



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Neurobiología
Campus UNAM-JURIQUILLA

ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LA PROLACTINA Y DE LAS VASOINHIBINAS EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LAS RETINOPATÍAS VASOPROLIFERATIVAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta

M en C. José Carlos Rivera López

Asesora: Dra. Carmen Clapp

Juriquilla, Querétaro.

Mayo 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Carmen Clapp y con el apoyo del sistema de becas CONACYT.

Agradezco a:

La Dra. Carmen Clapp
por la experiencia y dedicación durante mi formación científica

Comité tutorial

Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Dr. Hugo Quiroz Mercado

Miembros del jurado

Dra. Herminia Pasantes Ordoñez
Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo
Dr. Marco Antonio Sánchez
Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Dra. Carmen Aceves Velasco
Dra. María Teresa Morales Guzmán

Por sus valiosas críticas y comentarios

Al apoyo técnico del Nut. Fernando López Barrera y del M. en C. Gabriel Nava Pinto

A la asistencia de los laboratoristas Daniel Mondragón y Antonio Prado

A la ayuda siempre eficiente y profesional de la responsable del posgrado la Quim, Leonor Casanova

A los servicios de apoyo del INB representados por el M.V.Z. Martín García, Lic. Pilar Galarza, ISC. Elsa Nydia Hernández, Lic. Lourdes Lara Ing. Omar González y Evelyn Flores

Dedico esta tesis:

A mi madre

por sus valiosos consejos y apoyo que siempre me han impulsado a seguir adelante

A mis hermanas y hermanos

por todo su afecto, entusiasmo y por confiar en mí

A mi esposa Jessy

cuyo amor, cariño y apoyo han sido parte fundamental en este esfuerzo

A todos mis amigos

por contribuir de una u otra forma

ÍNDICE

ABSTRACT.....	1
RESUMEN.....	2
I. INTRODUCCIÓN	3
1. PROLACTINA.....	4
1.2. Receptores y mecanismo de señalización.....	5
1.3. Tejidos productores de PRL	6
1.4. Funciones biológicas de PRL	6
2. VASOINHIBINAS.....	7
2.1. Receptor de vasoinhibinas.....	8
2.2. Efectos y vías de señalización de las vasoinhibinas.....	8
2.3. Tejidos productores de vasoinhibinas.....	11
3. ANGIOGÉNESIS	11
3.1. El globo ocular.....	11
3.2. Vascularización del globo ocular.....	12
3.3. La retina.....	14
3.4. Vascularización retiniana normal.....	16
3.5. Trastornos oculares asociados a neovascularización retiniana.....	17
3.6. Retinopatía del prematuro.....	18
3.7. Retinopatía diabética	18
3.8. Reguladores de la angiogénesis ocular.....	19
3.9. PRL, vasoinhibinas y angiogénesis ocular.....	20
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
III. HIPÓTESIS.....	21
IV. OBJETIVOS.....	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1. Sujetos de estudio.....	23
4.2. Prolactinas y anticuerpos.....	24
4.3. Bioensayo.....	25
4.4. Hibridación in situ.....	26
4.5. Inmunoprecipitación-Western blot.....	26
4.6. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	27
4.7. Inyección intravitreal.....	28
4.8. Determinación de la apoptosis.....	28
Ensayo de TUNEL.	

Ensayo de ELISA.	
4.9. Elisa para medir PRL humana.....	29
4.10. Animales.....	29
4.11. Inducción de la hiperprolactinemia.....	29
4.12. ELISA para medir prolactina de rata.....	30
4.13. Inmunohistoquímica en parafina.....	30
4.14. Análisis de la actividad enzimática que genera vasoINHIBINAS a partir de PRL.....	30
4.15. Western blot.....	31
4.16. Aislamiento de retinas.....	31
4.17. Inmunohistoquímica en criosecciones.....	32
VI. RESULTADOS.....	33
5. PRL, VASOINHIBINAS Y RETINOPATÍA DEL PREMATURO.....	33
5.1. Concentración de PRL en fluidos oculares y suero de pacientes con retinopatía del prematuro.....	33
5.2. La concentración de PRL aumenta en pacientes con retinopatía del prematuro.....	34
5.3. No se observó correlación significativa entre las concentraciones de PRL ocular y sistémica.....	35
5.4. Proteólisis intraocular de la PRL.....	37
5.5. Síntesis de PRL en las membranas fibrovasculares oculares de pacientes con ROP.....	38
5.6. Apoptosis en membranas fibrovasculares del vítreo.....	39
5.7. Anticuerpos anti-PRL previenen la apoptosis de los vasos hialoideos en las ratas recién nacidas.....	40
6. PROLACTINA, VASOINHIBINAS Y RETINOPATÍA DIABÉTICA .	43
6.1. La PRL disminuye en la circulación de pacientes con retinopatía diabética proliferativa.....	43
6.2. El receptor de PRL está presente en los cuerpos ciliares.....	47
6.3. La hiperprolactinemia incrementa los niveles circulantes de PRL y de vasoINHIBINAS en el humor vítreo de la rata.....	48
6.4. La actividad enzimática que genera vasoINHIBINAS a partir de la PRL está reducida en el humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa.....	49
6.5. Análisis de metaloproteasas en el humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa.....	50
7. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA PRL Y DE SU RECEPTOR EN LA RETINA DE LA RATA Y DEL MONO VERDE	52
7.1. La PRL se detecta a lo largo de la retina.....	52
7.2. La PRL se localiza en fotorreceptores, células de Müller, interneuronas, células ganglionares y astrocitos de la retina.....	53
7.3. El receptor de PRL se localiza en la retina de la rata.....	55
7.4. La PRL y el receptor de la PRL se localizan en la retina del mono verde.....	58

VII. DISCUSIÓN.....	60
VIII. CONCLUSIÓN.....	70
IX. PERSPECTIVAS.....	71
X. BIBLIOGRAFÍA	72

ABSTRACT

Vasoproliferative retinopathies characterized by the formation of new blood vessels in the retina are the principal cause of blindness throughout the world. The vaso-inhibins, a family of peptides derived from the proteolysis of the hormone prolactin (PRL), are natural inhibitors of blood vessel growth and dilation in the retina. Here, we investigated if the generation of vaso-inhibins from PRL is altered in retinopathy of prematurity and diabetic retinopathy, and thereby influence the progression of these diseases. Our results show that the levels of PRL increase in the circulation and aqueous humor of patients with retinopathy of prematurity and that the PRL mRNA is expressed in the fibrovascular membranes of these patients where the protein is processed to vaso-inhibins. Moreover, we found that the subretinal fluid of patients with retinopathy of prematurity contains the enzymes capable to generate vaso-inhibins from PRL. Considering that in the majority of the patients with retinopathy of prematurity, the new blood vessels regress by apoptosis and that vaso-inhibins stimulate the apoptosis of the blood vessels, we proposed that these peptides promote the regression of neovessels in this disease. In support to this possibility we showed that immunoneutralization of ocular vaso-inhibins blocks the regression by apoptosis of the hyaloid system, an intraocular vascular system that regresses by apoptosis in the neonatal rat. We hypothesized that in retinopathy of prematurity, the vaso-inhibins are intraocularly generated by means of the proteolysis of PRL derived from systemic or local origin, and that such peptides contribute to the vascular regression of the neovessels, thereby counteracting the progression of the disease. While the study in retinopathy of prematurity patients was held months after ocular angiogenesis has subsided (infants were subjected to intraocular surgery between 0.6-3 years of age), work in diabetic patients allowed us to monitor the influence of PRL and vaso-inhibins at different stages of diabetic retinopathy. Serum PRL was higher in diabetic patients without diabetic retinopathy and in patients with non-proliferative diabetic retinopathy, and this increase disappeared in patients with proliferative diabetic retinopathy (the advanced stage of diabetic retinopathy). Intraocular levels of PRL and vaso-inhibins were associated with the systemic values of PRL in a model of hyperprolactinemic rats. Also, human vitreous contains matrix metalloproteases (MMPs) that generate vaso-inhibins from PRL and their activity was reduced in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. Accordingly, we propose that the reduction of systemic PRL in proliferative diabetic retinopathy may lead to a reduction of intraocular vaso-inhibins favouring retinal neovascularization in the advanced disease. Finally, we have localized the expression of the PRL and its receptor (PRL-R) in the retinas of rat and green monkeys (*Cercopithecus aethiops sabeus*). The expression of both proteins occurred in photoreceptors, Müller cells, ganglion cells and in astrocytes. Therefore, PRL may act locally to regulate the function of several retinal cell types. Altogether, the present findings establish the role of PRL and vaso-inhibins in the pathophysiology of vasoproliferative retinopathies and warrant further investigation.

RESUMEN

Las retinopatías vasoproliferativas caracterizadas por la formación de neovasos (angiogénesis) en la retina son la principal causa de ceguera en el mundo. Las vasoinhibinas son una familia de péptidos derivados de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL) que se producen en la retina e inhiben la angiogénesis. En este trabajo investigamos si la PRL circulante es fuente de vasoinhibinas intraoculares capaces de contrarrestar la progresión de la retinopatía del prematuro y la retinopatía diabética. Nuestros resultados muestran que los niveles de PRL en la circulación y en el humor acuoso de pacientes con retinopatía del prematuro están incrementados significativamente con respecto al grupo control. Además, encontramos que el RNA mensajero de la PRL se expresa en las membranas fibrovasculares de estos pacientes, donde además la PRL se procesa hacia vasoinhibinas. Asimismo, observamos que el líquido subretiniano de los pacientes con retinopatía del prematuro contiene las enzimas capaces de generar vasoinhibinas a partir de PRL. Considerando que en un gran porcentaje de pacientes con retinopatía del prematuro los neovasos involucionan por apoptosis y que las vasoinhibinas estimulan este proceso, sugerimos que las vasoinhibinas endógenas promueven la regresión de los neovasos en esta patología. En apoyo a esta posibilidad, mostramos que la inmunoneutralización de vasoinhibinas oculares bloqueó la regresión por apoptosis del sistema hialoideo, una red vascular intraocular que involuciona por apoptosis en la rata recién nacida. Estos resultados permiten proponer que en la retinopatía del prematuro las vasoinhibinas generadas intraocularmente, a partir de la proteólisis de PRL circulante o de PRL producida en la retina, interfirieron con la progresión de la enfermedad a través de inducir la regresión vascular. Cabe señalar que el estudio de los pacientes con retinopatía del prematuro tuvo lugar meses después de que la angiogénesis ocular dejó de ocurrir (los pacientes fueron sometidos a cirugía ocular entre los 6 meses y los 3 años de edad). En contraposición, trabajo realizado en pacientes diabéticos, nos permitió monitorear los niveles de PRL, y por ende, la generación de vasoinhibinas intraoculares, bajo diferentes estadios de la retinopatía diabética. En este estudio observamos que la concentración sérica de PRL fue significativamente mayor en hombres diabéticos sin retinopatía, o con retinopatía no proliferativa, que en aquellos con retinopatía proliferativa severa. Además, los niveles intraoculares de PRL y vasoinhibinas fueron mayores en un modelo de ratas hiperprolactinémicas. Asimismo, encontramos que el humor vítreo de la rata y de pacientes con retinopatía diabética contiene metaloproteasas de matriz (MMPs) que generan vasoinhibinas a partir de PRL y que su actividad se reduce en asociación a la progresión del padecimiento. Proponemos que la reducción de la PRL sistémica en la retinopatía diabética proliferativa trae consigo una disminución en las vasoinhibinas intraoculares que favorece la neovascularización retiniana. Finalmente, para investigar otras posibles acciones de la PRL en la retina, investigamos la localizamos de la expresión de la hormona y de su receptor (PRL-R) en la retina de la rata y del mono verde (*Cercopithecus aethiops sabeus*). La expresión de ambas proteínas se localizó en los fotorreceptores, células de Müller, células ganglionares y en astrocitos. Estos resultados sugieren que la PRL puede regular la función de varios tipos celulares en la retina. El presente trabajo

apoya la participación de la PRL y de las vasoinhibinas en la fisiopatología de las retinopatías vasoproliferativas y abre un campo fértil para futuras investigaciones.

