.W. (1996). Extrahypothalamic Prolactin: Distribution, Regulation, Function, and Clinical Aspect. *Endocrine Reviews*. 17(3): 639-669.
10. Birchhoff. J. (1995). Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trend. In cell Biol*. 5:69-74.
11. Boeri D., Maiello M and Lorenzi M. (2001). Increased Prevalence of Microthromboses in Retinal Capillaries of Diabetic Individuals. *Diabetes*. 50:1432-1439.

12. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly P.A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.* Jun;19(3):225-68. Review.
13. Brooks C.L., Kim B.G., Aphale P., Kleeman B.E., Johnson G.C. (1990). Phosphorylated variant of bovine prolactin. *Mol Cell. Endocrinol.* 71:117-123.
14. Cajero M., Avila B., Ochoa A., Garrido E., Varela A., Martinez de la Escalera G. and Clapp C. (2002). Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur. J. Cell. Biol.* 81:1-8.
15. Campochiaro P.A. (2000). Retinal and choroidal neovascularization *J Cell Physiol.* 184 (3): 301-10.
16. Clapp C. (1987). Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology.* 121:2055-2064.
17. Clapp C. and Weiner R.I. (1992). A specific, high affinity saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology.* 130:1380-1386.
18. Clapp C. Martial J.A., Guzman R.C., Rentier-Delrue F., Weiner R.I. (1993). The 16-Kilodalton N-Terminal Fragment of Human Prolactin is a Potent inhibitor of Angiogenesis. *133 (3): 1292-1299.*
19. Compton M.M. and Witorsch R.J. (1984). Proteolytic degradation and modification of rat prolactin by subcellular fraction of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology.* 115:476-484.
20. Cooke N.E., Coit D., Shine J., Baxter J.D. and Martial J.A. (1981). Human prolactin cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J. Biol. Chem.* 255: 4007-4016.
21. Corbacho A.M., Martínez de la Escalera G. y Clapp C. (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin /growth hormone / placental lactogen family in angiogenesis. *Journal of endocrinology* 173:219-238.
22. Corcoran D.H. and Proudman J.A. (1991). Isoforms of turkey prolactin: Evidence for differences in glycosylation and in tryptic peptide mapping. *Comp. Biochem. Physiol.* 99:563-570.
23. Dawson D., Volpert O., Gillis P., Crawford H., Ju H. Benedic W. and Bouck P. (1999). Pigment Epithelium-Derived Factor: A potent Inhibitor of angiogenesis. *285:245-247.*

24. De Vito W.J. (1988). Heterogeneity of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150:599-604.
25. De Vlaming V.L. (1979). Actions of prolactin among the vertebrates. In: Barrington EJW (ed) *Hormones and Evolution*, Academic Press, New York, pp 561-642.
26. Dueñas Z. (2001). Prolactina en tejidos y fluidos oculares. Tesis Doctoral. Centro de Neurobiología Campus UNAM-UAQ, Juriquilla, Qro.
27. Dueñas Z., Torner L., Corbacho A., Ochoa A., Ospina G., López B., Barrios F., Berger P., Martínez de la escalera G. and Clapp C. (1999). Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16 kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40:2498.
28. Emanuele N.V., Jurgens J.K., Halloran M.M., Tentler J.J., Lawerense A.M., Kelley M.R., (1992). The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Mol. Endocrinol* 6:35-42.
29. Ferrara N., Houck K., Jakeman L., Leung G.W. (1992). Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of protein. *Endocrin. Rev.* 13:18-32.
30. Folkman J. (1997). En: *Regulation of angiogenesis*. Goldberg ID, Rosen ME (eds). Basel, Suiza. pp. 1-8.
31. Folkman J. and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science.* 235:442-447.
32. Frawley S.L. (1989) Mammosomatotropes: current status and posible functions. *Trends Endocrinol. Metab.* 1:31-31.
33. Freeman M.E, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* Oct;80(4):1523-63)
34. Gao G., Li Y., Zhang D., Gee S. Crosson C., Ma J. (2001). Umbalanced Expresion of VEGF and PEDF in Ischemia-Induced Retinal Neovascularization. *FEBS Letters.* 489:270-276.
35. Gässler N., Peuschel T., Pankau R. (2000). Pediatric reference values of estradiol, testosterone, lutropin, follitropin and prolactin. *Clin Lab.* 46 (11-12):553-60
36. Gopal L., Sharma T., Shanmugam M., Badrinath SS., Sharma A., Agraharam SG. (2000). Surgery for stage 5 retinopathy of prematurity: the learning curve and evolving technique. *Indian J. Ophthalmol.* 48(2): 101-6

