



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS UNAM JURIQUILLA, QRO.

“Análisis del efecto de la prolactina-16K sobre la
producción de óxido nítrico endotelial”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (Neurobiología)

PRESENTA
Q.F.B. Celina García Meléndrez

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ

COTUTOR DE TESIS:
DR. MICHAEL JEZIORSKI

Juriquilla, Querétaro.

2005



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.

AGRADECIMIENTOS

Fuera del Instituto de Neurobiología

A mis padres Raquel y Policarpo que siempre han apoyado mis decisiones y han permanecido unidos.

A mis hermanos J. Guadalupe, Elvira, Ernesto, Irma y Rubén por su cariño y apoyo que me han brindado siempre.

A la Universidad Autónoma de Zacatecas, en especial a la Unidad Académica de Ciencias Químicas.

A todas las personas que motivaron y apoyaron mi idea de ingresar a esta maestría, y a las que me brindaron su amistad y apoyo a lo largo de la misma.

Al apoyo brindado por CONACyT bajo el número de becario 176233 y de la DGEP-UNAM durante el curso de la maestría.

Dentro del Instituto de Neurobiología

A la comisión de admisión que permitió mi acceso a la maestría.

A mis tutores, la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez y el Dr. Michael Jeziorski por aceptarme en su laboratorio, por su paciencia y asesoría en todo momento.

De forma muy especial a la Dra. Ma. del Carmen González Castillo por su apoyo conceptual y técnico en toda la parte experimental de esta tesis.

Al Nut. Fernando López y M. en C. Gabriel Nava por su apoyo técnico a lo largo del desarrollo de la tesis. Además agradezco su amistad y cariño en todo momento dentro y fuera del laboratorio.

A Antonio Prado y Daniel Mondragón por su experta asistencia técnica en todo momento, además de su valiosa amistad.

A mis amigos del laboratorio: Carlos, Jessica, Yazmín, Mónica, Cecilia, Jorge, Miriam, Gabriela, Pavel y Jessica J, que siempre ayudaron a resolver mis dudas.

A los integrantes del comité tutorial, la Dra. Carmen Aceves, y el Dr. Manuel Aguilar; y a los miembros del jurado: Dr. Alfredo Varela, Dr. Rafael Rubio, Dra. Maricela Luna y Dr. Manuel Aguilar.

A la Q. Leonor Casanova, por su paciencia para explicarme paso a paso cada trámite en el posgrado, de igual manera a Yolanda Orduña, Ma. del Carmen Vázquez y Magdalena Reyes, y por supuesto al Dr. Raúl Paredes.

Además agradezco el apoyo de los miembros de la Biblioteca: Rafael Silva, Bib. Pilar Galarza, Elsa Olivia Ruíz, Ignacio Caballero y Crisanta Resendiz.

De igual manera, agradezco el apoyo de otros servicios y unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología representadas por: el MZV. Martín García, la Lic. Lourdes Lara, el ISC. Omar González y el M. en CC. Alberto Lara, la Dra. Anaid Antaramián, y el Biol. Exp. Andrés Falcón.

A mis compañeros de maestría: Karina, Flor y Argel, por compartir conmigo todos esos momentos.

A mis amigas y compañeras de casa con quien he compartido experiencias maravillosas: Irma, Angélica, Miriam y Flor.

ÍNDICE	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
1. Angiogénesis	5
2. Prolactina, su receptor y vías de señalización	7
3. Proteólisis enzimática de la PRL a PRL-16K	10
4. La PRL-16K como un inhibidor de la angiogénesis	11
5. Óxido nítrico y sintetasas de óxido nítrico	13
6. Angiogénesis e inflamación	16
PROBLEMA	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	30
REFERENCIAS	39

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es un gas altamente reactivo que media los efectos de sustancias vasoactivas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la acetilcolina (ACh) y la bradicinina (BK) sobre la permeabilidad vascular, la vasorelajación y la angiogénesis. Estas sustancias actúan a través de activar a la sintetasa constitutiva de óxido nítrico presente en el endotelio vascular (eNOS). El fragmento N-terminal de 16 kDa de la prolactina (PRL-16K) inhibe el efecto vasoproliferativo del VEGF y la relajación endotelio-dependiente de segmentos aislados de la aorta del conejo inducida por ACh. En este trabajo investigamos si la PRL-16K inhibe la actividad de eNOS en células endoteliales de diversos lechos vasculares. El NO se determinó después de una hora de tratamiento mediante el método de la citrulina radioactiva. La PRL-16K, pero no la prolactina (PRL), inhibió la producción de NO inducida por VEGF, ACh y BK en cultivos de células endoteliales de la vena umbilical bovina, de la aorta bovina y de capilares de la retina de la rata. El efecto fue dosis-dependiente y máximo a una concentración de 10 nM. Concluimos que el efecto inhibitorio de la producción de NO endotelial podría ser el responsable de mediar las acciones antiangiogénicas y vasomotoras de la PRL-16K.

SUMMARY

Nitric oxide (NO) is a highly reactive gas that mediates the effects of vasoactive substances, including vascular endothelial growth factor (VEGF), acetylcholine (ACh), and bradykinin (BK), on vascular permeability, vasorelaxation, and angiogenesis. These substances act through activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in the vascular endothelium. The 16 KDa N-terminal fragment of prolactin (16K-PRL) inhibits the mitogenic actions of VEGF and the endothelial-dependent relaxation of isolated rabbit aortic segments induced by ACh. In this work we investigated whether 16K-PRL inhibits the activity of eNOS in endothelial cells of different vascular beds. NO was measured by the citrulline assay after treatments of one hour. 16K-PRL inhibited NO production induced by VEGF, ACh, and BK in endothelial cell cultures from bovine umbilical vein, bovine aorta and rat retina capillaries, but prolactin had no effect. The effect of 16K-PRL was dose-dependent and maximum inhibition was seen at 10 nM. Our results suggest that inhibition of NO production mediates the antiangiogenic and vasomotor actions of 16K-PRL.

INTRODUCCIÓN

La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos que ya existen se denomina angiogénesis. Este proceso 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 la que tiene lugar en el aparato reproductor femenino y en la reparación de los tejidos a causa de lesiones y fracturas. No obstante, el interés que ha despertado el estudio de la angiogénesis se debe fundamentalmente a que este proceso desempeña un papel importante en un amplio espectro de padecimientos angiogénesis-dependientes, entre los que sobresalen el cáncer, la artritis reumatoide y la retinopatía diabética (Folkman, 1995).

La prolactina (PRL) originalmente identificada como una hormona lactotrópica secretada por la glándula hipófisis, ha mostrado estar involucrada en una diversidad de funciones que se incluyen dentro de la reproducción, la osmorregulación, y la inmunomodulación (Ben-Jonathan et al., 1996; Bole-Feysot et al., 1998). Esta diversidad funcional parece ser influida por la heterogeneidad estructural de la PRL. Se han descrito varias formas moleculares de PRL que resultan de modificaciones postraduccionales, como glicosilación, desaminación, fosforilación, agregación y proteólisis (Sinha, 1995).

Entre las formas proteolíticamente modificadas y a diferencia de la PRL completa, el fragmento N-terminal de 16 kDa (PRL-16K) ha mostrado tener actividad antiangiogénica (Clapp et al., 1993; Dueñas et al., 1999; Ferrara et al., 1991; Struman et al., 1999). La PRL-16K inhibe la proliferación de células endoteliales en cultivo e interfiere con el efecto mitogénico de dos importantes factores angiogénicos, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF). Además, la PRL-16K inhibe la

degradación de proteínas de matriz extracelular necesaria para la migración de las células endoteliales (Lee et al., 1998) y estimula su apoptosis (Martini et al., 2000).

Algunas de estas acciones de la PRL-16K podrían ser mediadas por la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO) endotelial. El NO es un gas de vida media corta, altamente reactivo que pertenece a los radicales libres. A la fecha se han reportado diversas acciones del NO sobre los vasos sanguíneos, entre las que se encuentran la vasodilatación, la disminución de la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio vascular y la angiogénesis (Walford & Loscalzo 2003; Ziche & Morbidelli 2000). El VEGF y otros importantes factores vasorelajadores como la acetilcolina (ACh) y la bradicinina (BK), ejercen su efecto a través de activar a la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), una enzima constitutiva dependiente de calcio, cuya actividad puede ser regulada por fosforilación en residuos de serina y treonina (Boo & Jo 2003; Figueroa et al., 2002; Kamei et al., 2000; Schwartz et al., 1999).

En estudios recientes se observó que la PRL-16K inhibe el efecto vasorelajador de la ACh sobre segmentos aislados de aorta. Esta observación, sugirió que la PRL-16K puede inhibir la producción del NO endotelial. En apoyo a esta posibilidad se encontró que la PRL-16K reduce la producción de NO inducida por VEGF en células endoteliales de la vena umbilical bovina en cultivo (González et al., 2004). En base a este hallazgo, en este estudio investigamos si el efecto inhibitorio de la PRL-16K se extiende a endotelios de diferentes lechos vasculares, y también si ocurre en respuesta a otros factores vasoactivos estimuladores de eNOS como la ACh y la BK.

ANTECEDENTES

1. Angiogénesis

La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos que ya existen se denomina angiogénesis (Folkman & Cotran 1976; Folkman & Klagsbrum 1987). En etapas tempranas del desarrollo, la formación de vasos sanguíneos ocurre mediante el proceso de vasculogénesis a partir de células precursoras que se diferencian y proliferan dentro de un tejido avascular (Yancopoulos et al., 2000). En esta etapa se forman islotes sanguíneos a partir de angioblastos extra-embriónicos que se condensan en grupos y cordones (Polverini, 1995) y se asocian en una red tubular primitiva (Yancopoulos et al., 2000). Posteriormente, mediante el proceso de angiogénesis, este sistema primitivo experimenta un remodelado, maduración y brote de nuevos vasos para dar lugar a un patrón de ramas interconectadas que se asocian a células de soporte (músculo liso y pericitos) y a una matriz extracelular (Yancopoulos et al., 2000).

En el adulto, las células endoteliales proliferan muy poco y su tasa de recambio está en el orden de varios meses o años (Denekamp, 1984; Tannock & Hayashi 1972). No obstante, varios procesos biológicos en el adulto dependen directamente de la angiogénesis, tales como la regeneración de tejidos a causa de lesiones y fracturas, la formación del cuerpo lúteo, el desarrollo de la placenta, la proliferación cíclica del endometrio, etc. (Polverini, 1995). Es así que en respuesta a una serie de señales, las células endoteliales que revisten las vénulas terminales o post-capilares degradan sistemáticamente su membrana basal y la matriz extracelular proximal para migrar, dividirse y organizarse en nuevos vasos capilares (Polverini, 1995). En las etapas iniciales del proceso angiogénico, el endotelio experimenta cambios en la expresión de sus moléculas de adhesión (integrinas, selectinas, entre otras), de los componentes de la matriz extracelular, y reorganiza el citoesqueleto (Gamble et al., 1999; Ingber, 1991; Ingber & Folkman

1988; Ingber & Folkman 1989; Madri et al., 1988). Además, las células endoteliales producen factores de crecimiento y proteasas, cuya acción sobre la matriz extracelular no sólo favorece la migración de las células endoteliales sino también la liberación de factores de crecimiento retenidos en ellas (Pepper et al., 1992; Polverini, 1995). En su conjunto los factores de crecimiento promueven la proliferación y diferenciación de la nueva red vascular.

La acción coordinada entre factores pro- y anti-angiogénicos así como el equilibrio en su producción determina que las células del endotelio permanezcan en su estado de latencia o procedan a una neovascularización (Good et al., 1990; O'Reilly et al., 1994; Rastinejad et al., 1989). Un modelo de esta acción orquestada propone que mientras el VEGF induce la formación de vasos muy permeables e inmaduros, la angiopoyetina-1 (Ang-1) y la efrina-B2 (Eph-B2) remodelan y promueven su maduración, haciéndolos resistentes a la permeabilidad inducida por el VEGF (Yancopoulos et al., 2000). Cabe mencionar que la mayoría de los reguladores angiogénicos no son específicos del endotelio, sino que tienen acciones sobre un amplio espectro de tipos celulares (Polverini, 1995). Algunos de los tipos celulares que participan en la neovascularización mediante la producción de factores angiogénicos son los monocitos, los macrófagos, los mastocitos, los linfocitos, los fibroblastos, los pericitos, y las propias células endoteliales (Folkman, 1995; Folkman & Shing 1992; Montesano, 1992; Risau, 1990).