I. INTRODUCCIÓN

La PRL es una proteína multifuncional capaz de actuar como hormona o citocina en múltiples procesos que van desde el desarrollo mamario hasta la osmoregulación en peces y la metamorfosis en anfibios (Sinha, 1992). A nivel celular la PRL puede ejercer efectos mitogénicos, morfogénicos y actividades secretoras entre otros (Ben-Jonathan et al., 1996). La diversidad funcional de esta proteína se asocia con su heterogeneidad molecular. En particular, la prolactina es modificada proteolíticamente a vaso inhibinas, una familia de péptidos derivados de la proteólisis de la hormona prolactina con acciones antiangiogénicas y vasoconstrictoras (Clapp et al., 2006). Las vaso inhibinas inhiben la angiogénesis tanto *in vivo* (Clapp et al., 1993, Dueñas et al., 1999) como *in vitro* (Clapp et al., 1993, Lee et al., 1998), por medio de la disminución en la proliferación de las células endoteliales (Clapp et al., 1993), la producción de proteasas responsables de su migración (Lee et al., 1998), así como de la estimulación de la apoptosis en el endotelio (Martín et al., 2000). Las vaso inhibinas son capaces de inhibir el efecto vasoproliferativo y vasodilatador del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de otras sustancias vasoactivas (González et al., 2004, García et al., 2008). Estudios recientes señalan que la PRL y su transformación a vaso inhibinas tiene lugar en la retina y que dichos péptidos son reguladores naturales de la angiogénesis (Aranda et al., 2005). El bloqueo de su expresión a través de RNAs de interferencia y/o su acción usando anticuerpos específicos, favorece la angiogénesis en la retina (Aranda et al., 2005). Estas consideraciones llevan a plantear si una disminución en la producción de vaso inhibinas podría contribuir a la patogénesis de las retinopatías vasoproliferativas, que es la hipótesis que abordamos en este estudio.

A continuación se revisan brevemente algunas características estructurales y funcionales de la PRL y de las vaso inhibinas. Se aborda el tema de la angiogénesis ocular y de la sobreproducción de vasos sanguíneos retinianos que caracteriza a las retinopatías vasoproliferativas.

1. PROLACTINA

La prolactina (PRL) pertenece a una familia de proteínas estructuralmente relacionadas derivadas de un mismo gen. El gen de la PRL en la rata se encuentra localizado en el cromosoma 17 y tiene un tamaño aproximado de 10 kb. En el humano lo encontramos presente como copia única en el cromosoma 6, abarca 15 kb y está compuesto de 5 exones y 4 intrones. El ARN mensajero maduro de la PRL posee 1 kb de longitud y codifica una proteína de 227 aminoácidos que incluye un péptido señal de 28 aminoácidos que eventualmente es eliminado al entrar en retículo endoplásmico (Ben-Jonathan et al., 1996).

Con una masa molecular de 23 kilodaltones (kDa) en su forma más común, la PRL consiste de una cadena polipeptídica de 197-199 aminoácidos según la especie, y presenta 6 residuos de cisteína, que se unen entre sí para formar tres puentes disulfuro: uno localizado cerca del extremo amino-terminal, otro en el extremo carboxilo-terminal y el tercero en la región intermedia, los cuales dan lugar a dos asas pequeñas (una amino y otra carboxilo terminal) y a una asa mayor intermedia (Sinha 1995, Clapp et al., 2006; Fig. 1).

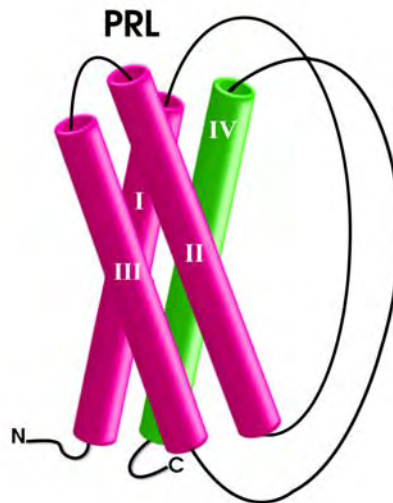


Figura 1. Representación tridimensional de la PRL de 23 kDa (Clapp et al., 2006).

Si bien la PRL de 23 kDa es la forma molecular predominante, se ha documentado la presencia de isoformas moleculares estructuralmente relacionadas menos abundantes, que pueden originarse a partir de modificaciones

postraduccionales tales como glicosilaciones, desaminaciones, fosforilaciones, agregación por puentes disulfuro y modificaciones proteolíticas (Sinha 1995).

1.2. Receptores y mecanismo de señalización

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

La PRL inicia sus efectos a través de inducir la dimerización de sus receptores en la membrana de sus células blanco, lo cual conlleva a la activación de la vía denominada JAK/STAT (“Jannus Kinases” / “Signal Transducer and Activator of Transcription”). Las JAK representan a una familia de tirosinas cinasas capaces de fosforilar a los factores de transcripción STAT. La fosforilación de STAT permite su translocación al núcleo y su unión subsecuente a secuencias consenso en el ADN, llamadas GAS (Gamma Activation Site) lo que permite la transcripción de diferentes genes (Bole-Feysot et al., 1998; Fig. 2).

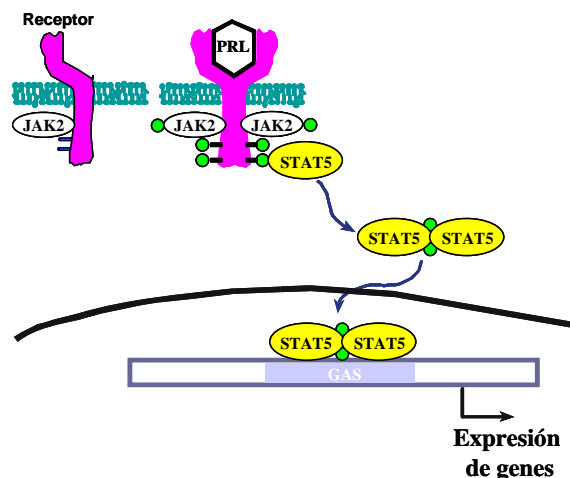


Figura 2. Cascada de activación intracelular iniciada por PRL. Esta vía se activa por la dimerización del receptor y resulta en la fosforilación de la activación de JAK/STAT y la subsecuente inducción de la transcripción de diferentes genes asociados a procesos de proliferación y diferenciación celular (Yu Lee., 1997).

1.3. Tejidos productores de PRL

La PRL es producida principalmente por una clase de células de tinción acidófila conocidas como lactototopos en la glándula pituitaria humana (Frawley, 1989). La producción de esta hormona fue considerada por mucho tiempo exclusiva de esta glándula. Sin embargo, su síntesis no está limitada a la hipófisis, ya que se ha demostrado que se encuentra presente en una gran variedad de tejidos no pituitarios que incluyen al sistema nervioso central, sistema inmune, placenta, glándula mamaria y endotelio vascular, entre otros (Ben-Jonathan et al., 1996; Fig. 3).

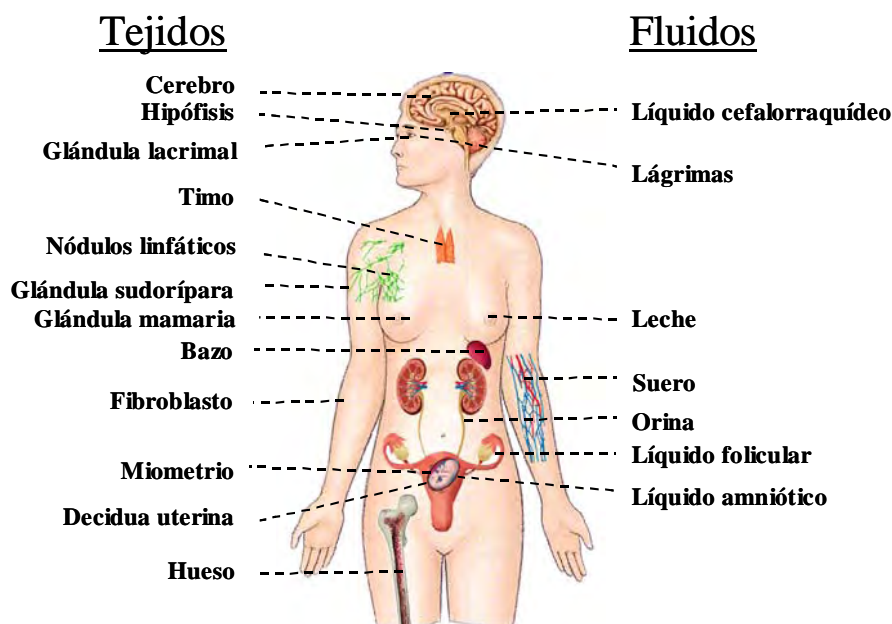


Figura 3. La PRL se produce en diferentes tejidos y se encuentra presente en la mayoría de los fluidos corporales (Ben-Jonathan et al., 1996)

1.4. Funciones biológicas de la PRL

La prolactina es una de las hormonas más versátiles del organismo. Encontrada en todos los vertebrados estudiados tiene participación en más de 300 efectos diferentes, que van desde el desarrollo mamario, la iniciación y mantenimiento de la lactancia en mamíferos, hasta la osmoregulación en peces, conducta de anidación en aves y crecimiento y metamorfosis en anfibios (De Vlaming, 1979, Nicoll, 1980, Kelly et al., 1991, Sinha, 1992, Ben-Jonathan et al., 1996, Bole-Feysot et al., 1998 y Fremman et al., 2000). Además, la PRL puede

procesarse hacia fragmentos denominados recientemente “vasoinhibinas” con actividades sobre la angiogénesis que amplía aún más el universo de efectos de esta hormona (Clapp et al., 1993, Clapp et al., 2006).