37. Hardan A., Birmaher B., Williamson D.E., Dahl R.E., Ambrosini P., Rabinovich H. and Ryan ND. (1999). Prolactin Secretion in Depressed Children. *Biol. Psychiatry*. 46:506-511.
38. Hart W.M. (1992). *Adler's physiology of the eye*. Mosby Year Book. Ninth edition. St. Louis Missouri. USA. 1-16 pp
39. Hoffman T., Penel C., Ronin C. (1993). Glycosilation of human prolactin regulates of hormone bioactivity and metabolic clearance. *J. Endocrinol. Invest.* 16:807-816.
40. Hunter P.R., Anderson J., Lunn T.A., Horrobin D.F., Boyns A.R. and Cole E.N. (1974). Diabetic Retinopathy and Prolactin. *Lancet*. 1:1237.
41. Kacsoh B., Toth B.E., Avery L.M., Yamamuro Y., Grosvenor C.E. (1991). Molecular heterogeneity of prolactin in lactating rats and their pups: biological and immunological activities in pituitary gland, serum and milk. *Endocr. Regul.* 25:98-110.
42. Kelly P.A, Djiane J, Postel-Vinay M.C, Ederly M. (1991). The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine Rev.* 12: 235-251.
43. Kent D., Pennie F., Laws D., White S., Clark D. (2000). The influence of retinopathy of prematurity on ocular growth. *Eye*. 14 (Pt 1):23-9.
44. Khilnani P., Muñoz R., Salem M., Gelb C., Todres ID. and Chernow B. (1993). Hormonal Responses to Surgical Stress in Children. *J. Pediatr Surg.* 28:1-4.
45. Lee H, Struman I, Clapp C, Martial J, Weiner RI. (1998). Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology*. 139: 3696-3703.
46. Lewis U.J., Singh N.P, Sinha Y.N., Vanderlaan W.P. (1985). Glycosilated human prolactin. *Endocrinology* 116:359-363.
47. Lonchampt M., Pennel L., Duhault J. (2001). Hyperoxia/Normoxia-Driven Retinal Angiogenesis in Mice: A Role for Angiotensin II. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Feb;42(2):429-432.
48. Miller, W.J., Adamis A.P. and Aiello L.P. (1997). *Diabetes Metab. Rev.* 13, 37-50.
49. Mitra I. (1980). A novel cloned prolactin in the rat pituitary. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95:1750-1759.

50. Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. 65:55-63.
51. Nicoll C.S. (1980). Prolactin: ontogeny and evolution of prolactin's functions. *Federation Proc.* 39:2563-2566.
52. O'Steen W.K. and Sundberg D.K. (1982). Patterns of Radioactivity in the eyes of rats after Injections of Iodinated Prolactin. *Ophthalmic. Res.* 14:54-62.
53. Ochoa A., Montes de Oca P., Rivera J.C., Dueñas Z., Nava G., Martínez de la Escalera G and Clapp C. (2001). Rat retinal capillary endothelial cells produced and secrete Prolactin. *Invest Ophthalmol & Vis Sci.* 42(7) : 1639-1645.
54. Oetting W.S., Tuazon PT., Traugh J.A., Walker A.M. (1986). Phosphorylation of prolactin. *J. Biol. Chem.* 261:1649-1652.
55. Parlow A.F. and Shome B. (1976). Rat Prolactin: The entire linear aminoacid sequence. *Fed. Pro.* 35:219.
56. Patz A. (1980). Studies on retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 19:1133-1138.
57. Polverini P.J. (1995). The pathophysiology of angiogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 6: 230-247.
58. Pontiroli A., Stella L., Crecent A., and Giraral A.M. Surgical Stress In Humans and Pituitary Adrenal Secretion. In: Delitala G., Motta M. And Seno M. (Eds). *Opioid modulation of Endocrine Function*. Raven Press. New York. 1984. p 147.
59. Pontiroli AE., Balo G., Maffi P., Menchini U., Brancato R., and Pozza G. (1988). Retinal Laser Photocoagulation in diabetic patients causes prolactin, growth hormone and cortisol release. *J. Endocrinol Invest.* 11:389-391.
60. Quiroz H., Dueñas Z., Barrera L.F., Nava G. Ochoa A., Noris G., Martínez de la Escalera G., Clapp C. (2000). Detection of prolactin and mRNA in the eye of patients whit retinopathy of prematurity. The 2000 ARVO Annual Meeting, Lauderdale Florida, USA.
61. Rivera J.C. (2001) Establecimiento de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la cuantificación de PRL en tejidos y fluidos oculares de la rata. Tesis de Licenciatura. Centro de Neurobiología Campus UNAM-UAQ.

62. Shoupe D., Montz F.J., Kletzky O.A., diZerega G.S. (1983). Prolactin heterogeneity. Response to thyrotropin-releasing hormone stimulation of concanavalin A-bound and unbound immunoassayable prolactin during human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 147:482-487.
63. Sinha Y.N. (1992). Prolactin Variants. *Trends endocrinol. Metab.* 3:100-106.
64. Sinha YN. (1995). Estructural variants of prolactin: Occurrence and physiological significance. *Endocrine Rev.* 16: 354-369.
65. Stellmach V. Crawford S. Zhou W. and Bouck N. (2000). Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *PNAS.* 1:1-5.
66. Tanaka T., Shiu RPC., Gout PW., Beer., CT., Noble RL., Friesen JHC. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *Clin Endocrin Met.* 1980;51:1058-1063.
67. Torner M.L., Mejia S., Lopez G.F., Quintanar A., Martinez G and Clapp C. (1995). A 14-Kilodalton Prolactin Like Fragment is Secreted By the Hypothalamo-Neurohypophyseal System of the rat. *Endocrinology.* 136:5454-5460.
68. Wang Y.F. and Walker A.M. (1993). Dephosphorylation of standard prolactin produces a more biologically active molecule: evidence for antagonism between nonphosphorylated prolactin in the stimulation of Nb2 cell proliferation. *Endocrinology.* 133:2156-2160.
69. Weber AJ. and De Bandt M.. (2000). Angiogenesis: general mechanisms and implications for rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine.* 67(5):366-83.)
70. Wolanska M, Galewska Z. Bankowski E. (1995). Proteolytic activity of the vitreous body. *Klin Oczna.* 97:173-175.
71. Yu-Lee LY. (1997). Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 215:35-52.