La angiogénesis está implicada en el desarrollo de varias patologías que incluyen las neoplasias (Folkman, 1990), las retinopatías vasoproliferativas y los trastornos crónico-inflamatorios como la artritis reumatoide (Battegay, 1995; Folkman, 1995). Algunas de las señales que desencadenan el proceso angiogénico son el estrés metabólico (baja tensión de oxígeno, bajo pH e hipoglucemia), el estrés mecánico (generado por las células en proliferación, lesiones físicas, etc.) y las respuestas inflamatorias asociadas a la infiltración de células del sistema inmune.

Dado el impacto clínico de la angiogénesis, la identificación y caracterización funcional de los factores que la regulan y en particular de los que la inhiben ha recibido un gran interés. Diversas evidencias han permitido incluir a la PRL-16K entre los factores antiangiogénicos (Tabla 1).

Tabla 1.

Estimuladores	Inhibidores
<p>Factores de Crecimiento</p> <p>Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)</p> <p>Factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF)</p> <p>Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)</p> <p>Factor de crecimiento epidérmico (EGF)</p> <p>Factor de crecimiento de hepatocitos (SF/HGF)</p> <p>Factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1)</p> <p>Factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PDGF)</p> <p>Factor de crecimiento transformante alfa (TGF-α)</p> <p>Factor de crecimiento transformante beta (TGF-β)</p> <p>Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α)</p> <p>Factor activador plaquetario</p> <p>Eritropoietina</p> <p>Interleucina-8 (IL-8)</p> <p>Interleucina-2 (IL-2)</p> <p>Otras proteínas o péptidos</p> <p>Angiotensina II</p> <p>Fibrina</p> <p>Factor activador del plasminógeno</p> <p>Urocinasa</p> <p>Angiopoietinas</p> <p>Efrinas</p>	<p>Angiostatina</p> <p>Endostatina</p> <p>Trombospondina-1</p> <p>Factor plaquetario IV</p> <p>Interferón alfa (IFN-α)</p> <p>Interferón gama (IFN-γ)</p> <p>Prolactina 16 kDa (PRL-16K)</p> <p>Péptidos de fibronectina</p> <p>Somatostatina</p> <p>Inhibidores de Metaloproteinasas (TIMPs)</p> <p>Otros</p> <p>Cobre</p> <p>Heparina</p>

Algunas de las moléculas estimuladoras e inhibidoras de la angiogénesis. Tomado de Battegay, 1995 y Poverini, 1995.

2. Prolactina, su receptor y vías de señalización

La PRL es una hormona peptídica originalmente identificada como una hormona lactogénica secretada por células acidófilas denominadas “lactotropos” o “mamotropos” de la glándula hipófisis anterior. La PRL se origina a partir de un solo gen que se encuentra presente en todos los vertebrados. La proteína madura

humana se compone de 199 aminoácidos que resultan en una masa molecular de 23 kDa. Debido a sus efectos y a la similitud en su estructura molecular con otras citocinas, a la PRL se le ha integrado a la familia de las citocinas hematopoiéticas, junto con la hormona de crecimiento, el lactógeno placentario, la interleucina-2 y el factor estimulador de colonias, entre otras (Horseman & Yu-Lee 1994). Además de la regulación de la producción de leche durante la lactancia, la PRL ha mostrado estar involucrada en una diversidad de funciones dentro de la reproducción, pero también fuera de ella, que incluyen acciones sobre la osmorregulación, la conducta, el crecimiento, la respuesta inmune y la angiogénesis (Ben-Jonathan et al., 1996; Bole-Feysot et al., 1998; Sinha, 1995).

Consistentemente con esta diversidad funcional, los receptores de PRL están ampliamente distribuidos (Tabla 2). Estos receptores también están codificados por un solo gen y debido al procesamiento alternativo del RNA mensajero resultan tres isoformas que difieren en la extensión de su dominio intracitoplasmático y se conocen como receptor, corto (42 kDa), intermedio (65 kDa) y largo (80 kDa) (Bole-Feysot et al., 1998; Davis & Linzer 1989). El dominio extracelular o dominio de unión al ligando es idéntico en todas las isoformas. El receptor de PRL pertenece a la familia de los receptores de citocinas hematopoiéticas (Ben-Jonathan et al., 1996; Bole-Feysot et al., 1998). Estos receptores se caracterizan por tener dos puentes disulfuro y una secuencia Trp-Ser-X-Trp-Ser en el dominio extracelular conocida como motivo WS, importante para la unión al ligando. El receptor de PRL se une a tres tipos de ligandos: la PRL, el lactógeno placentario y la hormona de crecimiento (solamente la hormona de crecimiento humana tiene esta propiedad).

La activación del receptor ocurre a través del proceso de dimerización, donde una molécula de PRL se une a dos moléculas de receptor, y por lo tanto involucra dos regiones de la hormona capaces de interactuar con una molécula de receptor. El receptor de PRL carece de actividad enzimática y transduce su señal mediante su asociación con diferentes cinasas, que a su vez activan a las

moléculas efectoras. La vía de señalización más importante activada por el receptor de PRL es la vía JAK/STAT (“Janus kinases”/“signal transducers activators of transcription”) (Bole-Feysot et al., 1998). La dimerización del receptor de PRL le permite la asociación con las cinasas de tirosina JAK-2, que se encuentran en la vecindad de la membrana plasmática y con ello la transfosforilación/activación de las JAK-2. Las cinasas JAK-2 así activadas fosforilan residuos de tirosina del receptor, lo que origina sitios de anclaje para las proteínas STAT, las cuales al unirse al receptor son fosforiladas por las JAK-2. Una vez fosforiladas las STAT se disocian del receptor para formar dímeros que se translocan al núcleo, se unen a secuencias consenso en el DNA denominadas GAS (secuencia de activación de interferón gama) y activan la transcripción génica. Las proteínas STAT activadas por PRL son tres, STAT-1 que en respuesta a PRL induce la expresión de genes que incluyen al de IRF-1 (factor regulador de interferón-1) en células hematopoiéticas; STAT-3 que se activa en respuesta a PRL pero aún se desconocen sus genes blanco; y STAT-5, que en el epitelio mamario induce la transcripción de los genes de β -caseína, β -lactoglobulina, etc. (Yu-Lee, 1997). Además de la vía JAK/STAT la PRL activa otras vías de señalización como son: la vía Ras-Raf-MAPK, la vía de las cinasas de tirosina que incluyen a Src y a Tec, la vía de PI-3K/Akt y la fosfatasa de tirosina SHP-2, entre otras (Bole-Feysot et al., 1998; Clevenger et al., 2003).

Tabla 2.

Algunas células y tejidos en los que se ha encontrado el RNA mensajero o la proteína del receptor de PRL		
Hígado	Corteza cerebral	Glándula mamaria
Ovario	Cerebelo	Glándula lacrimal
Vesícula seminal	Hipotálamo	Cornea
Próstata	Hipocampo	Células mononucleares
Riñón	Caudado y putamen	Linfocitos B
Corazón	Área preóptica	Linfocitos T

Tomado de Ben-Jonathan et al., 1996.

La diversidad funcional de la PRL puede explicarse por la heterogeneidad molecular de los receptores a la hormona, y su capacidad de activar distintas vías

de señalización dependiendo del tipo celular en el que se encuentren. Además existe un nivel de complejidad que puede incidir sobre la diversidad funcional de la PRL, y es la existencia de variantes moleculares de la hormona misma. Se sabe que la PRL puede sufrir cambios postraduccionales, como son fosforilaciones, glicosilaciones y procesamientos proteolíticos, entre otros (Sinha, 1995). En general las modificaciones postraduccionales parecen interferir con la actividad de la PRL. La fosforilación puede generar antagonistas de la hormona y la glicosilación y el procesamiento proteolítico producen isoformas de PRL con reducida capacidad para activar sus receptores y tienen menor actividad biológica (Clapp et al., 1998; Mitra, 1980). Sin embargo, el procesamiento proteolítico también puede generar fragmentos de PRL con actividades biológicas nuevas, como es el caso de la PRL-16K.

3. Proteólisis enzimática de la PRL a PRL-16K

La PRL puede ser proteolíticamente modificada por la catepsina D, una enzima lisosomal del tipo aspartil proteasa que es capaz de generar dos cortes entre los residuos aminoacídicos Tyr 145-Leu 146 y Trp 148-Ser 149. Tras la pérdida del tripéptido 146-148 y la reducción del puente disulfuro intermedio de la molécula, se genera un fragmento amino-terminal de 16 kDa de la PRL llamado PRL-16K y otro carboxilo-terminal de 6 kDa, conocido como PRL-6K (Baldochi et al., 1993).

La PRL-16K endógena ha sido identificada en el suero, el líquido amniótico, el ojo (córnea, iris y retina) y en la glándula pituitaria anterior, así como en distintos tipos celulares como células endoteliales y fibroblastos (Corbacho et al., 2000a; Corbacho et al., 2000b). La PRL-16K funciona como un agonista débil de la PRL en ensayos como los del buche del pichón, de las células Nb2, y de la glándula mamaria (Clapp et al., 1998; Mitra, 1980), y este débil efecto se asocia con su reducida afinidad por el receptor de PRL en los diferentes tejidos (Clapp et al.,

1998). Sin embargo la relevancia funcional de la PRL-16K radica en que ejerce un efecto nuevo no presente en la PRL íntegra, que es el de inhibir la angiogénesis.

4. La PRL-16K como un inhibidor de la angiogénesis

Los efectos antiangiogénicos de la PRL 16K se han observado en estudios *in vitro* sobre el cultivo de células endoteliales en distintas especies y lechos vasculares, donde este fragmento de PRL inhibe tanto la proliferación basal como la estimulada por bFGF y VEGF (Clapp et al., 1993). Esta inhibición parece resultar de impedir la fosforilación de las MAP cinasas p42 y p44 inducida por el bFGF y el VEGF en células endoteliales a través de bloquear la activación de Raf-1 (D'Angelo et al., 1995) y Ras (D'Angelo et al., 1999). La PRL-16K también interfiere con otras fases del proceso angiogénico. Por ejemplo, se ha mostrado que la PRL-16K frena la migración y formación de nuevos vasos a través de inhibir la acción del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA), cuya participación es esencial para la degradación de la matriz extracelular (Lee et al., 1998). Esta inhibición es ejercida indirectamente a través de estimular la expresión del inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1). Además, la PRL-16K también induce la apoptosis del endotelio a través de la activación de las caspasas 1 y 3 y la inhibición de la acción anti-apoptótica de la familia Bcl-2 (Martini et al., 2000).

Todas estas acciones pueden resultar en la inhibición del proceso integral de la angiogénesis que tiene lugar *in vivo*. Al respecto, se ha reportado que la PRL-16K inhibe la vascularización de la córnea inducida por bFGF (Dueñas et al., 1999) y la proliferación de vasos capilares en el ensayo de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (Clapp et al., 1993; Struman et al., 1999). Además, recientemente se mostró que la PRL-16K es capaz de inhibir la vascularización tumoral y el crecimiento de tumores en ratones inmunosuprimidos. En este estudio, células tumorales de próstata (Kim et al., 2003) o de colon (Bentzien et al., 2001) fueron transfectadas con un vector de expresión para producir PRL-16K, y al ser inyectadas en ratones inmunosuprimidos, o bien no

produjeron tumores o generaron tumores de menor tamaño y menos vascularizados que aquellos producidos por las células control.

Todos estos hallazgos indican que la PRL-16K es un factor antiangiogénico que actúa específicamente sobre las células endoteliales ya sea inhibiendo aquellos procesos indispensables para la angiogénesis, tales como la proliferación endotelial y la degradación de la matriz extracelular, o bien afectando los eventos relacionados con la apoptosis del endotelio, tales como los procesos de remodelado y regresión vascular (Corbacho et al., 2002). El hecho de que estas acciones no ocurran en respuesta a PRL, indican que probablemente son mediados por un receptor distinto al receptor clásico de la hormona. Al respecto se ha mostrado que las membranas de células endoteliales contienen sitios de unión de alta afinidad y saturables para el fragmento-16K que no unen a la PRL (Clapp & Weiner 1992) y que pueden representar los receptores de la PRL-16K responsables de mediar sus efectos.

La existencia de receptores específicos apoya el posible papel de la PRL-16K como un regulador natural del proceso angiogénico. Al respecto, se ha propuesto que la PRL-16K representa aproximadamente el 1% del total de PRL hipofisiaria (Torner et al., 1995) y también se ha detectado PRL-16K en la circulación (Clapp, 1987; Clapp et al., 1994; Sinha, 1995). Asimismo, la PRL-16K parece producirse en fibroblastos (Corbacho et al., 2000b) y en las propias células endoteliales (Corbacho et al., 2000a). Por lo tanto, la PRL-16K podría ejercer sus efectos antiangiogénicos a través de acciones sistémicas y locales (autocrinas y paracrinas), y de esta manera contribuir a la inhibición natural de la angiogénesis.