2. VASOINHIBINAS

Las vasoinhibinas representan a una familia de péptidos derivados de la proteólisis de la hormona prolactina que poseen acciones antiangiogénicas y vasoconstrictoras (Clapp et al., 2006; Fig 4). Se producen por la acción de proteasas del tipo de la catepsina-D (Baldocchi et al., 1993), proteína morfogenética ósea-1 (Ge et al., 2007) y por metaloproteasas de matriz (Macotela et al., 2006). La proteólisis enzimática de la PRL humana por catepsina-D produce péptidos antiangiogénicos de 1-132 (15 kDa), 1-147 (16.8 kDa) y 1-150 (17.2 kDa) (Piwnica et al., 2004), la proteína morfogenética ósea-1 procesa a la PRL entre los aminoácidos 159-160 para generar un fragmento de 18 kDa, y las metaloproteasas de matriz (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-13) cortan la unión peptídica entre los aminoácidos 156-157 de la PRL humana para generar una vasoinhibina de 17 kDa que puede ser procesada mayoritariamente por las MMPs a vasoinhibinas de 16 kDa y 14 kDa (Macotela et al., 2006).

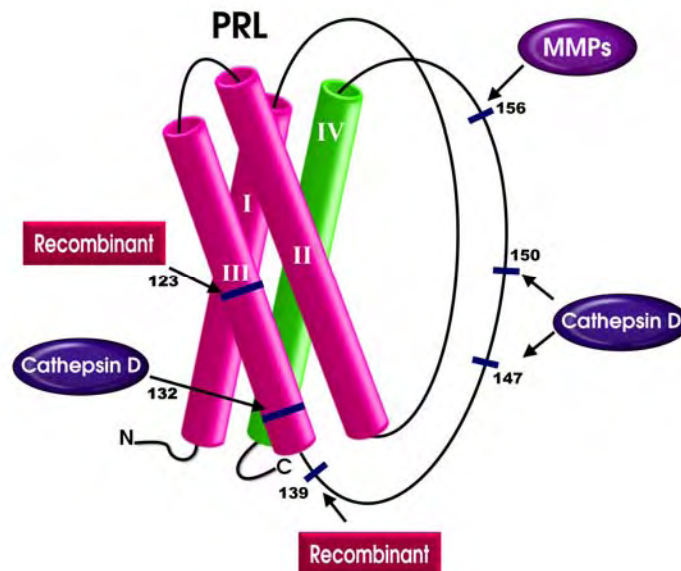


Figura 4. Representación esquemática de la estructura tridimensional de la PRL humana indicando los sitios de corte para catepsina-D, MMPs y generación de vasoinhibinas por recombinación homóloga (Clapp et al., 2006).

2.1. Receptor de vasoinhibinas

Existen hasta el momento algunas evidencias que sugieren la existencia de un receptor específico para vasoinhibinas. Las evidencias están basadas principalmente en ensayos de unión y entrecruzamiento (cross-linking) utilizando vasoinhibinas marcadas isotópicamente que muestran sitios específicos, saturables y de alta afinidad en membranas aisladas de células endoteliales a los que se unen las vasoinhibinas con una K_d de 1-10 nM (Clapp y Weiner, 1992). Estos sitios de unión se asocian a proteínas de 52 kDa y 32 kDa, sin embargo, no es claro si estas proteínas son receptores para vasoinhibinas o proteínas de unión reguladoras importantes para su función, por lo que es necesario identificarlas químicamente. Otro hallazgo importante en esos estudios fue que la PRL íntegra no compitió con las vasoinhibinas por estos sitios de unión, tampoco lo hizo la hormona de crecimiento humana (hGH) que es lactogénica y capaz de activar a los receptores clásicos de PRL (Clapp y Weiner, 1992).

2.2. Efectos y vías de señalización de las vasoinhibinas

Las vasoinhibinas tienen efectos anti-angiogénicos que no comparten con la PRL (Clapp et al., 2006). Las vasoinhibinas inhiben la angiogenesis tanto *in vivo* (Clapp et al., 1993, Dueñas et al., 1999) como *in vitro* (Clapp et al., 1993, Lee et al., 1998), a través de reducir la proliferación de las células endoteliales (Clapp et al., 1993), la producción de proteasas responsables de su migración (Lee et al., 1998), así como de estimular su apoptosis (Martín et al., 2000). Las vasoinhibinas son capaces de inhibir el efecto vasoproliferativo y vasodilatador del VEGF y de otras sustancias vasoactivas (González et al., 2004, García et al., 2008; Fig. 5).

Uno de los mecanismos por los cuales las vasoinhibinas ejercen sus efectos antiangiogénicos es a través de inhibir la migración del endotelio. Por ejemplo, la activación de la urokinasa activadora del plasminógeno (uPA) involucrada en la proteólisis extracelular es fundamental en la regulación de la angiogénesis porque activa la cascada de proteasas que degradan la matriz extracelular y por lo tanto, juegan un papel esencial en la migración de las células endoteliales y en la reparación de los tejidos. El tratamiento de células endoteliales derivadas de capilares de cerebro bovino con vasoinhibinas, inhibe la actividad de

la uPA a través de estimular la expresión del inhibidor del plasminógeno-1 (PAI-1), uno de los principales inhibidores de uPA (Lee et al., 1998). Las vasoinhibinas también reducen la organización de redes capilares debido a que inhiben la asociación de células endoteliales en estructuras tubulares semejantes a capilares, que ocurre cuando estas son cultivadas en geles de colágena (Clapp et al., 1993). Estas acciones sobre el endotelio se traducen en la inhibición del proceso integral de la angiogénesis que ocurre *in vivo*. Las vasoinhibinas inhiben la angiogénesis en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo (Clapp et al., 1993), así como la angiogénesis inducida por bFGF en córnea de la rata (Dueñas et al., 1999; Fig. 5).

Otro efecto de las vasoinhibinas sobre la angiogénesis es inhibir el efecto vasoproliferativo y vasodilatador del VEGF y de otras sustancias vasoactivas (González et al., 2004). Lo hacen bloqueando la activación de la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) y la subsecuente producción de NO endotelial (González et al., 2004). De hecho, se sabe que las vasoinhibinas pueden inhibir la activación de la eNOS inducida por VEGF, acetilcolina y bradicidina, a través de interferir con la movilización intracelular de calcio (González et al., 2004) y la fosforilación de la eNOS en el residuo serina¹¹⁷⁹, procesos esenciales para la activación de la enzima (García et al., 2008). Además, como resultado de la inhibición de la eNOS, las vasoinhibinas bloquean la dilatación inducida por acetilcolina y bradicidina de segmentos aislados de aorta y de vasos coronarios de corazones aislados (González et al., 2004; Fig. 5).

Las vasoinhibinas previenen la transición de las fases G₀-G₁ y G₂-M en el ciclo celular del endotelio a través de inhibir la acción de las ciclinas D1 y B1 (Tabruyn et al., 2005). Estas acciones podrían deberse a la inhibición de la vía de cinasas activadas por mitógeno (MAPK) porque las vasoinhibinas bloquean esta vía inducida por la acción del VEGF y del bFGF a nivel de Ras (D'Angelo et al., 1995, D'Angelo et al., 1999). Adicionalmente, donadores de óxido nítrico bloquearon el efecto inhibitorio de las vasoinhibinas sobre la proliferación endotelial inducida por VEGF (González et al., 2004) lo que sugiere que el efecto antiproliferativo de las vasoinhibinas puede deberse a su efecto sobre la inhibición de la eNOS. Al respecto, se sabe que el óxido nítrico puede potenciar la activación

2.3. Tejidos productores de vasoinhibinas

Las vasoinhibinas se han detectado en la hipófisis anterior y posterior (Torner et al., 1995) y en diferentes tejidos extrahipofisarios, incluyendo el endotelio de diversos lechos vasculares (Corbacho et al., 2000a), los fibroblastos (Corbacho et al., 2000b), el cartílago (Macotela et al., 2006), el hipotálamo (Clapp et al., 1994) y la retina (Aranda et al., 2005). Además, estos péptidos están presentes en la circulación (Corbacho et al., 2002).

3. ANGIOGÉNESIS

Se denomina angiogénesis al proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Este proceso se encuentra altamente restringido en la mayoría de los tejidos del adulto debido a la acción de factores antiangiogénicos endógenos capaces de inhibir la proliferación, la migración y la adhesión, y/o de estimular la apoptosis de las células del endotelio vascular (Hanahan y Folkman, 1996). La alteración de este ambiente inhibitorio induce la sobreproducción de neovasos característica de los padecimientos “angiogénico-dependientes” que incluyen al cáncer, la artritis reumatoide, y las retinopatías vasoproliferativas (Folkman, 1995).

3.1. El globo ocular

El ojo es un órgano de alta especialización que permite la detección y el análisis de los patrones de distribución de la luz en el tiempo y el espacio. La luz pasa a través de la córnea, una membrana transparente localizada al frente del globo ocular y del cristalino, el cual enfoca la luz hacia la retina. El iris, la parte coloreada del ojo, define a la pupila, la cual controla la cantidad de luz que penetra al ojo. Los rayos de luz pasan a través de la cavidad del vítreo que está provista de un material transparente gelatinoso y finalmente llega a la retina, donde estimula a los fotorreceptores que llevan a cabo el fenómeno de “transducción”, que consiste en la transformación del estímulo luminoso en un impulso nervioso que es transmitido hacia los centros superiores de integración en el cerebro a través del nervio óptico (Hart, 1992; Fig. 6)

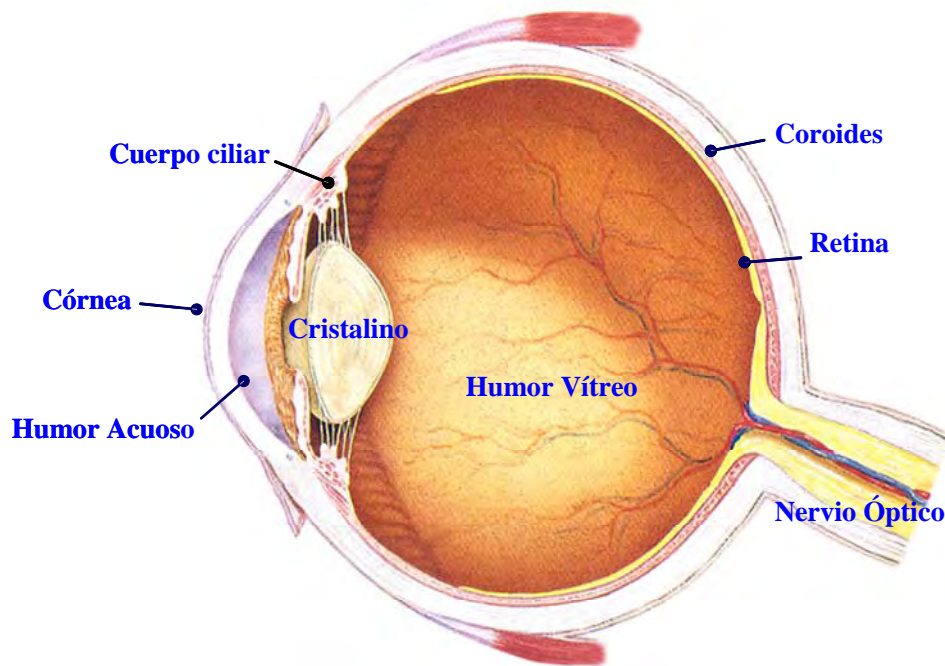


Figura 6. Principales estructuras del ojo humano.

3.2. Vascularización del globo ocular

Las arterias del globo ocular son ramas de la *arteria oftálmica* que deriva de la *arteria carótida*. La *arteria central de la retina* entra al ojo a través de la lámina cribosa de la esclera y aparece por el centro de la papila o disco óptico. Esta arteria se divide en rama superior e inferior, que a su vez se dividen en nasal y temporal sin existir anastomosis entre las ramas. En la retina discurren por la capa de fibras nerviosas nutriendo las capas más internas de la retina, excepto la zona de los fotorreceptores, que es nutrida por la coroides (coriocapilares).

Las *arterias ciliares posteriores* atraviesan la esclerótica alrededor de la lámina cribosa. Existen dos tipos: *arterias ciliares posteriores cortas* (A.C.P.C) que forman plexos al entrar, dando lugar a la coroides y *arterias ciliares posteriores largas* (A.C.P.L) que llegan hasta el cuerpo ciliar sin ramificarse.

Las *arterias ciliares anteriores* son ramas terminales de las arterias de los músculos rectos. Penetran en el ojo delante de su inserción y junto con las arterias ciliares posteriores largas forman el círculo arterial mayor del iris, con ramificaciones hacia la coroides periférica, el cuerpo ciliar y el iris. (Fig. 7).

Las venas del globo ocular son tributarias de las *dos venas oftálmicas*, formadas por la *vena central de la retina*, las *venas vorticosas*, que salen por el ecuador del ojo y drenan la sangre de la *úvea* (capa media del ojo situada debajo de la *esclerótica*, que consta de tres estructuras; el *iris*, el *corpo ciliar* y la *coroides*) y las *venas ciliares* anteriores que reciben sangre de la porción anterior de la esclera, cuerpo ciliar e iris (Henkind et al., 1979).

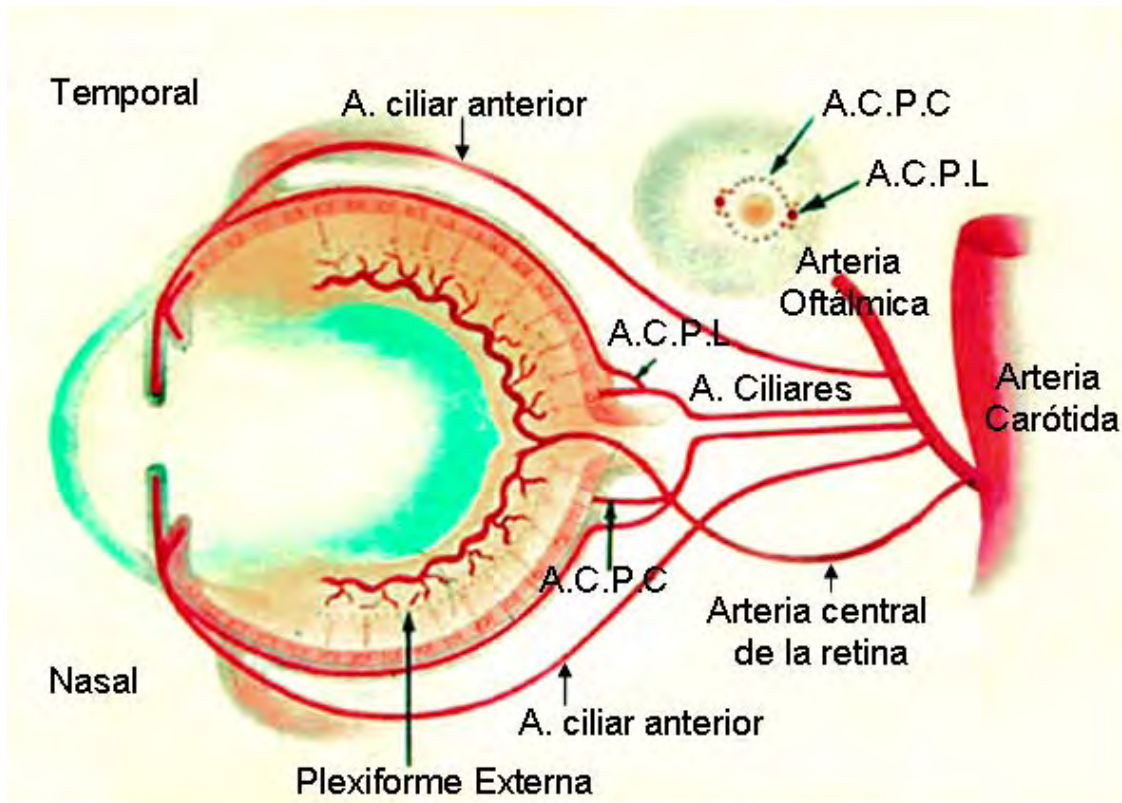


Figura 7. Esquema que ilustra el sistema vascular que irriga al globo ocular. *Arterias ciliares posteriores cortas (A.C.P.C) y arterias ciliares posteriores largas (A.C.P.L).*

3.3. La retina

La retina se origina de una evaginación bilateral del prosencéfalo llamada *vesícula óptica primaria*, que tras una invaginación local se transforma en la *vesícula óptica secundaria* con forma de copa. Cada *copa óptica* permanece conectada con el cerebro mediante un tallo, el futuro nervio óptico. En el adulto, los derivados de la vesícula óptica secundaria bilaminar están formados por una capa epitelial pigmentada externa, el epitelio pigmentario retiniano (RPE), y una lámina interna, la retina neural o retina propiamente dicha, que contiene elementos semejantes a los del cerebro, por lo que puede considerarse como una parte especialmente diferenciada del sistema nervioso central (Mann, 1964).

La retina neural consiste principalmente de 6 tipos de neuronas en organización laminar: fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrinas, células interplexiformes y células ganglionares. Los fotorreceptores se encuentran en contacto con el epitelio pigmentario y sus segmentos externos (OS) forman la capa fotorreceptora y sus somas forman la capa nuclear externa (ONL). Las terminales de los fotorreceptores forman contactos sinápticos con las proyecciones de las células horizontales y bipolares definiendo la capa plexiforme externa (OPL). Los somas de estos dos tipos de neuronas, junto con los de las células interplexiformes y amacrinas, forman la capa nuclear interna (INL). La capa plexiforme interna (IPL) está formada por las proyecciones de las células bipolares, amacrinas y ganglionares. Las células ganglionares (GCL) se encuentran en el margen interno de la retina y sus axones constituyen el nervio óptico (Kolb et al., 2002). La retina contiene células gliales: las células de Müller, los astrocitos y la microglia. Las células de Müller son células especializadas, cuyos núcleos se sitúan en la capa nuclear interna y cuyas prolongaciones se extienden a través de todas las capas de la retina, desde la membrana limitante externa (OLM) a la membrana limitante interna (ILM). La membrana limitante externa está formada por uniones adherentes entre estas células de Müller y los segmentos internos de los fotorreceptores. La membrana limitante interna por su parte está formada por uniones de las prolongaciones terminales de las células de Müller, que se extienden lateralmente y una membrana basal que separa a las neuronas del humor vítreo. Las células de

Müller participan en el control extracelular de los niveles de potasio, protegen a las neuronas de un exceso de neurotransmisores citotóxicos como el glutamato, y participan en la liberación de sustancias neuroactivas. Los astrocitos por su parte, están limitados a la capa de las células ganglionares y a la región de la membrana limitante interna. Tienen una morfología característica de cuerpo celular aplanado y una serie de prolongaciones en forma radial que contienen en su citoplasma una gran cantidad de filamentos intermedios que se marcan con anticuerpos específicos contra la proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Su morfología cambia según su localización, de manera que pasan de ser muy alargados a nivel de la retina central a una morfología estrellada a nivel de la retina periférica (Triviño et al., 2000). No existen astrocitos a nivel de la fóvea avascular ni de la ora serrata que es la unión entre la retina y el cuerpo ciliar donde se observa la transición entre el área no fotosensible a la fotosensible de la retina. Los astrocitos tienen una estrecha relación con las células ganglionares y con los vasos sanguíneos formando parte de la barrera retiniana, además junto con las células de Müller son los encargados de proveer glucosa a las neuronas y regular los niveles extracelulares de potasio. Finalmente, tenemos a las células microgliales, una población heterogénea de células que derivan del mesodermo circundante a las vesículas ópticas, por lo que estrictamente no son consideradas células neurogliales. Penetran en la retina coincidiendo con los precursores de los vasos sanguíneos, donde participan en la liberación de factores pro-angiogénicos y en la estimulación de otros tipos celulares para la liberación de estos factores. Estas células de la microglía pueden encontrarse a cualquier nivel de la retina. En las tinciones de Golgi, aparecen como células multipolares, con pequeños cuerpos celulares y unos procesos irregulares y cortos. Esto hace que sea relativamente fácil confundirlas con las células nerviosas de la retina, especialmente cuando su cuerpo celular se sitúa a nivel de una de las capas nucleares y sus procesos a nivel de una de las capas plexiformes (Kolb et al., 2002; Fig. 8).