Además de sus efectos en la angiogénesis, hallazgos recientes sugieren la posible participación de la PRL-16K en los procesos inflamatorios, ya que este fragmento de la PRL induce la expresión de la sintetasa del óxido nítrico del tipo inducible (iNOS) y la producción de NO por fibroblastos de pulmón. Este efecto es comparable en potencia al ejercido por una mezcla de citocinas pro-inflamatorias:

interleucina 1- β (IL-1 β), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), vale la pena mencionar que los fibroblastos son muy importantes en las reacciones inflamatorias del pulmón (Corbacho et al., 2000b). El descubrimiento de que la PRL-16K puede regular la producción de NO, fue de gran interés no sólo porque abre nuevas posibilidades de acción sobre otros tipos celulares, sino también porque el NO es un regulador fundamental de la angiogénesis y de la función vascular en general.

5. Óxido nítrico y sintetasas de óxido nítrico

El NO posee una diversidad de efectos entre los que sobresalen acciones sobre la neurotransmisión, el sistema cardiovascular y la inflamación. En células de mamíferos se produce por acción de tres enzimas llamadas en conjunto sintetasas de óxido nítrico (NOS). Y aunque son codificadas por genes diferentes, comparten entre sí un 50-60% de similitud en su secuencia nucleotídica y aminoacídica (Geller & Billiar 1998), y en los casos en los que estas isoformas han sido clonadas en más de una especie el porcentaje de similitud encontrado entre las diferentes especies para una misma isoforma es de 90%.

Hasta el momento, se han descrito la NOS neuronal, la inducible y la endotelial. Dos de estas isoenzimas: la neuronal y la endotelial están continuamente presentes y por lo tanto son llamadas constitutivas, mientras que la tercera isoforma contrasta con éstas dos, ya que normalmente no se expresa en condiciones basales y es inducida por ciertas citocinas y lipopolisacáridos (LPS) de origen bacteriano, por lo que es conocida como inducible (Geller & Billiar 1998).

Mientras que las isoformas constitutivamente activas requieren para su actividad de un incremento de calcio intracelular y calmodulina, la isoforma inducible no depende de calcio y su actividad sólo depende de que se exprese su RNA mensajero (RNAm) y este se traduzca a proteína. Al respecto, en la línea celular AKN-1 proveniente de células epiteliales de hígado humano la expresión

del RNAm de iNOS ocurre luego de dos horas de la estimulación de la transcripción y la actividad de la proteína se encuentra seis horas después de la estimulación con una mezcla de citocinas (Geller & Billiar 1998).

Este grupo de enzimas para generar NO catalizan la transferencia de cinco electrones de uno de los nitrógenos del grupo guanidino de la L-arginina, formando NO y L-citrulina como subproducto en una relación estequiométrica equimolar (Geller & Billiar 1998). El mecanismo general de acción del NO implica su unión al grupo hemo de la enzima guanilato ciclasa soluble, que promueve un cambio conformacional en la enzima y da como resultado su activación con la consiguiente producción de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). La producción de GMPc conduce a diferentes efectos. Por ejemplo en el músculo liso de los vasos sanguíneos activa a la proteína-cinasa G (PKG) y la activación de esta cinasa lleva a una disminución del calcio citosólico, y por tanto a la relajación muscular (Layland et al., 2002). En cambio, en la neurotransmisión se ha propuesto que el GMPc generado en la neurona pre-sináptica activa proteínas cinasas que llevan a la activación de canales que facilitan la liberación de más neurotransmisores (Ignarro, 1992). Y en relación a la disminución de la adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio, el mecanismo aún no es bien conocido, pero se ha sugerido que el GMPc disminuye la unión del fibrinógeno a las plaquetas (Gries et al., 1998). Además, se ha encontrado que la administración de fuentes exógenas de NO inhiben la expresión de p-selectina *in vivo* (Gries et al., 1998).

Se piensa que esta diversidad de efectos del NO puede ser atribuida tanto al sitio de producción, como a las isoformas que lo producen, y de forma importante a la cantidad de NO que generan. Cuando el NO se produce en cantidades picomolares o nanomolares por la actividad de eNOS o nNOS (isoforma neuronal de las sintetasas de NO), el NO regula procesos fisiológicos como la permeabilidad, el tono vascular, la adhesión de plaquetas y leucocitos al endotelio y la neurotransmisión. Sin embargo, cuando se produce en concentraciones micromolares ejerce efectos antimicrobianos que pueden

conducir a eventos inflamatorios crónicos. Los efectos inflamatorios del NO se asocian con la formación de radicales libres que llevan a la oxidación e inactivación de macromoléculas (proteínas y DNA), con la consecuente pérdida de funciones enzimáticas y la desintegración de la membrana plasmática así como la producción de mutaciones en el DNA (Eiserich et al., 1998). En resumen, mientras bajos niveles de NO median muchas acciones fisiológicas normales, altas concentraciones de NO en combinación con una elevada producción de oxidantes provoca daño tisular y mayor inflamación.

Las células endoteliales contienen la isoforma endotelial de NOS, la cual hasta hace algunos años parecía ser la única presente en este tipo celular. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la expresión del RNAm tanto de eNOS como de iNOS en el endotelio vascular tratado con VEGF (Kroll & Waltenberger 1998). El gen humano de eNOS se encuentra en el cromosoma 7, es de aproximadamente 21 kb de tamaño, está compuesto por 26 exones y 25 intrones, y su transcripción genera una proteína de una masa molecular aproximada de 135 kDa. La eNOS, al igual que la nNOS, requiere de calcio intracelular y calmodulina para su activación, así como la unión de varios cofactores. Además, su actividad puede ser regulada por otros cambios postraduccionales que incluyen la interacción con otras proteínas, la fosforilación en residuos de serina y treonina, así como por la localización subcelular de la enzima. El NO generado por eNOS contribuye al mantenimiento de la homeostasis vascular a través de acciones, que como ya se mencionó anteriormente, incluyen la estimulación de la vasodilatación y la permeabilidad vascular, la prevención de la adhesión y activación de leucocitos y plaquetas en el endotelio, la proliferación de las células endoteliales y la inhibición de su apoptosis (Eiserich et al., 1998; Moncada et al., 1991). Por lo tanto, la actividad de eNOS es relevante tanto para la regulación de los cambios vasculares que acompañan al proceso inflamatorio como para el control de la angiogénesis que frecuentemente ocurre asociada a estos procesos.

6. Angiogénesis e inflamación

La inflamación se caracteriza por la presencia de vasodilatación, aumento en el flujo sanguíneo, edema y extravasación de leucocitos y plaquetas. La inflamación se relaciona íntimamente con la angiogénesis y ambos procesos parecen ser codependientes. En el adulto, la angiogénesis frecuentemente ocurre en aquellos tejidos dañados por lesiones o fracturas, y bajo esta situación la angiogénesis puede ser inducida por factores de crecimiento y citocinas generadas en el sitio de inflamación. A su vez, los neovasos favorecen el transporte de fluidos y células inmunes capaces de promover la inflamación (Jackson et al., 1997). Uno de los factores angiogénicos capaces de influir sobre el proceso inflamatorio es el VEGF.

El VEGF, es el factor angiogénico más importante que se conoce; regula todas las fases del proceso angiogénico y su producción se incrementa y se asocia con la sobreproducción de vasos sanguíneos que caracteriza a los padecimientos angiogénesis-dependientes. Además, el VEGF promueve la vasopermeabilidad y la vasorelajación (Fujii et al., 1997; Ku et al., 1993; Wang et al., 1996) esenciales en el proceso inflamatorio. En estos efectos vasculares y pro-angiogénicos del VEGF participa el NO endotelial. Es bien conocido que el VEGF señala a través de activar a eNOS, al generar un aumento en la movilización de calcio intracelular (Moncada et al., 1991) y en la fosforilación de sus residuos de serina (Boo & Jo 2003). Así, los efectos vasoproliferativos y estimulatorios de la permeabilidad vascular del VEGF se reducen en presencia de bloqueadores de la producción de NO (Morbidelli et al., 1996; Papapetropoulos et al., 1997) y los animales “knockout” de eNOS, así como los tratados con inhibidores farmacológicos o naturales de eNOS, presentan una respuesta angiogénica disminuida (Jang et al., 2000; Murohara et al., 1998; Urbich et al., 2002). De manera similar, importantes factores vasodilatadores como la BK y la ACh actúan a través de activar eNOS y el NO resultante estimula la relajación del músculo liso endotelial (Furchgott & Zawadzki 1980; Jeppesen et al., 2002; Kamei et al., 2000).

Más aún, diversas evidencias apoyan el hecho de que la BK tiene acciones angiogénicas. La BK estimula la proliferación y migración de las células endoteliales, así como la formación de nuevas redes vasculares (Miura et al., 2002; Morbidelli, et al., 1998; Parenti et al., 2001) y estas acciones son bloqueadas por inhibidores de eNOS (Miura et al., 2002; Parenti et al., 2001).

Por lo tanto, eNOS constituye un blanco posible de factores capaces de promover e inhibir la angiogénesis. Al respecto, la PRL-16K inhibe el efecto mitogénico del VEGF y evidencias recientes sugieren posibles efectos vasoconstrictores para este fragmento hormonal, en diferentes tipos de endotelios (González et al., 2004). En corazones aislados de cobayo o de rata la perfusión de los vasos coronarios a un flujo constante, permite evaluar respuestas vasodilatadoras a través de la determinación de la presión de perfusión. Bajo estas condiciones, se observó que la PRL-16K inhibe la vasorelajación inducida por BK y que este efecto es reversible (González et al., 2004). Más aún, en este mismo estudio se mostró que la PRL-16K inhibe la relajación de segmentos aislados de aorta inducido por ACh, pero no por el nitroprusiato de sodio, un donador de NO. Estos hallazgos, apoyan el que la PRL-16K inhibe la relajación vascular dependiente de NO, y por lo tanto que inhibe la activación de eNOS.

Para apoyar la conclusión anterior era importante determinar si la PRL-16K también inhibe la activación de eNOS en respuesta a la ACh y a la BK. Además, el efecto sobre eNOS debiera ser general a endotelios de diversos lechos vasculares. Esta posibilidad no es trivial debido a que se han reportado diferencias entre las células endoteliales de vasos grandes y pequeños y de acuerdo a la localización anatómica de los respectivos lechos vasculares (Augustin et al., 1994; Lelkes et al., 1996). Un ejemplo de estas diferencias, es la observación de que en respuesta al bFGF se incrementa la producción del activador del plasminógeno en células endoteliales de la aorta pero disminuye en el endotelio de la vena umbilical (Yamamoto et al., 1994). También existen diferencias en cuanto a los tipos y abundancia de moléculas de adhesión expresadas por las células de la

microvasculatura (capilares sanguíneos) y las células provenientes de vasos grandes (macrovasculatura) (Sewerlick et al., 1992; Sewerlick & Lawley 1993). La heterogeneidad funcional también incluye diferencias a lo largo de la edad (Augustin et al., 1994; Ausprunk et al., 1991; Carmeliet, 2000; Davison et al., 1983) y entre las especies (Fajardo, 1989). Por lo que en este estudio se decidió investigar el efecto de la PRL-16K sobre la producción de NO en endotelios derivados de la micro y de la macrovasculatura.

PROBLEMA

Dado que el NO endotelial media los efectos vasoproliferativos y vasorelajadores del VEGF, la ACh y la BK y que la PRL-16K inhibe estas acciones, proponemos investigar si la PRL-16K inhibe la producción de NO endotelial inducida por estas tres sustancias vasoactivas. Además, analizaremos si esta acción ocurre en endotelios de diversos lechos vasculares.

HIPÓTESIS

La PRL-16K disminuye la producción de NO inducida por VEGF, ACh y BK en células endoteliales de diferentes lechos vasculares.

OBJETIVOS

1. Determinar el efecto de la PRL-16K sobre la producción de NO endotelial estimulada por VEGF, ACh y BK en células endoteliales de aorta bovina en cultivo.
2. Determinar si el efecto de la PRL-16K sobre la producción de NO endotelial ocurre en cultivos primarios de células endoteliales de capilares, venas y arterias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Prolactinas y reactivos

Se utilizó la preparación referencia de PRL de rata suministrada por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica, y una preparación de PRL recombinante humana donada por Genzyme Corporation (Framingham MA, EUA). La PRL-16K fue generada mediante proteólisis enzimática de la PRL de rata, reducción y carbamidometilación de acuerdo al método descrito (Clapp & Weiner 1992). El VEGF fue donado por Genentech (San Francisco CA, EUA), mientras que la ACh y la BK fueron adquiridas de Sigma Chemical Company (St. Louis MO, EUA). Todos los reactivos utilizados en los cultivos celulares son de GIBCO y de SIGMA.