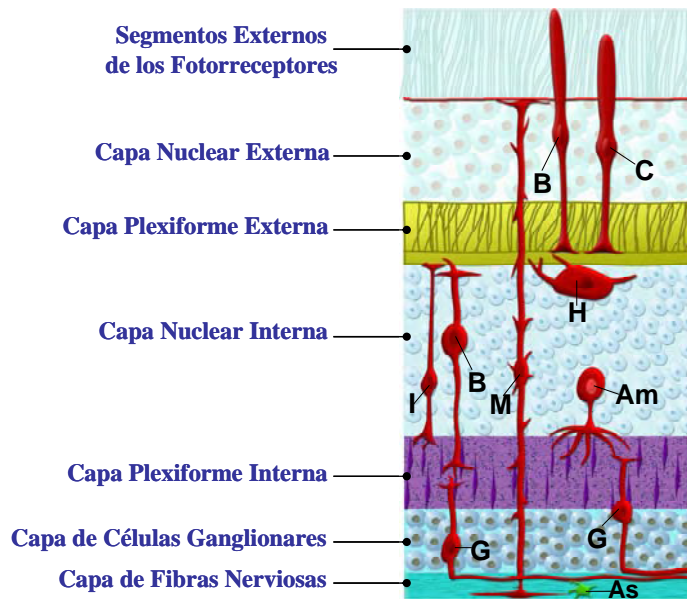


Figura 8. Distribución celular y capas de la retina. El esquema muestra la distribución de los diferentes tipos celulares que conforman las capas de la retina. De arriba hacia abajo, los fotorreceptores (B y C), las células horizontales (H), las células bipolares (B), las células de Müller (M), las células amacrinas (Am), las células ganglionares (G) y los astrocitos (As). Los nombres de las diferentes capas son: capa nuclear externa (ONL), plexiforme externa (OPL), nuclear interna (INL), plexiforme interna (IPL), la capa de células ganglionares (GCL) y capa de fibras nerviosas (NFL).

3.4. Vascularización retiniana normal

La retina de los mamíferos se nutre a partir de dos sistemas vasculares importantes que son los vasos sanguíneos de la retina interna y los vasos sanguíneos de la coroides. En algunos mamíferos como el conejo, la vascularización retiniana es del tipo merangiótica o de vascularización parcial. En este caso el principal aporte de nutrientes a la retina lo aporta la coroides ya que los vasos sanguíneos de la retina ocupan una pequeña área, inclusive algunos de estos vasos presentan una disposición epirretiniana, es decir, están localizados dentro del humor vítreo (Schnitzer, 1986, Triviño et al., 1997). En el caso de mamíferos tales como el ratón, la rata y el humano con una vascularización retiniana *holoangiótica* o de vascularización total, el aporte de nutrientes a la retina lo proporcionan ambos lechos capilares, es decir, los vasos de la retina interna y los de la coroides (Triviño et al., 1997, Campochiaro, 2000). Los vasos sanguíneos

de la retina interna se encuentran distribuidos desde el disco óptico hasta la periferia retiniana, con una profundidad a nivel de los dos primeros tercios de las capas celulares internas y reciben aproximadamente un 20-30% del flujo sanguíneo total de la retina, mientras que los vasos de la coroides reciben un flujo sanguíneo del 65-85% y son vitales para la manutención de las capas externas de la retina (particularmente los fotorreceptores) que son avasculares (Adamis, 1999, Campochiaro, 2000).

3.5. Trastornos oculares asociados a neovascularización retiniana

Bajo ciertas condiciones ambientales y patológicas, el flujo sanguíneo de la retina puede alterarse y producir dos tipos patológicos de neovascularización ocular: la neovascularización coroidal que corresponde al padecimiento denominado como degeneración macular asociada con la edad (AMD) donde los vasos sanguíneos provenientes de la coroides penetran la membrana de Bruch (capa interna transparente y muy fina de la coroides que está en contacto con el epitelio pigmentario), destruyendo el epitelio pigmentario de la retina y los fotorreceptores (Campochiaro, 2000). Por su parte la neovascularización retiniana define a la retinopatía diabética y retinopatía del prematuro, donde los neovasos provenientes de las capas celulares internas de la retina invaden el humor vítreo que normalmente es avascular. El común denominador de las retinopatías vasoproliferativas, es la hipoxia tisular que es a su vez consecuencia de una reducción severa en la perfusión sanguínea ó isquemia (Patz, 1980). La hipoxia puede originarse por alteraciones en la concentración de oxígeno ambiental (retinopatía del prematuro) o de una reducción del flujo sanguíneo en la microcirculación de la retina (retinopatía diabética). En ambos casos la hipoxia resulta en la formación de nuevos vasos que invaden la retina y el humor vítreo. Los neovasos son muy permeables, generan edema y atraen células vecinas involucradas en la formación de tejido fibroso que con el tiempo puede ocasionar el desprendimiento de la retina y la pérdida total de la visión (Gopal et al., 2000).

3.6. Retinopatía del prematuro

La retinopatía del prematuro es uno de los principales problemas de salud en nuestro país. Se estima que el 66% de los infantes prematuros desarrolla retinopatía si su peso al nacer es menor a 1.25 kg y que este porcentaje es mayor (82%) en prematuros con pesos menores a 1 kg (Ferrone y Trese, 1999). Este padecimiento se presenta en niños prematuros como consecuencia de su exposición a niveles altos de oxígeno cuando son puestos dentro de la incubadora. La hiperoxia produce la oclusión y la regresión de vasos sanguíneos en la retina, de manera que el retorno al oxígeno ambiental y la disminución en el número de vasos sanguíneos retinianos genera hipoxia en la retina. La hipoxia retiniana estimula la angiogénesis y con ello el desarrollo del padecimiento (Campochiaro, 2000). La fotocoagulación temprana de neovasos controla la progresión de la retinopatía del prematuro, sin embargo este tratamiento no siempre es posible en los países subdesarrollados, donde la mayoría de estos niños pierden la visión (Gopal et al., 2000, Kent et al., 2000)

3.7. Retinopatía diabética

La retinopatía diabética es la principal causa de ceguera en personas entre los 20 y los 65 años de edad. La diabetes representa la tercera causa de muerte en México y afecta aproximadamente al 8.3% de la población adulta mexicana (Secretaría de Salud, 1999). Se considera que después de 20 años con diabetes, el 98% de los pacientes con diabetes tipo 1 y más del 60% de los pacientes con diabetes tipo 2 presenta algún tipo de retinopatía (Aiello et al., 1998). En los pacientes diabéticos, la hiperglicemia crónica produce un aumento en la pérdida de células asociadas al capilar (pericitos), estimula la permeabilidad vascular, y la oclusión capilar debido al engrosamiento de la matriz extracelular y al depósito de proteínas de origen plasmático (Cai y Boulton, 2002). En la retina, estas alteraciones ocasionan una reducción severa en la perfusión sanguínea (isquemia) y la consecuente hipoxia. Al igual que en la retinopatía del prematuro, la hipoxia promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos que se extienden en la retina e invaden y sangran en el humor vítreo, disminuyendo la visión. Además, los

neovasos pueden ocasionar el desprendimiento de la retina, y por ende, la ceguera (Cai y Boulton, 2002).

Las estrategias para prevenir y controlar la retinopatía diabética se basan en el control de los niveles circulantes de glucosa, la exploración anual oftalmológica completa (con dilatación pupilar y fluoroangiografía) y la fotocoagulación con láser en zonas discretas o extensas de la retina. Sin embargo, el monitoreo de la enfermedad como el tratamiento resultan ser onerosos para los pacientes. Además, el tratamiento con láser no siempre es aplicable, particularmente en pacientes con grados avanzados de retinopatía diabética no proliferativa donde el tratamiento con láser puede incrementar el riesgo de reducir por sí mismo la agudeza y el campo visual. Debido a esto, es deseable contar con herramientas adicionales capaces de pronosticar la progresión de la retinopatía diabética y con ello auxiliar en la decisión de aplicar o no el tratamiento con láser en la retina. El desarrollo de estrategias capaces de bloquear la formación de neovasos o de promover su involución podrían funcionar como alternativas para el tratamiento de la retinopatía diabética y de otras retinopatías vasoproliferativas.

3.8. Reguladores de la angiogénesis ocular

En las últimas décadas se han descrito factores estimuladores de la angiogénesis ocular. Entre los factores angiogénicos más importantes inducidos por hipoxia se encuentran el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor básico estimulante de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento insulínico tipo-1 (IGF-1) (Adamis et al., 1993, Aiello et al., 1994). Sin embargo, dado que el balance de la regulación de la angiogénesis ocular en condiciones normales se inclina hacia las acciones inhibitorias, es muy probable que la disfunción de las influencias antiangiogénicas contribuya a la patogenia de las retinopatías vasoproliferativas. Entre los factores antiangiogénicos oculares conocidos se encuentran el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), una glicoproteína de 50 kDa producida por el epitelio pigmentario de la retina, que es considerado como el principal inhibidor de la angiogénesis en córnea, vítreo y retina (Dawson et al., 1999, Stellmach et al., 2000). También, se han reportado factores con acciones anti-angiogénicas oculares que son fragmentos de proteínas

por sí mismas inactivas y que incluyen a la angiostatina, que es un fragmento interno de 36 kDa del plasminógeno (O'Reilly,1997); a la endostatina, fragmento C-terminal de la colágena tipo XVIII (Skovseth et al., 2004), a la trombospondina y a las vasoinhibinas (Adams et al., 2008, Clapp et al., 2006).

3.9. PRL, vasoinhibinas y angiogénesis ocular

En relación a la importancia de la hipoxia en la angiogénesis ocular, cabe señalar que la producción de vasoinhibinas podría estar regulada por hipoxia. En estudios recientes en la línea celular GH₄C1 de lactotrofos transformados, se observó que la hipoxia inhibe la expresión del RNA mensajero de PRL y su proteólisis hacia vasoinhibinas (Cosio et al., 2003).

Investigaciones recientes son consistentes con la posibilidad de que las PRLs endógenas participan en la inhibición natural de la angiogénesis a nivel ocular. La prolactina está presente en el humor acuoso humano (Pleyer et al, 1991), y tanto la PRL como las vasoinhibinas se pueden detectar en la retina de la rata (Aranda et al., 2005). La prolactina ocular puede provenir de la internalización de la hormona circulante, dado que se ha detectado prolactina radioactiva exógena, inyectada intracardialmente, en los cuerpos ciliares, la coroides y la retina (O'Steen y Sundberg, 1982). Sin embargo, la prolactina y las vasoinhibinas también se producen intraocularmente. El ARN mensajero de la prolactina se expresa en la retina (Aranda et al., 2005). Además, células endoteliales aisladas de la microcirculación de la retina expresan el ARN mensajero de la prolactina, y estas células secretan a la hormona al medio de cultivo (Ochoa et al., 2001).

En el ojo, las vasoinhibinas bloquean la angiogénesis previamente estimulada por factores angiogénicos. La administración local de vasoinhibinas reduce la angiogénesis de la córnea en respuesta al bFGF (Dueñas et al., 1999) y la transferencia génica de vasoinhibinas mediante un vector adenoviral reduce la neovascularización experimental inducida por hipoxia (Pan et al., 2004). Las vasoinhibinas también participan en el mantenimiento de la inhibición de la angiogénesis ocular bajo condiciones normales. La acción antiangiogénica de las vasoinhibinas endógenas se puso de manifiesto en experimentos donde se indujo

angiogénesis en la córnea (Dueñas et al., 1999) y en la retina (Aranda et al., 2005), mediante implantes conteniendo anticuerpos capaces de inmunosequestrar a las vaso-inhibinas. Además, la transfección intraocular de ARNs de interferencia capaces de bloquear la expresión local de prolactina resultó en un aumento en la angiogénesis y en la vasodilatación retiniana (Aranda et al., 2005).

ABSTRACT

Vasoproliferative retinopathies characterized by the formation of new blood vessels in the retina are the principal cause of blindness throughout the world. The vaso-inhibins, a family of peptides derived from the proteolysis of the hormone prolactin (PRL), are natural inhibitors of blood vessel growth and dilation in the retina. Here, we investigated if the generation of vaso-inhibins from PRL is altered in retinopathy of prematurity and diabetic retinopathy, and thereby influence the progression of these diseases. Our results show that the levels of PRL increase in the circulation and aqueous humor of patients with retinopathy of prematurity and that the PRL mRNA is expressed in the fibrovascular membranes of these patients where the protein is processed to vaso-inhibins. Moreover, we found that the subretinal fluid of patients with retinopathy of prematurity contains the enzymes capable to generate vaso-inhibins from PRL. Considering that in the majority of the patients with retinopathy of prematurity, the new blood vessels regress by apoptosis and that vaso-inhibins stimulate the apoptosis of the blood vessels, we proposed that these peptides promote the regression of neovessels in this disease. In support to this possibility we showed that immunoneutralization of ocular vaso-inhibins blocks the regression by apoptosis of the hyaloid system, an intraocular vascular system that regresses by apoptosis in the neonatal rat. We hypothesized that in retinopathy of prematurity, the vaso-inhibins are intraocularly generated by means of the proteolysis of PRL derived from systemic or local origin, and that such peptides contribute to the vascular regression of the neovessels, thereby counteracting the progression of the disease. While the study in retinopathy of prematurity patients was held months after ocular angiogenesis has subsided (infants were subjected to intraocular surgery between 0.6-3 years of age), work in diabetic patients allowed us to monitor the influence of PRL and vaso-inhibins at different stages of diabetic retinopathy. Serum PRL was higher in diabetic patients without diabetic retinopathy and in patients with non-proliferative diabetic retinopathy, and this increase disappeared in patients with proliferative diabetic retinopathy (the advanced stage of diabetic retinopathy). Intraocular levels of PRL and vaso-inhibins were associated with the systemic values of PRL in a model of hyperprolactinemic rats. Also, human vitreous contains matrix metalloproteases (MMPs) that generate vaso-inhibins from PRL and their activity was reduced in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. Accordingly, we propose that the reduction of systemic PRL in proliferative diabetic retinopathy may lead to a reduction of intraocular vaso-inhibins favouring retinal neovascularization in the advanced disease. Finally, we have localized the expression of the PRL and its receptor (PRL-R) in the retinas of rat and green monkeys (*Cercopithecus aethiops sabeus*). The expression of both proteins occurred in photoreceptors, Müller cells, ganglion cells and in astrocytes. Therefore, PRL may act locally to regulate the function of several retinal cell types. Altogether, the present findings establish the role of PRL and vaso-inhibins in the pathophysiology of vasoproliferative retinopathies and warrant further investigation.

RESUMEN

Las retinopatías vasoproliferativas caracterizadas por la formación de neovasos (angiogénesis) en la retina son la principal causa de ceguera en el mundo. Las vasoinhibinas son una familia de péptidos derivados de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL) que se producen en la retina e inhiben la angiogénesis. En este trabajo investigamos si la PRL circulante es fuente de vasoinhibinas intraoculares capaces de contrarrestar la progresión de la retinopatía del prematuro y la retinopatía diabética. Nuestros resultados muestran que los niveles de PRL en la circulación y en el humor acuoso de pacientes con retinopatía del prematuro están incrementados significativamente con respecto al grupo control. Además, encontramos que el RNA mensajero de la PRL se expresa en las membranas fibrovasculares de estos pacientes, donde además la PRL se procesa hacia vasoinhibinas. Asimismo, observamos que el líquido subretiniano de los pacientes con retinopatía del prematuro contiene las enzimas capaces de generar vasoinhibinas a partir de PRL. Considerando que en un gran porcentaje de pacientes con retinopatía del prematuro los neovasos involucionan por apoptosis y que las vasoinhibinas estimulan este proceso, sugerimos que las vasoinhibinas endógenas promueven la regresión de los neovasos en esta patología. En apoyo a esta posibilidad, mostramos que la inmunoneutralización de vasoinhibinas oculares bloqueó la regresión por apoptosis del sistema hialoideo, una red vascular intraocular que involuciona por apoptosis en la rata recién nacida. Estos resultados permiten proponer que en la retinopatía del prematuro las vasoinhibinas generadas intraocularmente, a partir de la proteólisis de PRL circulante o de PRL producida en la retina, interfirieron con la progresión de la enfermedad a través de inducir la regresión vascular. Cabe señalar que el estudio de los pacientes con retinopatía del prematuro tuvo lugar meses después de que la angiogénesis ocular dejó de ocurrir (los pacientes fueron sometidos a cirugía ocular entre los 6 meses y los 3 años de edad). En contraposición, trabajo realizado en pacientes diabéticos, nos permitió monitorear los niveles de PRL, y por ende, la generación de vasoinhibinas intraoculares, bajo diferentes estadios de la retinopatía diabética. En este estudio observamos que la concentración sérica de PRL fue significativamente mayor en hombres diabéticos sin retinopatía, o con retinopatía no proliferativa, que en aquellos con retinopatía proliferativa severa. Además, los niveles intraoculares de PRL y vasoinhibinas fueron mayores en un modelo de ratas hiperprolactinémicas. Asimismo, encontramos que el humor vítreo de la rata y de pacientes con retinopatía diabética contiene metaloproteasas de matriz (MMPs) que generan vasoinhibinas a partir de PRL y que su actividad se reduce en asociación a la progresión del padecimiento. Proponemos que la reducción de la PRL sistémica en la retinopatía diabética proliferativa trae consigo una disminución en las vasoinhibinas intraoculares que favorece la neovascularización retiniana. Finalmente, para investigar otras posibles acciones de la PRL en la retina, investigamos la localizamos de la expresión de la hormona y de su receptor (PRL-R) en la retina de la rata y del mono verde (*Cercopithecus aethiops sabeus*). La expresión de ambas proteínas se localizó en los fotorreceptores, células de Müller, células ganglionares y en astrocitos. Estos resultados sugieren que la PRL puede regular la función de varios tipos celulares en la retina. El presente trabajo

apoya la participación de la PRL y de las vasoinhibinas en la fisiopatología de las retinopatías vasoproliferativas y abre un campo fértil para futuras investigaciones.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la importancia de la angiogénesis tanto en procesos fisiológicos como patológicos, es necesario dedicarle un importante esfuerzo a la identificación, caracterización y cuantificación de factores químicos que intervienen en su regulación, con la esperanza de que aquellos agentes capaces de controlar el crecimiento vascular pudieran ser utilizados como una opción alternativa para el tratamiento de los padecimientos antes mencionados.

En este trabajo nos propusimos analizar si la PRL sistémica es fuente de vaso inhibinas oculares capaces de inhibir la angiogénesis ocular, y por lo tanto, si sus niveles se alteran en pacientes con retinopatía del prematuro o con retinopatía diabética. También estudiamos la posible contribución a estos padecimientos de la PRL sintetizada intraocularmente a través de determinar y localizar la expresión de su ARN mensajero en membranas fibrovasculares oculares y analizar la conversión de la PRL a vaso inhibinas mediante la detección de estas últimas y la evaluación de la actividad enzimática capaz de generarlas en los fluidos oculares de ambos padecimientos. Por último, utilizamos a la rata y al mono verde (*Cercopithecus aethiops sabeus*) como modelos para analizar la distribución celular de la expresión del ARN mensajero de la PRL, del receptor de PRL y de ambas proteínas en la retina.

III. HIPÓTESIS

La PRL y las vasoinhibinas participan en la fisiopatología de las retinopatías vasoproliferativas.

IV. OBJETIVOS

Determinar en pacientes con retinopatía del prematuro:

1. La concentración de PRL (ELISA) en el suero y en fluidos oculares (humor acuoso, líquido subretiniano) y compararla con los valores de niños control (sin neovascularización ocular).
2. La actividad enzimática capaz de generar vasoinhibinas a partir de PRL en fluidos oculares (humor acuoso, líquido subretiniano).
3. La expresión del ARN mensajero de PRL (RT-PCR e hibridación *in situ*) en las membranas fibrovasculares oculares.

En ratas recién nacidas:

4. Investigar si la inmunoneutralización de PRLs oculares modifica la regresión de la vasculatura fetal intraocular (vasos hialoideos).

Determinar en pacientes con retinopatía diabética:

5. La concentración de PRL (ELISA) en el suero de pacientes con diversos grados de evolución del padecimiento y compararla a los respectivos valores de pacientes control (sin neovascularización ocular).
6. La actividad enzimática capaz de generar vasoinhibinas a partir de PRL en el humor vítreo de estos pacientes.
7. La presencia de metaloproteasas de matriz en el humor vítreo de cadáveres y de pacientes con retinopatía diabética involucradas en el procesamiento de la PRL hacia vasoinhibinas.

En ratas adultas:

8. Investigar la presencia del receptor de PRL en el cuerpo ciliar como un posible mecanismo de internalización de la PRL.
9. Determinar si la hiperprolactinemia (2 implantes adenohipofisarios en la cápsula renal) induce un incremento de vasoinhibinas en el humor vítreo.