Células endoteliales de aorta bovina (BAEC)

Las células endoteliales se aislaron de la aorta descendente de bovino de acuerdo al método descrito (Bernatchez et al., 1999). Brevemente, las aortas se obtienen frescas y se tratan con colagenasa para desprender las células endoteliales, las cuales se colectan y cultivan en Medio 199 con 5% de suero bovino fetal, 5% de suero de ternera y estreptomina-penicilina (100 U/ml). La suspensión se centrifuga por 10 minutos, a 1000 rpm o 200 g en la centrifuga IEC Centra CL, a temperatura ambiente. El paquete celular se resuspende en 6 ml de medio de cultivo con 2 ml de la suspensión celular, y se siembran en cajas de cultivo (35 mm). Las células se mantienen bajo una atmósfera de CO₂ (5%) y aire (95%) a 37°C y los cultivos son amplificados mediante diluciones 1:3 y resemebrados en cajas de 100 mm, para usarse en las resiembras de la 6 a la 12.

Células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC)

Las células endoteliales se aislaron de cordones umbilicales bovinos, de acuerdo al método descrito (Corbacho et al., 2000a). Brevemente, los cordones recién obtenidos se lavan con un amortiguador de fosfatos y son transportados al laboratorio en solución de Hank a 4°C. Las venas del cordón son canuladas y lavadas con solución de Hank para eliminar los restos de sangre. Un extremo de la vena se cierra y en el otro extremo se inyectan 15 ml de solución de tripsina-EDTA (0.5%), la vena ya canulada se incuba por 20 minutos a 37°C y posteriormente se colecta la tripsina con las células en suspensión y el cordón se lava con solución de Hank para despegar el resto de las células que hayan quedado adheridas. La suspensión celular se diluye en 15 ml de medio de cultivo completo (F12K; 10% de suero bovino fetal y antibióticos) y se centrifuga por 10 minutos a 1000 rpm o 200 g en la centrifuga IEC Centra CL, a temperatura ambiente. El paquete celular se resuspende en 6 ml de medio de cultivo con 2 ml de la suspensión celular y las células se siembran en cajas de cultivo (35 mm). Las células se mantienen bajo una atmósfera de CO₂ (5%) y aire (95%) a 37°C y los cultivos son amplificados mediante diluciones 1:3 y resemebrados en cajas de 100 mm.

Células endoteliales de la retina de rata (CERR)

Las células endoteliales de capilares de la retina de la rata se aislaron y cultivaron de acuerdo al método descrito (Ochoa et al., 1999) que consiste en lo siguiente: los ojos de las ratas macho de la cepa Wistar de 250 g, son enucleados y las retinas se separan, fragmentan y siembran en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEN), suplementado con heparina (100 µg/ml), 10% de suero bovino fetal, estreptomycin-penicilina (100 U/ml). Las retinas se mantienen bajo una atmósfera de CO₂ (5%) y aire (95%) a 37°C. Las células endoteliales emigran y se adhieren más rápidamente que otros tipos celulares, por lo que se seleccionan cambiando el medio consecutivamente, tres horas después de haber sembrado las retinas y luego cada doce horas, los explantes de la retina son retirados al tercer día. Entre los días siete y diez del cultivo celular se forman los parches con apariencia de empedrado que se separan y resiembran en otras cajas cubiertas

con fibronectina. Los cultivos son amplificados mediante diluciones 1:3 en cajas de 100 mm, y las células se utilizan en las resiembras de la 5 a la 12.

Método de la citrulina radioactiva

La actividad de eNOS fue evaluada en las diferentes células endoteliales mediante la cuantificación de [³H]-L-citrulina de acuerdo al método descrito (Bredt & Snyder 1990). Dicho método es altamente sensible y específico ya que utiliza la arginina, que es el sustrato de las NOS, marcada radiactivamente. Las NOS transfieren cinco electrones del grupo guanidino de la [³H]-L-arginina para generar NO y [³H]-L-citrulina en una relación estequiométrica equimolar.

Las células endoteliales (50,000) se contaron usando una cámara de neubauer y fueron sembradas en placas de 12 pozos en su medio de cultivo correspondiente. Una vez adheridas a la placa fueron incubadas en medio de Hank conteniendo 20 mM de HEPES pH 7.4, 0.6 mM de CaCl₂, trasylol (0.2 IU/ml) y 1 mM ditioneitol por media hora para equilibrar las células. Pasado este tiempo, se les añadió 1 µCi/ml de [³H]-L-arginina (Perkin Elmer Life Sciences, Inc. Boston MA, EUA), 32 µg/ml de aprotinina, las sustancias vasoactivas (VEGF, ACh o BK) en presencia o ausencia de PRL-16K o de PRL. Al cabo de una hora la reacción fue detenida con un medio de Hank que contenía EDTA, para posteriormente lisar las células en un amortiguador de 50 mM de HEPES pH 5.5, y 4 mM de EDTA. Los lisados celulares fueron puestos en una columna (Dowex AG50WX8) de intercambio iónico de tipo catiónico, usando el mismo amortiguador de lisis (HEPES pH 5.5) para la elución. Debido a que la [³H]-L-arginina a este pH está cargada positivamente, interacciona con las cargas negativas presentes en la columna y queda retenida en ella, en cambio la [³H]-L-citrulina a este mismo pH tiene una carga neta neutra y por lo tanto eluye de la columna sin ningún impedimento. La [³H]-L-citrulina es colectada en un frasco que contiene líquido de centelleo, para cuantificar la radioactividad en un contador de emisiones β, de Beckman Instruments modelo LS 6500 (Fullerton CA, EUA).

RESULTADOS

Análisis del efecto del VEGF, la ACh y la BK sobre la producción de NO por células endoteliales de diversos lechos vasculares

Con el propósito de investigar el efecto de la PRL-16K sobre la producción de NO endotelial inducida por VEGF, ACh y BK llevamos a cabo experimentos iniciales donde investigamos las dosis adecuadas de VEGF, ACh y BK para activar eNOS en células endoteliales de la aorta bovina (BAEC), de la vena umbilical bovina (BUVEC) y de capilares de la retina de la rata (CERR) (figura 1).

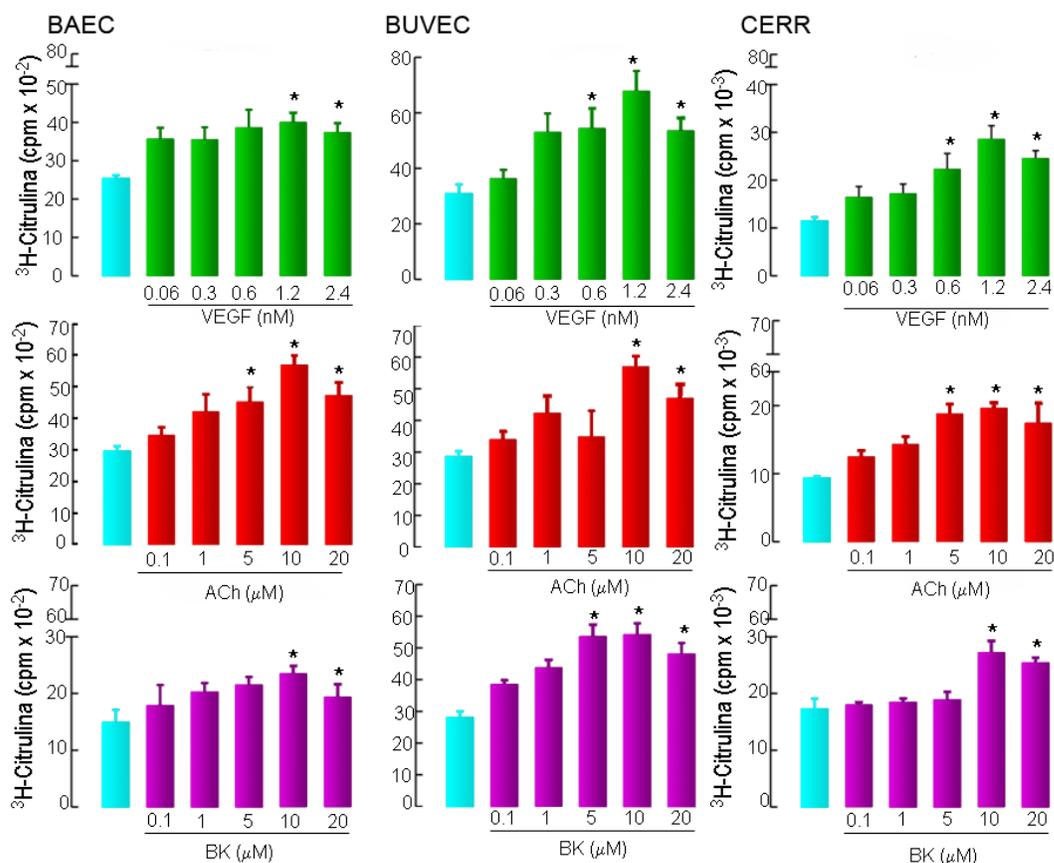


Fig. 1. Células endoteliales de la de la aorta de bovino (BAEC), células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC) y células endoteliales de la retina de la rata (CERR) incubadas durante 1 h en ausencia o presencia de dosis crecientes de VEGF, ACh ó BK. La actividad de eNOS se determinó por la conversión de ^3H -L-arginina a ^3H -L-citrulina. *p<0.05 VEGF, ACh y BK vs. basal no tratado.

Promedios de tres determinaciones de un mismo experimento mostraron como se esperaba, que las tres sustancias vasoactivas estimulan en forma dosis-dependiente la producción de NO en los tres tipos de endotelio. Las dosis que produjeron el efecto máximo y que fueron seleccionadas para los experimentos subsecuentes fueron 1.2 y 2.4 nM para el VEGF y 10 y 20 μ M para ACh y BK.

Efecto de la PRL-16K sobre la producción de NO inducida por VEGF en BAEC

Estudios iniciales del laboratorio mostraron que la PRL-16K generada por proteólisis enzimática y por DNA recombinante, inhibe la actividad de eNOS inducida por VEGF en células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC) y en células de la vena umbilical humana (HUVEC). Este efecto parecía específico en tanto que la inhibición se bloqueaba mediante la inactivación de la PRL-16K con calor, pero no con inhibidores de LPS que son contaminantes ubicuos de origen bacteriano (González et al., 2004). Con estos antecedentes procedimos a demostrar si el efecto inhibitorio de la PRL-16K sobre la producción de NO también ocurre en células endoteliales de la aorta bovina (BAEC).

En la figura 2 se promedian resultados de tres experimentos independientes que muestran que el VEGF (2.4 nM) estimula 1.67 ± 0.37 veces la producción de NO por las células BAEC confirmando experimentos mostrados en la figura 1. El tratamiento con PRL-16K bloqueó totalmente el efecto del VEGF en todas las dosis utilizadas.

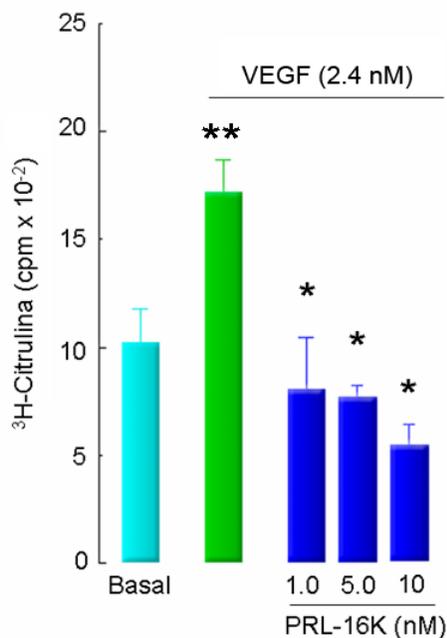


Fig. 2. BAEC incubadas por 1 h en ausencia o presencia de VEGF (2.4 nM) con concentraciones crecientes de PRL-16K. La actividad de eNOS se determinó por la conversión de [^3H]-L-arginina a [^3H]-L-citrulina. ** $p \leq 0.05$ VEGF vs. basal; * $p \leq 0.05$ VEGF + PRL-16K vs. solamente VEGF.