10. Y en el mono (*Cercopithecus aethiops sabeus*) investigar la localización celular (inmunohistoquímica) de la PRL y de su receptor en la retina.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

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

Retinopatía del prematuro: Las biopsias obtenidas pertenecieron a pacientes de ambos sexos, cuyas edades oscilaban entre 6 meses y 3 años de edad diagnosticados con retinopatía del prematuro grado 5, el grado más severo de esta patología, que se caracteriza por presentar un tejido fibroso muy vascularizado en la cámara del humor vítreo (membranas fibrovasculares) y cuyo tratamiento requiere de la intervención quirúrgica (Gopal et al., 2000). Como parte del tratamiento durante la cirugía ocular se requiere extraer el humor acuoso, la membrana fibrosa del vítreo y el líquido subretiniano. Este último definido como un dializado del humor vítreo que se acumula en el espacio entre la coroides y la retina, que si bien es un espacio virtual en el feto, en estos niños se vuelve real por el desprendimiento de la retina y la acumulación del fluido. Las biopsias de estos tejidos, así como las muestras de los fluidos oculares y el suero fueron congeladas inmediatamente. Como grupo testigo se utilizaron biopsias de pacientes con trastornos oculares no neovasculares (cataratas congénitas) sometidos a cirugía intraocular. En este grupo la edad de los pacientes osciló entre 1 y 6 años. Las biopsias obtenidas de estos pacientes fueron solamente humor acuoso y suero (no se forma el líquido subretiniano).

Retinopatía diabética: Se obtuvieron un total de 133 muestras de suero pertenecientes a hombres entre 40 y 70 años de edad con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo-1 y tipo-2 y duración del padecimiento mayor a 10 años (Tabla 1). Todos los pacientes estuvieron bajo una restricción dietética adecuada y bajo tratamiento con hipoglucemiantes orales o con insulina. En todos los pacientes se evaluó la presencia de trastornos sistémicos como hipertensión, insuficiencia renal o hepática, cardiopatías, hiperlipidemias y trastornos neurológicos. Fueron excluidos aquellos pacientes con niveles de creatinina

superiores a 1.3 mg/dl, y también los tratados con drogas capaces de alterar los niveles circulantes de PRL. Los resultados se compararon con los obtenidos bajo las mismas condiciones en un grupo de hombres sanos de edades similares. El diagnóstico clínico de los pacientes se realizó mediante exploración oftalmológica completa (con dilatación pupilar y fluoroangiografía), utilizando la clasificación internacional de la retinopatía diabética (Wilkinson et al., 2003). Brevemente, los diabéticos se categorizaron en tres grupos: diabéticos sin retinopatía (D), que corresponden a aquellos cuyas retinas no mostraron modificaciones vasculares ni anormalidades aparentes; diabéticos con retinopatía no proliferativa (RDNP), en donde no se observó angiogénesis en la retina, pero sí microaneurismas, hemorragias, exudados, anormalidades de los vasos intrarretinianos y rosarios venosos, cuya magnitud y extensión definió la subclasificación del grupo en leve, moderada y severa (Wilkinson et al., 2003). Finalmente, los diabéticos con retinopatía proliferativa (RDP), donde tiene lugar la proliferación de nuevos vasos sanguíneos y de tejido fibroso en la retina y, cuyo grado más avanzado (alto riesgo), se caracteriza porque los neovasos invaden el vítreo, producen hemorragias severas y pueden presentar desprendimiento de retina (Wilkinson et al., 2003). El humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa sometidos a cirugía fue extraído y congelado inmediatamente de la misma forma que los sueros a -70°C .

4.2. Prolactinas y anticuerpos. Las PRLs y los anticuerpos policlonales anti-PRL humana fueron obtenidos del Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis de los Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos de Norteamérica (NHPP-NIH, Bethesda, MD) y de GENZYME (Framingham, MA). Los anticuerpos policlonales anti-PRL de rata fueron generados en nuestro laboratorio y purificados de acuerdo al método descrito (Dueñas et al., 1999). Las vasoinhibinas utilizadas como preparación de referencia se generaron mediante la proteólisis enzimática de la PRL de rata con una fracción particular de glándula mamaria de rata seguido de filtración en gel y carbamidometilación de acuerdo al procedimiento publicado (Clapp, 1987).

4.3. Bioensayo. La bioactividad de la PRL en el suero y fluidos oculares de los pacientes con ROP se determinó usando el bioensayo de células Nb2 una línea

celular derivada de un linfoma murino cuya proliferación ocurre en función directa de la concentración de PRL y representa un bioensayo específico y sensible de esta hormona (Tanaka et al., 1980). Las células Nb2 son cultivadas en medio de mantenimiento (Medio DMEM, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 10 % de suero de caballo (HS), 1.0×10^{-4} M de 2-mercaptoetanol y antibióticos). Veinticuatro horas antes del ensayo las células Nb2 fueron colocadas en medio estacionario (DMEM suplementado con 0.1 % FBS, 10 % de HS, 1.0×10^{-4} M de 2-mercaptoetanol y antibióticos) para sincronizar los ciclos de división celular. 1.5×10^3 células/pozo fueron sembradas en placas de cultivo de 96 pozos y llevadas a un volumen final de 100 μ l con medio de bioensayo (DMEM libre de FBS y suplementado con 10 % de HS, 1.0×10^{-4} M de 2-mercaptoetanol y antibióticos). Concentraciones crecientes de PRL fueron adicionadas por triplicado para obtener una curva dosis-respuesta contra la cual comparar las respuestas proliferativas a distintas diluciones de las muestras problema. La especificidad del efecto se evaluó a través de su bloqueo con anticuerpos anti-PRL humana. La placa fue incubada por 72 horas a 37 °C (Tanaka et al., 1980). La proliferación celular se midió a través de un ensayo colorimétrico basado en la reducción mitocondrial de sales de tetrazolium MTT (3-(4,5 dimetiliazol-2-yl)- 2,5 difenil bromuro de tetrazolium) a cristales de formazan (color azul oscuro). El producto colorido fue leído en un espectrofotómetro a 595 nm y la absorbancia resultante fue directamente proporcional al número de células presentes en cada pozo (Mosmann, 1983). La proliferación de las células Nb2 fue lineal en el rango de 0.05 a 1 ng/mL de PRL .

4.4. Hibridación in situ. Sondas sentido y anti-sentido del ARN mensajero de PRL fueron transcritas *in vitro* de un plásmido linearizado (pcDNA3, invitrogen, Carlsbad, CA) conteniendo el cDNA para PRL humana con las polimerasas T7 y SP6 y marcado con Digoxigenina-UTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Las sondas sentido y anti-sentido del ARN mensajero del PRL-R marcadas con digoxigenina fueron sintetizadas de un plásmido linearizado conteniendo el cDNA del PRL-R de rata. Las membranas fibrovasculares fueron fijadas en 4 % de paraformaldehído lavadas en PBS e incluidas en Tissue-tek (Leica, Instruments, Neussloch, Germany). Las retinas aisladas

fueron fijadas por 24 horas en 4 % de paraformaldehído, incubadas por 24 horas en 10 % de sacarosa-PBS libre de RNAsas y luego por 3 días en 30 % de sacarosa-PBS y posteriormente fueron embebidas en Tissue-tek. Ambos tejidos fueron seccionados (12µm) y montados en laminillas (Superfrost/Plus; A. Daigger & Co., Veron Hills, IL). Las secciones fueron secadas por 15 min a 60 °C, fijadas con 4% de paraformaldehído por 10-15 min en PBS y lavadas en PBT (PBS+0.1% Tween 20). Secciones fueron incubadas en una mezcla 1:1 de PBT y solución de hibridación (5x SSC (saline-sodium citrate), 0.1% Tween 20, 50 % formamida desionizada, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón sonificado) y prehibridados en solución de hibridación por 1 hora a 55 °C. Las sondas fueron desnaturalizadas en solución de hibridación lo cual permitió hibridarlas al tejido durante toda la noche a 55 °C. Las laminillas fueron lavadas a 60 °C con solución de hibridación y posteriormente con PBT. Estas fueron incubadas por 2 horas con un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (Roche, Basel, Switzerland) y lavadas en PBT. La señal fue detectada usando azul de tetrazolium y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (Roche, Basel, Switzerland) como substrato en amortiguador alcalino (Dueñas et al., 2004, Aranda et al., 2005)

4.5. Inmunoprecipitación-Western blot. El líquido subretiniano, como el humor vítreo de humano y de la rata fueron inmunoprecipitados (300 µl) usando 2.5 µg/ml de anti-PRL humana y/o anti-PRL de rata. Para valorar el receptor de PRL en la retina de rata, un grupo de 20 retinas fueron homogenizadas en amortiguador de lisis (0.5 % de Nonidet P-40, 0.1 % SDS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 µg/ml fluoruro de fenilmetilsulfonil, pH 7) e inmunoprecipitados con 2.5 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-PRL-R (U-5) donado por P.A. Kelly, usando la técnica previamente reportada (Corbacho et al., 2000). El anticuerpo U5 es dirigido contra un epítipo localizado fuera del dominio de unión del receptor de PRL (Okamura et al., 1989). Los inmunoprecipitados fueron evaluados por SDS-PAGE condiciones reductoras en un gel de acrilamida al 12%. Transferidos a un papel de nitrocelulosa y evaluados con un antisuero anti-PRL humana o anti-PRL de rata diluido 1:500 ó con 1 µg/ml de un anticuerpo monoclonal anti-receptor de PRL. En todos los casos el complejo antígeno-anticuerpo fue detectado usando un anticuerpo secundario acoplado

a fosfatasa alcalina de un estuche comercial (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA). Los valores de densidad óptica se determinaron usando un analizador de imágenes versión 3.5 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY).