Efecto de la PRL-16K sobre la estimulación de la producción de NO por VEGF en BUVEC y CERR

Con la intención de ver si el efecto inhibitorio de la PRL-16K sobre la producción de NO ocurre en células endoteliales de la microvasculatura, investigamos si la PRL-16K es capaz de inhibir la producción de NO en las CERR. Asimismo, comparamos esta acción con el efecto en BUVEC que ya se había observado antes (González et al., 2004).

En la figura 3 se muestran promedios de tres experimentos independientes donde se analizó el efecto del VEGF en las células BUVEC y CERR. Como ya se había mostrado en ambos tipos celulares, el VEGF (2.4 nM) estimuló la producción de NO medida a través de la cuantificación de [^3H]-L-citrulina. También, de acuerdo a experimentos mostrados en la figura 1, la producción basal y estimulada de NO fue 10 veces mayor en las CERR que en las BUVEC; sin

embargo, la magnitud del efecto del VEGF fue similar (2.51 ± 0.08 veces el valor basal vs. 2.78 ± 0.3 , para BUVEC y CERR, respectivamente). Cabe mencionar que la estimulación del NO por VEGF en las BUVEC y en las CERR fue mayor ($p \leq 0.05$) al efecto observado en las BAEC.

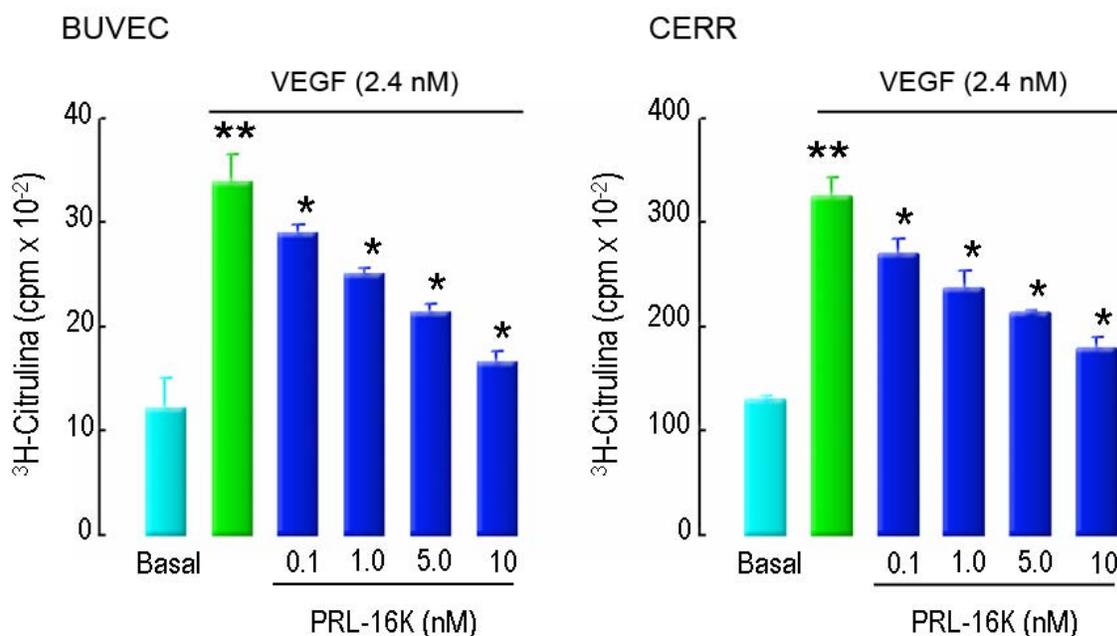


Fig. 3. BUVEC y CERR incubadas durante 1 h en ausencia o presencia de VEGF (2.4nM) y concentraciones crecientes de PRL-16K. La actividad de eNOS se determinó por la conversión de [³H]-L-arginina a [³H]-L-citrulina. ** $p \leq 0.05$ VEGF vs. basal; * $p \leq 0.05$ VEGF + PRL-16K vs. solamente VEGF.

A pesar de estas diferencias, la PRL-16K inhibió la producción de NO estimulada por VEGF en las BUVEC y en las CERR. El efecto fue dosis-dependiente y con una potencia similar. La concentración capaz de inhibir el 50% de la estimulación (IC_{50}) fue de 2.4 ± 0.31 nM para las BUVEC y de 2.8 ± 0.23 nM para las CERR. La comparación con las BAEC no es del todo válida, pues en estas células no se observó un efecto dosis-dependiente.

Efecto de la PRL-16K sobre la producción de NO inducida por ACh y BK en BAEC, BUVEC y CERR

La ACh y la BK ejercen sus efectos vasorelajadores a través de activar eNOS y producir NO endotelial, dado que la PRL-16K inhibe los efectos vasorelajadores de ambas sustancias (González et al., 2004), investigamos si la PRL-16K es capaz de inhibir la producción de NO inducida por estas sustancias vasoactivas.

De manera similar al VEGF y de acuerdo a los experimentos mostrados en la figura 1, promedios de tres experimentos independientes muestran que en las BAEC y en las BUVEC la magnitud de la estimulación por la misma dosis de ACh fue similar (1.63 ± 0.98 vs. 1.70 ± 0.71) y menor ($p < 0.05$) que en las CERR (2.46 ± 0.24) (figura 4). Asimismo, la producción de NO basal y estimulada por ACh fué 10 veces mayor en las CERR que en las BAEC y las BUVEC. En los tres tipos celulares, la PRL-16K inhibió en forma dosis-dependiente la estimulación inducida por ACh, con una potencia comparable (IC_{50} de 4.6 ± 0.03 , 3.2 ± 0.34 y 3.7 ± 0.22 nM, para las BAEC, las BUVEC y las CERR, respectivamente).

Con respecto a la BK, su efecto sobre la producción de NO en los tres tipos celulares fue menor al observado para VEGF y ACh. En las BUVEC y las CERR la misma dosis de BK estimuló 1.35 ± 0.18 y 1.38 ± 0.12 veces el nivel basal de NO, respectivamente (figura 4). En la BAEC se observó un aumento menor (0.6 ± 0.11) que no fue significativo. En todos los casos la PRL-16K inhibió la estimulación inducida por BK, si bien el efecto sólo fue dosis-dependiente en las BUVEC.

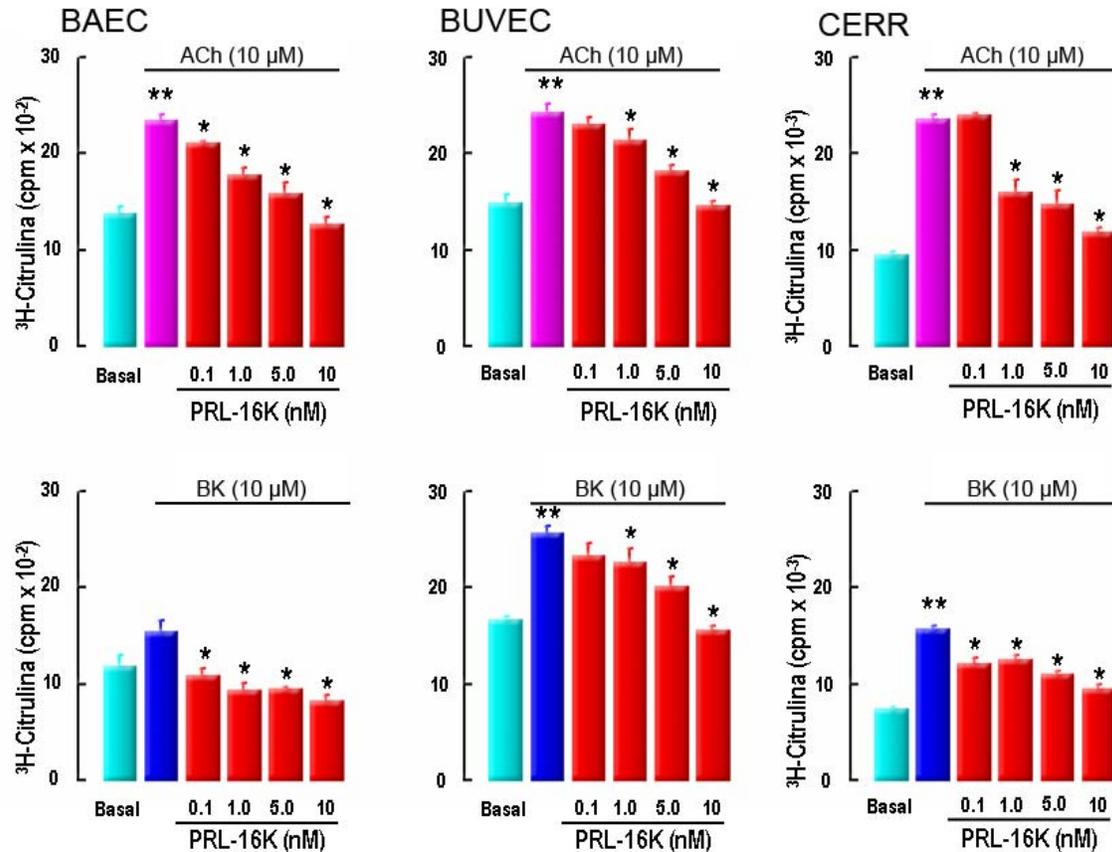


Fig. 4. BAEC, BUVEC y CERR incubadas durante 1 h en ausencia o presencia de ACh (10 μM) o BK (10 μM) y concentraciones crecientes de PRL-16K. La actividad de eNOS se determinó mediante la conversión de [³H]-L-arginina a [³H]-L-citruilina. **p ≤ 0.05 vs. basal; *p ≤ 0.05 vs., ACh o BK solamente.

Independientemente de cuál fue la sustancia activadora, la PRL-16K inhibió su efecto sobre la producción de NO endotelial. El efecto fue dosis-dependiente en la mayoría de los casos y la concentración IC₅₀ capaz de inhibir la estimulación de la producción de NO inducida por VEGF, ACh y BK en los diferentes tipos celulares, se muestra en la tabla 3. La IC₅₀ osciló entre 1.2 ± 0.65 y 4.6 ± 0.03 nM en las BAEC tratadas con BK y con ACh respectivamente, mientras que como se mencionó, en las BAEC tratadas con VEGF no se observó un efecto inhibitorio dosis-respuesta por parte de la PRL-16K.

Tabla 3.

Concentración de PRL-16K capaz de inhibir el 50 % de la estimulación de la producción de NO inducida por VEGF, ACh y BK en los diferentes tipos celulares			
	BAEC	BUVEC	CERR
VEGF	-----	2.4±0.31 nM	2.8±0.23 nM
ACh	4.6±0.03 nM	3.2±0.34 nM	3.7±0.22 nM
BK	1.2±0.65 nM	4.2±0.06 nM	2.3±0.18 nM

En contraste con los efectos de la PRL-16K sobre el endotelio que están bien documentados (Corbacho et al., 2002), no es claro si la PRL puede tener acciones directas sobre el endotelio. Para analizar si la PRL podría modificar la actividad de eNOS estimulada por VEGF, ACh o BK, cultivamos las BAEC, BUVEC y CERR en presencia de dosis crecientes de PRL (figura 5).

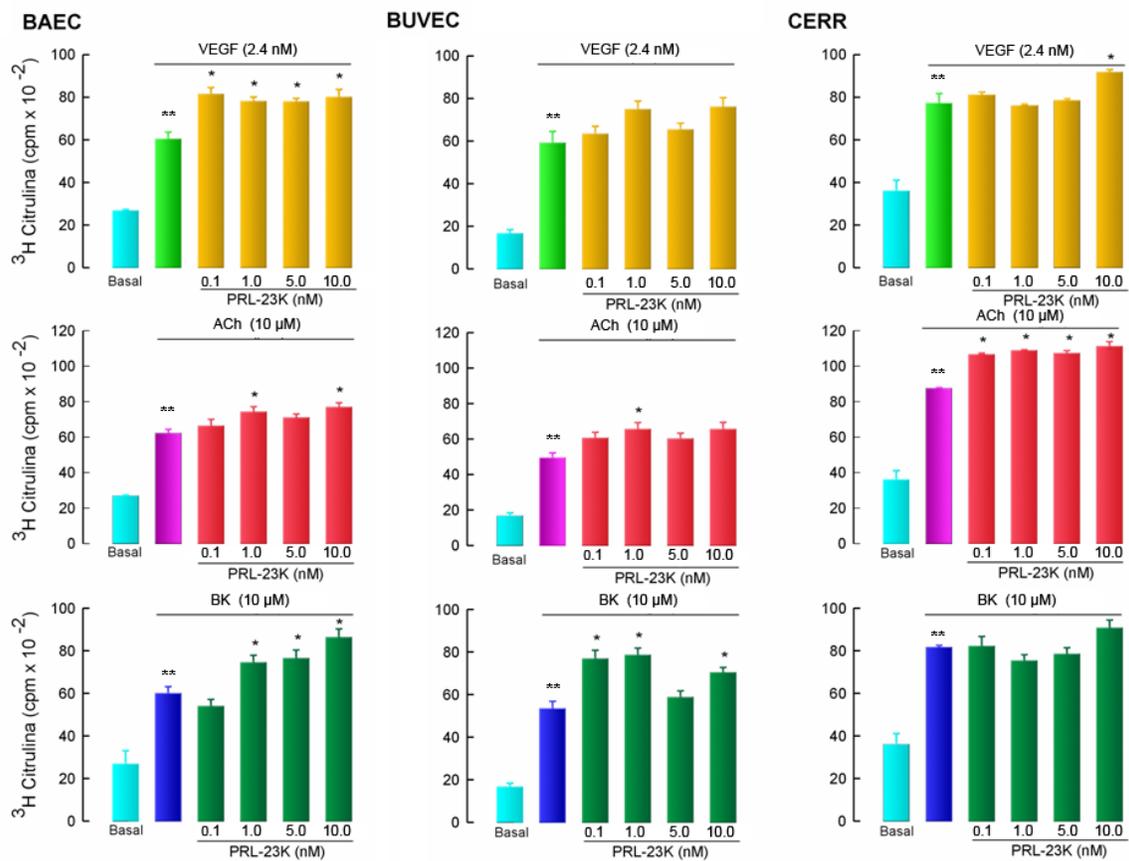


Fig. 5. BAEC, BUVEC y CERR incubadas durante 1 h en ausencia o presencia de VEGF (2.4nM), ACh (10μM) o BK (10μM) y concentraciones crecientes de PRL. La producción de NO se determinó mediante la conversión de [³H]-L-arginina a [³H]-L-citrulina. **p≤0.05 vs. basal; *p≤0.05 vs., solamente VEGF, ACh o BK.

Efecto de la PRL sobre la estimulación de la producción de NO en BAEC, BUVEC y CERR

Promedios de tres experimentos independientes mostraron que la PRL no inhibe la producción de NO estimulada por VEGF, ACh y BK, si bien en algunos casos se observa un pequeño aumento que llega a ser significativo. El hecho de que esta estimulación no sea general a todos los lechos vasculares analizados podría sugerir que este efecto no es biológicamente significativo. Alternativamente, el efecto estimulador podría ser enmascarado en presencia de la estimulación por las sustancias vasoactivas. Para analizar esta última posibilidad determinamos el efecto de la PRL sobre la producción basal de NO en las BAEC, que fue el endotelio que respondió más al posible efecto estimulador de la hormona (figura 6).

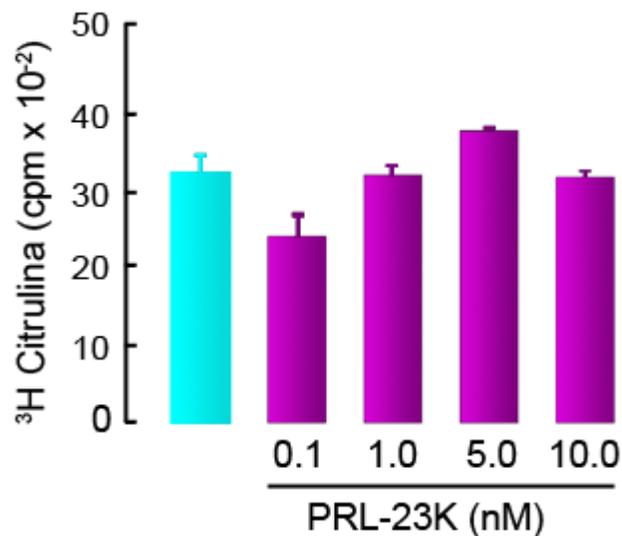


Fig. 6. BAEC incubadas durante 1 h en ausencia o presencia de dosis crecientes de PRL. La producción de NO se determinó mediante la conversión de [³H]-L-arginina a [³H]-L-citrulina.

Promedios de tres experimentos independientes mostraron que la PRL no modifica la producción basal de NO por las BAEC en las diferentes dosis utilizadas.

DISCUSIÓN

La identificación de factores reguladores de la angiogénesis, y en especial de aquellos que la inhiben, ha tomado gran importancia en los últimos años debido a que existen diferentes padecimientos que dependen fuertemente de la angiogénesis, para su desarrollo y progresión. Ejemplos de ellos son el cáncer, la retinopatía diabética y la artritis reumatoide (Folkman, 1995). Entre los factores inhibidores de la angiogénesis se han descrito fragmentos de proteínas que en su forma íntegra son inactivas (Cao, 2001). Entre estos fragmentos se encuentra la PRL-16K, que al igual que los demás (angiostatina, endostatina, trombospondina-1 y factor plaquetario IV), tiene efectos antiangiogénicos claros, pero poco se sabe acerca de su receptor y de sus vías de señalización (Corbacho et al., 2002).

La PRL-16K inhibe el efecto vasoproliferativo del VEGF (Clapp et al., 1993), y evidencias recientes indican que también inhibe la relajación de segmentos de aorta y de vasos coronarios inducida por ACh y BK (González et al., 2004). Es bien conocido que el VEGF, la ACh y la BK actúan en el endotelio a través de activar eNOS y usar el NO como segundo mensajero (Ashrafpour et al., 2004; Fukumura et al., 2001; Kamei et al., 2000; Palmer et al., 1987; Venema, 2002; Wu, 2002). En este trabajo mostramos que la PRL-16K inhibe la producción de NO inducida por VEGF, ACh y BK, y que esta acción parece ser general a endotelios de diversos lechos vasculares.

El NO generado en la vasculatura producido por la activación de eNOS participa como un mediador fisiológico importante para mantener la homeostasis vascular, ya que permite la dilatación de los vasos sanguíneos, protege a la capa íntima de la agregación de plaquetas y leucocitos y promueve la permeabilidad vascular y la angiogénesis (Schwartz et al., 1999). Estas acciones parecen estar diferencialmente representadas entre los distintos lechos vasculares. Por ejemplo, la angiogénesis solamente ocurre en los lechos capilares, y la vasorelajación es más significativa en el árbol arterial.

Dada la importancia del NO como segundo mensajero para promover la permeabilidad vascular, la vasorelajación y la angiogénesis, en este estudio comenzamos por determinar las dosis adecuadas de VEGF, ACh y BK capaces de activar eNOS, en células endoteliales de la macrovasculatura (aorta y vena umbilical) y de la microvasculatura (capilares de la retina). Como era de esperar, las tres sustancias vasoactivas estimularon la producción de NO en los tres tipos de endotelio. El efecto fue dependiente de la dosis y máximo a una concentración de 1.2 nM para el VEGF y de 10 μ M para ACh y BK. Es interesante señalar que en todos los casos la dosis inmediata superior a la del efecto máximo ya no mostró un efecto mayor y si una tendencia no significativa a producir un efecto menor. Es probable que esta disminución no sea biológicamente significativa y solamente refleje pequeñas oscilaciones dentro de un efecto máximo. La curva dosis-respuesta reportada para estas tres sustancias sobre la actividad de eNOS (Bae et al., 2003; Figueroa et al., 2002; Papapetropoulos et al., 1997; Shaul, 2003) es similar a la de este estudio. A saber, de una relación directa hasta alcanzar un nivel máximo que se mantiene estable, probablemente debido a que las concentraciones altas saturan a los receptores respectivos. En nuestro estudio, las dosis que producen el efecto máximo son similares a las reportadas previamente (1.2-3.0 nM, 10-100 μ M, y 1-10 μ M, para VEGF, ACh y BK, respectivamente). Sin embargo, para poder descartar el que en nuestros experimentos las sustancias vasoactivas hayan tenido un efecto dosis-respuesta en campana, sería conveniente determinar el efecto de dosis superiores a las utilizadas.

Los efectos máximos observados para VEGF, ACh y BK variaron entre 1.4 y 2.5 veces el valor en ausencia de tratamiento. Este rango es similar al reportado (2.5, 1.6 y 1.8 para VEGF, ACh y BK, respectivamente) (Bae et al., 2003; Figueroa et al., 2002; Garcia-Cardena et al., 1998; González et al., 2004; Shaul, 2003), y no parece estar asociado al tipo de endotelio, ni al tipo de sustancia vasoactiva utilizada. Por ejemplo, para el VEGF el efecto menor se observó en las BAEC, para la ACh tuvo lugar en las CERR, mientras que para la BK los efectos fueron similares en los tres endotelios. En las CERR, si bien la magnitud de la

estimulación estuvo dentro de dicho rango, la producción de NO fue diez veces mayor a la producida por las otras células endoteliales.

Una vez determinadas las dosis adecuadas de las tres sustancias vasoactivas para activar eNOS, procedimos a investigar la posible inhibición de este efecto por la PRL-16K. Inicialmente, determinamos que la PRL-16K inhibe la producción de NO inducida por VEGF tanto en las BAEC, como en las BUVEC y en las CERR. El efecto inhibitorio de la PRL-16K sobre VEGF, ya se había observado en las BUVEC y en las mismas células de la vena umbilical obtenidas del humano (HUVEC) (González et al., 2004). Nuestros hallazgos vuelven este efecto general a otros endotelios de la macrocirculación (aorta) y de la microcirculación (capilares de la retina). La concentración de PRL-16K capaz de inhibir el 50% de la estimulación en respuesta al VEGF fue similar en BUVEC y en CERR (2.4 ± 0.31 nM y 2.8 ± 0.23 nM, respectivamente), mientras que en las BAEC todas las dosis de PRL-16K inhibieron totalmente el efecto del VEGF. Desconocemos cuál es la razón de esta potencia “aparentemente” mayor de la PRL-16K en las BAEC, pero no creemos que refleje una diferencia real. Mientras que para las BUVEC y las CERR utilizamos la misma preparación estándar de PRL-16K, en las BAEC utilizamos PRL-16K proveniente de otro lote de aislamiento, cuya concentración posiblemente había sido subvaluada. En apoyo a esta posibilidad, recientemente observamos que la preparación de PRL-16K empleada en las BUVEC y en las CERR tuvo un efecto similar en las BAEC.

Alternativamente, las BAEC podrían representar un tipo celular más sensible al efecto inhibitorio de la PRL-16K. En apoyo a esta posibilidad la PRL-16K inhibió la producción de NO en respuesta a BK con una potencia mayor ($p < 0.05$) en las BAEC que en las BUVEC y las CERR (1.2 ± 0.65 nM vs. 4.2 ± 0.06 y 2.3 ± 0.18 nM, respectivamente). Sin embargo, este no fue el caso para ACh, donde la PRL-16K inhibió en forma dosis-dependiente su efecto estimulador de la producción de NO, con una potencia similar en los tres tipos de endotelio (IC_{50} de 4.6 ± 0.03 , 3.2 ± 0.34 y 3.7 ± 0.22 nM, para las BAEC, las BUVEC y las CERR, respectivamente). Cabe mencionar, que la potencia del efecto de las sustancias

vasoactivas y de la inhibición de la PRL-16K pueden variar en función del manejo de los cultivos (número de resiembras, lote del suero empleado para su mantenimiento) y de las sustancias mismas (tiempo de almacenamiento, manejo al momento del experimento, etc.). Si bien siempre se trató de mantener constantes estos parámetros, es frecuente observar variaciones en la actividad de dos alícuotas diferentes del mismo lote de la sustancia respectiva.

Independientemente de la sustancia activadora, la PRL-16K inhibió su efecto sobre la producción de NO endotelial, con una concentración IC_{50} que osciló entre 1.2 ± 0.65 y 4.6 ± 0.03 nM. Esta concentración es similar a la IC_{50} (2-5 nM) reportada para el efecto inhibitorio de la PRL-16K sobre la proliferación de células endoteliales inducida por VEGF (Clapp et al., 1993; Clapp & Weiner 1992). Ahora bien, el hecho de que la PRL-16K inhiba el efecto de importantes factores vasorelajadores (ACh y BK) sobre la producción de NO es consistente con la observación de que la PRL-16K inhibe el efecto vasorelajador de ambas sustancias en segmentos aislados de aorta de rata y en vasos coronarios de corazones aislados de rata y cobayo (González et al., 2004). Consistentemente, las dosis de PRL-16K activas para inhibir la vasorelajación (10 nM) son similares a las observadas en este estudio para inhibir la producción de NO endotelial.

Las acciones directas de la PRL-16K sobre el endotelio vascular han sido bien documentadas; sin embargo, existe controversia acerca de si la PRL tiene efectos sobre las células endoteliales. La PRL no modifica la proliferación, la producción de proteasas, ni la apoptosis de células endoteliales (Corbacho et al., 2002). Además, en la mayoría de los reportes no se ha logrado detectar al receptor de PRL en el endotelio vascular, a excepción de un estudio en células endoteliales de la arteria pulmonar donde la presencia del receptor de PRL se asoció con efectos de la hormona sobre la organización del citoesqueleto (Merkle et al., 2000). Por otra parte, existen reportes que sugieren que la PRL puede disminuir la presión arterial y regular el volumen sanguíneo durante la lactancia (Hanwell & Linzell 1973).

En apoyo a que las células endoteliales no parecen ser blanco de la PRL, en este trabajo encontramos que la PRL no inhibe la activación de eNOS inducida por VEGF, ACh y BK. Sin embargo, cabe mencionar que en algunos casos la PRL estimuló ligeramente la producción de NO estimulada por las tres sustancias vasoactivas y que en ocasiones la estimulación fue estadísticamente significativa. Sin embargo, la estimulación no fue general a todos los lechos vasculares ni se asoció con una sustancia (VEGF, ACh o BK) particular, y podría ser que el efecto de PRL no sea específico. En el laboratorio no hemos podido detectar en forma reproducible la expresión del receptor de PRL en los tres tipos de endotelio. Por otra parte, las variaciones e inconsistencia del efecto estimulador de la PRL podrían reflejar una acción indirecta de esta hormona capaz de potenciar el efecto estimulador de alguna citocina producida por los cultivos endoteliales. Por ejemplo, se sabe que la PRL por sí misma no es capaz de estimular la proliferación de linfocitos T en cultivo, pero sí de potenciar la acción mitogénica de la interleucina-2 (Viselli et al., 1991), y que esta acción se debe a que la PRL estimula la expresión de los receptores a dicha citocina (Viselli et al., 1991). También sería posible que alguna citocina producida por el endotelio fuera capaz de estimular la expresión del receptor de PRL permitiendo la estimulación del NO endotelial por PRL. Al respecto, sabemos que las citocinas proinflamatorias IL-1 β , INF- γ y TNF- α estimulan la expresión del receptor de PRL en fibroblastos de pulmón (Corbacho et al., 2000b), un tipo celular que normalmente no lo expresa.

Si la PRL es capaz de estimular la producción de NO endotelial, esta acción podría haber sido subestimada en presencia de estimuladores de NO. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la PRL no fue capaz de estimular la producción basal de NO en las células BAEC, donde el efecto estimulador de la PRL había sido muy aparente. Estamos llevando a cabo experimentos en los que investigamos si algunas sustancias vasoactivas y citocinas podrían inducir la expresión del receptor de PRL en los distintos tipos de endotelio.

La inhibición de NO endotelial por PRL-16K muy probablemente involucra el bloqueo de la activación de eNOS. Esta enzima media los efectos de VEGF, ACh y BK (Ashrafpour et al., 2004; Fukumura et al., 2001; Kamei et al., 2000; Palmer et al., 1987; Venema, 2002; Wu, 2002). Además eNOS es constitutiva, y el efecto de la PRL-16K ocurre en una hora, un tiempo corto para esperar la transcripción y traducción de iNOS (Geller & Billiar 1998). Al respecto, nuestros resultados preliminares han mostrado que después de una hora de tratamiento con la PRL-16K se observa no una inhibición, sino una estimulación de la expresión del RNA mensajero de iNOS (García y Clapp, resultados no publicados). Estamos en proceso de corroborar estos resultados y extenderlos en el tiempo, ya que abren la posibilidad de que a tiempos prolongados la PRL-16K estimule la producción de NO endotelial debida a iNOS. Dado que iNOS puede estimular la apoptosis del endotelio (Sennlaub et al., 2001; Sagoo et al., 2004), esta acción podría mediar los efectos proapoptóticos de la PRL-16K sobre el endotelio vascular que tienen lugar a tiempos prolongados (48 h) (Martini et al., 2000). En apoyo a que el efecto inhibitorio sobre NO endotelial observado al cabo de una hora se debe a que la PRL-16K bloquea la activación de eNOS, en el laboratorio se observó que la inhibición de la producción de NO se bloquea en presencia de EGTA, un quelante de calcio (González et al., 2004). Como eNOS, y no iNOS, es dependiente de calcio, esta observación indica que la eNOS es el blanco de la acción de la PRL-16K. Por otra parte, en la interferencia con la actividad de eNOS no parece contribuir una disminución en la síntesis de la enzima, pues resultados preliminares indican que no hay cambio en la expresión de eNOS al cabo de una hora de tratamiento con VEGF en presencia o ausencia de PRL-16K (García y Clapp, resultados no mostrados).

La ausencia de inhibición de la producción de NO endotelial en respuesta a PRL, es consistente con el hecho de que los efectos de la PRL-16K son mediados por un receptor de superficie diferente a los conocidos para PRL (Clapp & Weiner 1992). El receptor para PRL-16K aún no ha sido identificado y es poco lo que se conoce acerca de las vías de segundos mensajeros activadas por éste. Los

hallazgos de este trabajo indican que eNOS es parte de dicha vía de señalización. De hecho, la gran versatilidad funcional del NO, sugiere que su inhibición por PRL-16K sea parte del mecanismo de los diversos efectos antiangiogénicos y vasoconstrictores de este fragmento de PRL. Por ejemplo, usando DETANONOatos, que son donadores de NO, se bloquea el efecto inhibitorio de la PRL-16K sobre la proliferación de las células endoteliales inducida por VEGF (González et al., 2004). Por otra parte, la activación de eNOS media la migración de las células endoteliales y la permeabilidad vascular estimulada por el VEGF (Fukumura et al., 2001; Shizukuda et al., 1999), así como efectos de supervivencia e inhibición de la apoptosis (Kimura & Esumi 2003). Como ya se mencionó, la PRL-16K promueve la apoptosis de las células endoteliales (Martini et al., 2000), y además regula la expresión del factor inhibidor del plasminógeno-1 (Lee et al., 1998), un inhibidor específico de la urocinasa capaz de activar las proteasas involucradas en la migración de las células endoteliales.

La ACh, la BK y el VEGF ejercen sus efectos vasodilatadores vía la activación de eNOS y esta acción puede causar hipotensión (Ashrafpour et al., 2004; Kamei et al., 2000; Palmer et al., 1987; Venema, 2002; Wu, 2002). De hecho, el ratón “knockout” de eNOS presenta hipertensión y carece de vasodilatación mediada por el endotelio (Huang et al., 1995; Steudel et al., 1997). En un estudio reciente, se mostró que la PRL-16K inhibe la relajación de vasos coronarios y de segmentos de aorta en respuesta a ACh y a BK, respectivamente (González et al., 2004). De acuerdo a los resultados del presente estudio, esta acción podría involucrar la inhibición de la activación de eNOS por estas sustancias vasoactivas. De hecho, la PRL-16K no inhibe el efecto relajante del donador de NO, nitroprusiato de sodio sobre los segmentos de aorta, indicando que este efecto es dependiente de endotelio, es decir de NO endotelial (González et al., 2004). De esta forma, la inhibición sobre eNOS no sólo refuerza las implicaciones de la PRL-16K en el control de la angiogénesis, sino abre a la fisiología cardiovascular como un nuevo campo de acción para este fragmento hormonal.

Las implicaciones fisiológicas de estas acciones se apoyan en la presencia endógena de PRL-16K. Este fragmento puede ser generado a partir de PRL en la glándula pituitaria (Sinha, 1995; Torner et al., 1995) y en tejidos periféricos incluyendo las células endoteliales (Corbacho et al., 2000a) y los fibroblastos (Corbacho et al., 2000b); además, se ha detectado PRL-16K en la circulación (Corbacho et al., 2000a; Sinha et al., 1985; Sinha, 1995; Torner et al., 1995).

Si bien es cierto que se conoce muy poco acerca de la generación de PRL-16K y su participación en las diferentes condiciones relacionadas con la angiogénesis y la inflamación, evidencias recientes indican que la generación de PRL-16K mediante la acción proteolítica de la catepsina D, puede ser inhibida por la hipoxia en células tumorales de la hipófisis, resultando en una menor conversión de PRL a PRL-16K (Cosío et al., 2003). Además, recientemente se ha reportado la producción de PRL-16K en el ojo de pacientes con retinopatía del prematuro, así como su papel pro-apoptótico sobre las células endoteliales, que posiblemente contribuye a la regresión vascular de los nuevos vasos que se formaron en el desarrollo de este padecimiento neovascular (Dueñas et al., 2004). Finalmente, en un estudio más reciente se observó que el bloqueo de la expresión de PRL en la retina mediante la inyección intravitreal de RNA de interferencia produce una vasodilatación de los vasos retinianos (Aranda et al., 2005) que es comparable a la inducida por la sobre-expresión de VEGF en la retina (Rakoczy et al., 2003). Por lo tanto, se propuso que prolactinas intraoculares promueven la vasoconstricción de los vasos retinianos. Dado que la PRL-16K está presente en la retina (Aranda et al., 2005), esta acción probablemente se debe al efecto inhibitorio de la activación de eNOS demostrado en el presente trabajo.

En conclusión, en este trabajo se muestra que la PRL-16K, pero no la PRL, inhibe la producción de NO por diferentes lechos vasculares en respuesta a importantes factores angiogénicos y vasorelajadores. Dadas las acciones fisiológicas del NO, este hallazgo permite reforzar la participación de la PRL-16K

en el control de la angiogénesis y extender su influencia sobre la fisiología cardiovascular en general.

REFERENCIAS

Aranda J, Rivera JC, Jeziorski M, Riesgo J, Nava G, Lopez-Barrera F, Quiroz-Mercado H, Berger P, Martinez De La Escalera G, Clapp C. 2005. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (En prensa).

Ashrafpour H, Huang N, Neligan PC, Forrest CR, Addison PD, Moses MA, Levine RH, Pang CY. 2004. Vasodilator effect and mechanism of action of vascular endothelial growth factor in skin vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **286**(3), H946-H954.

Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. 1994. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioassays.* **16**(12), 901-906.

Ausprunk D, Dethlefsen SM, Higgins ER. 1991. Distribution of fibronectina, laminin and type IV collagen during development of blood vessel in the chick chorioallantoic membrane. In: R. N. Feinberg, G. K. Sherer, R. Auerbach (eds): *The Development of the Vascular System.* Karger, Basel, Vol. **14**, pp. 93-108.

Bae SW, Kim HS, Cha YN, Park YS, Jo SA, Jo I. 2003. Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase A signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* **306**(4), 981-987.

Baldocchi RA, Tan L, King DS, Nicoll CS. 1993. Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the clearing enzyme is cathepsin D. *Endocrinology.* **133**(2), 935-938.

Battagay EJ. 1995. Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med.* **73**(7), 333-346.

Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functional and clinical aspects. *Endocr. Rev.* **17**(6), 639-669.

Bentzien F, Struman I, Martini JF, Martial J, Weiner R. 2001. Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice. *Cancer Res.* **61**(19), 7356-7362.

Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. 1999. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J. Biol Chem.* **274**(43), 31047-31054.

Bole-Feysot C, Golffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* **19**(3), 225-268.

Boo YC, & Jo H. 2003. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol.* **285**(3), 499-508.

Bredt DS, & Snyder SH. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**(2), 682-685.

Cao Y. 2001. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol.* **33**(4), 357-369.

Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* **6**(4), 389-395.

Clapp C, & Weiner RI. 1992. A specific, high-affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of human prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology.* **130**(3), 1380-1386.

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**(6), 2055-2064.

Clapp C, Lopez-Gomez FJ, Nava G, Corbacho AM, Torner L, Macotela Y, Duenas Z, Ochoa A, Noris G, Acosta E, Garay E, Martinez De La Escalera G. 1998. Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *J Endocrinol*. **158**(1), 137-144.

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F, Weiner RI. 1993. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*. **133**(3), 1292-1299.

Clapp C, Torner L, Gutiérrez-Ospina G, Alcantara E, Lopez-Gomez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejia S, Morales MA, Martinez De La Escalera G. 1994. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**(33), 10384-10388.

Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. 2003. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr Rev*. **24**(1), 1-27.

Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Torner L, Duenas Z, Noris G, Morales MA, Martinez De La Escalera G, Clapp C. 2000a. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J Endocrinol*. **166**(1), 53-62.

Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, Noris G, Macotela Y, Struman I, Martinez De La Escalera G, Freeman BA, Clapp C. 2000b. Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *J Biol Chem*. **275**(18), 13183-13186.

Corbacho AM, Martinez De La Escalera G, Clapp C. 2002. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol.* **173**(2), 219-238.

Cosío G, Jeziorski MC, Lopez-Barrera F, De La Escalera G, Clapp C. 2003. Hypoxia inhibits expression of prolactin and secretion of cathepsin-D by the GH4C1 pituitary adenoma cell line. *Lab Invest.* **83**(11), 1627-1636.

D'Angelo G, Martini JF, Iiri T, Fantl WJ, Martial J, Weiner RI. 1999. 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol Endocrinol.* **13**(5), 692-704.

D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. 1995. 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. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92** (14), 6374-6378.

Davis JA, & Linzer DI. 1989. Expression of multiple forms of the prolactin receptor in mouse liver. *Mol Endocrinol.* **3**(4), 674-680.

Davison PM, Bensch K, Karasek MA. 1983. Isolation and long-term serial cultivation of endothelial cells from the microvessels of the adult human dermis. *In Vitro.* **19**(12), 937-945.

Denekamp J. 1984. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol.* **23**(4), 217-225.

Dueñas Z, Rivera JC, Quiroz-Mercado H, Aranda J, Macotela Y, Montes de Oca P, Lopez-Barrera F, Nava G, Guerrero JL, Suarez A, De Regil M, Martinez De La Escalera G, Clapp C. 2004. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of

prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **45**(7), 2049-2055.

Dueñas Z, Torner L, Corbacho AM, Ochoa A, Gutierrez-Ospina G, Lopez Barrera F, Barrios FA, Berger P, Martinez De La Escalera G, Clapp C. 1999. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest. Ophthalmol Vis Sci.* **40** (11), 2498-2505.

Eiserich JP, Patel RP, O'Donnell VB. 1998. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. Mol Aspects Med.* **19**(4-5), 221-357.

Fajardo LF. 1989. The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol.* **92**(2), 241-250.

Ferrara N, Clapp C, Weiner R. 1991. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology.* **129**(2), 896-900.

Figuroa XF, Gonzalez DR, Martinez AD, Duran WN, Boric MP. 2002. ACh-induced endothelial NO synthase translocation, NO release and vasodilatation in the hamster microcirculation in vivo. *J Physiol.* **544**(Pt 3), 883-896.

Folkman J. 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* **82**(1), 4-6.

Folkman J, & Shing Y. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem.* **267**(16), 10931-10934.

Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**(1), 27-31.

Folkman J, & Cotran R. 1976. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol.* **16**, 207-248.

Folkman J, & Klagsbrun M. 1987. Angiogenic factors. *Science* **235**(4787), 442-447.

Fujii E, Irie K, Ohba K, Ogawa A, Yoshioka T, Yamakawa M, Muraki T. 1997. Role of nitric oxide, prostaglandins and tyrosine kinase in vascular endothelial growth factor-induced increase in vascular permeability in mouse skin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **356**(4), 475-480.

Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK. 2001. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(5), 2604-2609.

Furchgott RF, & Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* **288**(5789), 373-376.

Gamble J, Meyer G, Noack L, Furze J, Matthias L, Kovach N, Harlant J, Vadas M. 1999. B1 integrin activation inhibits in vitro tube formation: effects on cell migration, vacuole coalescence and lumen formation. *Endothelium* **7**(1), 23-34.

Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. 1998. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* **392**(6678), 821-824.

Geller DA, & Billiar TR. 1998. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev.* **17**(1), 7-23.

Gonzalez C, Corbacho AM, Eiserich JP, Garcia C, Lopez-Barrera F, Morales-Tlalpan V, Barajas-Espinosa A, Diaz-Munoz M, Rubio R, Lin SH, Martinez De La

Escalera G, Clapp C. 2004. 16K-Prolactin Inhibits Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase, Intracellular Calcium Mobilization, and Endothelium-Dependent Vasorelaxation. *Endocrinology*. **145**(12), 5714-5722.

Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. 1990. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**(17), 6624-6628.

Gries A, Bode C, Peter K, Herr A, Bohrer H, Motsch J, Martin E. 1998. Inhaled nitric oxide inhibits human platelet aggregation, P-selectin expression, and fibrinogen binding in vitro and in vivo. *Circulation*. **97**(15), 1481-1487.

Hanwell A, & Linzell JL. 1973. The time course of cardiovascular changes in lactation in the rat. *J Physiol*. **233**(1), 93-109.

Horseman ND, & Yu-Lee LY. 1994. Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocr Rev*. **15**(5), 627-649.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. 1995. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. **377**(6546), 239-242.

Ignarro LJ. 1992. Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. *Biochem Soc Trans*. **20**(2), 465-469.

Ingber D, & Folkman J. 1988. Inhibition of angiogenesis through modulation of collagen metabolism. *Lab Invest* **59**(1), 44-51.

Ingber D. 1991. Extracellular matrix and cell shape: potential control points for inhibition of angiogenesis. *J Cell Biochem* **47**(3), 236-241.

Ingber DE, & Folkman J. 1989. How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell* **58**(5), 803-805.

Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD, 1997. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J.* **11**(6), 457-465.

Jang JJ, Ho HK, Kwan HH, Fajardo LF, Cooke JP. 2000. Angiogenesis is impaired by hypercholesterolemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* **102**(12), 1414-1419.

Jeppesen P, Aalkjaer C, Bek T. 2002. Bradykinin relaxation in small porcine retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **43**(6), 1891-1896.

Kamei M, Yoneda Y, Suzuki H. 2000. Endothelial factors involved in the bradykinin-induced relaxation of the guinea-pig aorta. *J Smooth Muscle Res.* **36**(4), 127-135.

Kim J, Luo W, Chen DT, Earley K, Tunstead J, Yu-Lee LY, Lin SH. 2003. Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res.* **63**(2), 386-393.

Kimura H, & Esumi H. 2003. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol.* **50**(1), 49-59.

Kroll J, & Waltenberger J. 1998. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun.* **252**(3), 743-746.

Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. 1993. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol.* **265**(2), H586-592.

Layland J, Li JM, Shah AM. 2002. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol.* **540**(2), 457-467.

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**(9), 3696-3703.

Lelkes PI, Manolopoulos VG, Silverman M, Zhang S, Karmiol S, Unsworth BR. 1996. On the possible role of endothelial cell heterogeneity in angiogenesis. In: M. E. Maragoudakis (ed): *Molecular, Cellular, and Clinical Aspects of Angiogenesis.* NATO ASI Series. Plenum Press, New York, Vol. **285**, pp. 1-17.

Madri JA, Pratt BM, Yannariello-Brown J. 1988. Matrix-driven cell size change modulates aortic endothelial cell proliferation and sheet migration. *Am J Pathol.* **132**(1), 18-27.

Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI. 2000. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol.* **14**(10), 1536-1549.

Merkle CJ, Schuler LA, Schaeffer RC, Gribbon JM, Montgomery DW. 2000. Structural and functional effects of high prolactin levels on injured endothelial cells: evidence for an endothelial prolactin receptor. *Endocrine,* **13**(1), 37-46.

Mittra I. 1980. A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part II. In vivo mammary mitogenic activity of its N-terminal 16K moiety. *Biochem Biophys Res Commun.* **95**(4), 1760-1767.

Miura S, Fujino M, Tanigawa H, Matsuo Y, Saku K. 2002. Transactivation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk-1 by the bradykinin B2 receptor induces an angiogenic phenotype in human cultured coronary endothelial cells] *Nippon Yakurigaku Zasshi.* **120**(1), 104-105.

Moncada S, Palmer RM. 1991. Inhibition of the induction of nitric oxide synthase by glucocorticoids: yet another explanation for their anti-inflammatory effects? *Trends Pharmacol Sci.* **12**(4), 130-131.

Montesano R. 1992. 1992 Mack Forster Award Lecture. Review. Regulation of angiogenesis in vitro. *Eur J Clin Invest.* **22**(8), 504-515.

Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. 1996. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol.* **270**(2), H411-415.

Morbidelli L, Parenti A, Giovannelli L, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. 1998. B1 receptor involvement in the effect of bradykinin on venular endothelial cell proliferation and potentiation of FGF-2 effects. *Br J Pharmacol.* **124**(6), 1286-1292.

Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM. 1998. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation.* **97**(1), 99-107.

Ochoa A, Montes de Oca P, Rivera JC, Dueñas Z, Nava G, Martinez De La Escalera G, Clapp C. 1999. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol and Vis Sci.* **40**, 2498-3703.

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. **79**(2), 185-188.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. **327**(6122), 524-526.

Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. 1997. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest*. **100**(12), 3131-3139.

Parenti A, Morbidelli L, Ledda F, Granger HJ, Ziche M. 2001. The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB J*. **15**(8), 1487-1489.

Pepper MS, Vassalli JD, Orci L, Montesano R. 1992. Proteolytic balance and capillary morphogenesis in vitro. *EXS* **61**, 137-145.

Polverini PJ. 1995. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. **6**(3), 230-247.

Rakoczy PE, Brankov M, Fonceca A, Zaknich T, Rae BC, Lai CM. 2003. Enhanced recombinant adeno-associated virus-mediated vascular endothelial growth factor expression in the adult mouse retina: a potential model for diabetic retinopathy. *Diabetes*. **52**(3), 857-863.

Rastinejad F, Polverini PJ, Bouck NP. 1989. Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by cancer suppressor gene. *Cell*. **56**(3), 345-355.

Risau W. 1990. Angiogenic growth factors. *Prog Growth Factor Res*. **2**(1), 71-79.

Sagoo P, Chan G, Larkin DF, George AJ. 2004. Inflammatory cytokines induce apoptosis of corneal endothelium through nitric oxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **45**(11), 3964-3973.

Schwartz PM, Kleinert H, Forstermann U. 1999. Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **19**(11), 2584-2590.

Sennlaub F, Courtois Y, Goureau O. 2001. Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy. *J Clin Invest.* **107**(6), 717-725.

Shaul PW. 2003. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis. *J Physiol.* **15**(547), 21-33.

Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, Ware JA. 1999. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase C delta activity. *Circ Res.* **85**(3), 247-256.

Sinha YN. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr. Rev.* **16**(3), 354-369.

Sinha YN, Gilligan TA, Lee DW, Hollingsworth D, Markoff E. 1985. Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* **60**(2), 239-243.

Studel W, Ichinose F, Huang PL, Hurford WE, Jones RC, Bevan JA, Fishman MC, Zapol WM. 1997. Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase (NOS 3) gene. *Circ Res.* **81**(1), 34-41.

Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA. 1999. 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. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**(4), 1246-1251.

Swerlick RA, & Lawley TJ. 1993. Role of microvascular endothelial cells in inflammation. *J Invest Dermatol.* **100**(1), 111-115.

Swerlick RA, Lee KH, Wick TM, Lawley TJ. 1992. Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J Immunol.* **148**(1), 78-83.

Tannock IF, & Hayashi S. 1972. The proliferation of capillary cells. *Cancer Res.* **32**(1), 77-82.

Torner L, Mejia S, Lopez-Gomez FJ, Quintanar A, Martinez De La Escalera G, Clapp C. 1995. A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology.* **136**(12), 5454-5460.

Urbich C, Reissner A, Chavakis E, Dernbach E, Haendeler J, Fleming I, Zeiher AM, Kaszkin M, Dimmeler S. 2002. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *FASEB J.* **16**(7), 706-708.

Venema RC. 2002. Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin. *Int Immunopharmacol.* **2**(13-14), 1755-1762.

Viselli SM, Stanek EM, Mukherjee P, Hymer WC, Mastro AM. 1991. Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology.* **129**(2), 983-990.

Walford G, & Loscalzo J. 2003. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost* **1**(10), 2112-2118.

Wang W, Merrill MJ, Borchardt RT. 1996. Vascular endothelial growth factor affects permeability of brain microvessel endothelial cells in vitro. *Am J Physiol*. **271**(1), C1973-C1980.

Wu KK. 2002. Regulation of endothelial nitric oxide synthase activity and gene expression. *Ann N Y Acad Sci*. **962**, 122-130.

Yamamoto C, Kaji T, Furuya M, Sakamoto M, Kozuka H, Koizumi F. 1994. Basic fibroblast growth factor suppresses tissue plasminogen activator release from cultured human umbilical vein endothelial cells but enhances that from cultured human aortic endothelial cells. *Thromb Res*. **73**(3), 255-263.

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. **407**(6801), 242-248.

Yu-Lee LY. 1997. Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med*. **215**(1), 35-52.

Ziche M, & Morbidelli L. 2000. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol*. **50**(1-2), 139-148.