4.6. Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El RNA total de las membranas fibrovasculares de los pacientes con retinopatía del prematuro se aisló y procesó para RT-PCR conforme a lo descrito por Clapp y colaboradores (Clapp et al., 1994). Dos cebadores complementarios al cDNA de PRL humana fueron utilizados. El primero río arriba del exón 2 (5'-GATGCCAGGTGACCCTTCGAGA-3') y el segundo río abajo del exón 5 (5'-GCAGTTGTTGTTGTGGATGATT-3'). El producto del RT-PCR fue confirmado por análisis de Southern blot. En el caso de la rata el RNA total de la retina fue extraído y cuantificado. Cinco microgramos de la muestra fueron retrotranscritos en un volumen de reacción de 25 μ l usando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia de ratón Maloney (Promega, Madison, WI). Alícuotas de 2 μ l fueron usadas para amplificación del cDNA por PCR usando oligonucleotidos específicos para todas las formas del PRL-R (Sonda sentido A, CCC CAA CTC CTG CTT CTT TAG, y sonda antisentido B, TAT TTT TGG CCC AGG AAC TA), u oligonucleotidos específicos para la forma corta (Sonda sentido C, ATC CTG GGA CAG ATG GAG GAC, y sonda antisentido D, TTG CTG AGG CTG ACA AAA GAG), o para la forma larga (Sonda sentido E, CCA GGA GAG TTC CGT TGA AA y sonda antisentido F, AGA CAG TGG GGC TTT TCT CCT). En todos los casos, la amplificación fue por 40 ciclos. Para las sondas A-B el ciclo fue como sigue: 30s a 94 °C, 45s a 56 °C, y 45s a 72 °C; para sondas C-D y E-F, los ciclos fueron: 30s a 94 °C, 45s a 56 °C y 60s a 72 °C. Los productos resultantes de las reacciones con las sondas A-B, C-D y E-F fueron 582 pares de bases (pb), 1017 pb y 833 pb, respectivamente.

4.7. Inyección intravitreal. Ratas Wistar de 10 días de edad fueron anestesiadas intraperitonealmente con pentobarbital (20 ng por gramo de peso corporal). Un grupo de ratas fueron inyectados intravitrealmente con 2 μ l (2 μ g) de IgG's puras anti-PRL, otro grupo con 2 μ l (2 μ g) de anticuerpos control (purificados del suero normal) y un último grupo con 2 μ l del vehículo (PBS).

Tres días después, los ojos fueron enucleados y el tejido hialoideo removido para ser analizado.

4.8. Determinación de la apoptosis. La apoptosis del endotelio vascular se evaluó a través de la detección de DNA fragmentado usando las siguientes técnicas:

Ensayo de TUNEL. Las membranas fibrovasculares de pacientes con ROP y el tejido hialoideo de las ratas recién nacidas fue fijado con 4% de paraformaldehído en PBS, pH 7.4 por 10 minutos y 20 minutos, respectivamente. Subsecuentemente, los tejidos se lavaron en PBS, se embebieron en Tissue-Tek, y se cortaron en secciones de 10 μm , para finalmente evaluar apoptosis utilizando la reacción de TUNEL de acuerdo al estuche de Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Este método detecta células apoptóticas mediante el uso de la deoxinucleotidiltransferasa que pega nucleótidos marcados con fluorescencia (UTPs) al DNA fragmentado. Los cortes se analizan en un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX60, Lake Success NY).

Ensayo de ELISA. Se utilizó el ELISA que cuantifica el DNA nucleosomal fragmentado de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN).

4.9. Elisa para medir PRL humana. Las muestras de sangre periférica se tomaron durante la mañana, estando los pacientes en ayuno y antes de cualquier tratamiento. El suero se congeló en alícuotas que se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. En aquellos pacientes con retinopatía diabética proliferativa, sometidos a vitrectomía por el método de perfusión con perfluorocarbono (Quiroz-Mercado et al., 2004), se tomaron muestras no diluidas de humor vítreo, que también se almacenaron bajo congelación ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$). Los niveles séricos de PRL se determinaron utilizando un ensayo inmunoenzimático (ELISA) comercial (Genzyme Diagnostics, San Carlos, CA).

4.10. Animales. Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar (200-250 g) anestesiadas con 70% de ketamina/30% de xilacina (1 $\mu\text{l/g}$ de peso corporal

i.p.). El cuidado y tratamiento de los animales se sujetó a las normas establecidas por la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) en el código "Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research."

4.11. Inducción de la hiperprolactinemia. Dos hipófisis anteriores (AH) obtenidas de hembras, fueron implantadas bajo la cápsula renal de un macho de acuerdo al método descrito anteriormente (Adler, 1986). Brevemente, se realizó una incisión en la parte dorsal de ratas anestesiadas, se expuso el riñón y se practicó una abertura de 2 mm en la parte media de la cápsula renal haciendo una forma de pequeño saco donde se insertaron las dos hipófisis. Después de 15 días post-operación, cuando se alcanza un aumento significativo en la concentración de prolactina en el suero (Fig. 19A), las ratas fueron sacrificadas y el suero y el humor vítreo colectados y analizados.

4.12. ELISA para medir prolactina de rata. El ELISA fue estandarizado como se describe anteriormente (Dueñas et al., 1999). Brevemente, los pozos fueron cubiertos con 10 ng de PRL. Concomitantemente, diferentes concentraciones de la PRL y de las muestras de suero fueron incubadas con el anticuerpo policlonal anti-PRL de rata (1:3000) por 16 horas a 4 °C y eventualmente colocadas en los pozos cubiertos con PRL. Subsecuentemente un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (Vector Laboratories, Burlingame, CA) se añadió a una dilución de 1:3000 y fue revelado con una solución de 2 mg de 1,2-ortofenilendiamina (Accurate Chem, Westbury, N.Y) diluida en 0.1 M buffer de citratos (pH 5.0) y 0.1 % de peróxido de hidrógeno (J.T. Baker, México). La reacción colorida se detuvo con una solución de 4 N de ácido sulfúrico y los pozos se leyeron en un espectrofotómetro (Bio-Rad, Hercules CA) a una densidad óptica de 490 nm. El límite de detección del ensayo fue de 1 ng/ml. El coeficiente de variación intra-ensayo e inter-ensayo fue de 5% y 7 %, respectivamente.

4.13. Inmunohistoquímica en parafina. Las ratas fueron sacrificadas y los ojos extraídos, fijados en 10% formalina y embebidos en parafina. Secciones sagitales de 12 µm fueron desparafinadas, rehidratadas, y procesadas para

inmunohistoquímica, de acuerdo al método reportado (Zermeño et al., 2006). Brevemente, las secciones fueron incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos en 1% H₂O₂, por una hora en un amortiguador de bloqueo [0.1% Triton-X-100, 1% albúmina de suero bovino, 1% suero normal de cabra en amortiguador de fosfatos y salina (PBS)], y a 4 °C durante toda la noche con una dilución 1:100 del anticuerpo monoclonal U-5 dirigido contra el receptor de PRL (donado por el Dr. Paul A. Nelly, INSERM U-584, Paris, Francia). La inmunorreacción fue revelada utilizando el complejo avidina-biotina-peroxidasa de un estuche comercial (Vector Laboratories, Berlingame, CA).

4.14. Análisis de la actividad enzimática que genera vaso-inhibinas a partir de PRL. 10µl de líquido subretiniano (diluido 1:5 en agua) obtenido de pacientes con ROP se combinó con 10 µl del estándar de PRL (20 ng por µl de 0.1 M de Tris, pH 7.0) y con 20 µl de amortiguador de reacción (0.1M Fosfato de Citrato, 0.15 M de NaCl, pH 5.0) y la mezcla se incubó por 24 horas a 37 °C. Los productos del corte de PRL se evaluaron mediante geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y Western blot bajo condiciones reductoras. La actividad de las proteasas de PRL también se evaluó en el humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa y en cadáveres sin enfermedades oculares vasculares aparentes como controles. En este caso, 100 ng de PRL en 10 µl de amortiguador (0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.01M CaCl₂, pH 7) se incubaron con 10 µl de humor vítreo por 72 horas a 37 °C.

4.15. Western blot. Las muestras se sometieron a ebullición en solución amortiguada reducida de Laemmli, se procesaron por SDS-PAGE al 12% y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa. Estas membranas se incubaron en una solución 1:500 de los anticuerpos anti-PRL (humana o de rata) o de los anticuerpos monoclonales anti-PRL INN-1 (dirigido contra el extremo amino-terminal de la PRL) o INN-368 (dirigido contra el extremo C-terminal de la PRL). Los anticuerpos monoclonales fueron donados por Peter Berger (Austrian Academy of Science, Innsbruck, Austria). Para la detección de las MMPs se usaron geles de acrilamida al 7.5 % y anticuerpos de cabra anti-MMP-13 y MMP-8 (Santa Cruz, CA, USA) ó de conejo anti-MMP-2, MMP-3 y

MMP-9 (Sigma, St Louis, MO, USA). El complejo antígeno-anticuerpo se reveló usando anticuerpos secundarios (1:5000) anti-conejo, anti-ratón ó anti-cabra acoplados a fosfatasa alcalina y usando la reacción de un estuche comercial (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). La obtención y caracterización de los anticuerpos policlonales y monoclonales anti-PRL fue previamente descrita (Dueñas et al., 1999, Aranda et al., 2005).

4.16. Aislamiento de retinas. Se emplearon ratas macho Wistar de 200-250 g de peso corporal, sacrificadas por inhalación de CO₂ y decapitación. Las retinas fueron disecadas y fijadas en 4% de paraformaldehido por 1 hora y colocadas secuencialmente en PBS conteniendo 20% y 30 % de sacarosa durante 24 horas en cada caso. Monos verdes (*Cercopithecus aethiops sabeus*) entre 4 y 6 años de edad obtenidos de la isla de St. Kitts (West Indies) fueron anestesiados con ketamina hidrociorada y subsecuentemente sacrificados mediante una dosis letal de pentobarbital sódico. Las retinas de los monos fueron fijadas en 4% de paraformaldehido por 24 horas a 4 °C y posteriormente fueron colocadas durante 5 días en 20% y 30% de sacarosa, respectivamente. Los tejidos fueron congelados (Tissue-tek; Sakura Finetek, Torrance, CA), y cortados en un criostato (Leica CM 1850, Bannockburn, Illinois, USA) en secciones con un grosor de 12 µm que fueron montadas en laminillas previamente gelatinizadas.

4.17. Inmunohistoquímica en criosecciones. Las secciones de retina fueron bloqueadas en PBS conteniendo 1% de albumina de suero bovino (BSA), 1% de suero normal de cabra (NGS), y 0.01 % tritón-X-100 por 1 hora e incubadas toda la noche a 4 °C con una dilución 1:500 de anticuerpo policlonal anti-PRL (IC-5; National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA) o con una dilución 1:100 de anticuerpo monoclonal anti-PRL (INN-1 mAb). Doble inmunofluorescencia fue realizada con ambos anticuerpos anti-PRL y anticuerpos dirigidos contra proteínas específicas de algunos tipos celulares de la retina: células de Müller [anti-sintetasa de glutamina; mAb (GS), dilución 1:100; Chemicon International, Inc., Temecula, CA], astrocitos [anti-proteína glial fibrilar ácida pAb (GFAP), dilución 1:500; Dako, Carpintería CA], y neuronas [anti-proteína neuronal nuclear mAb (NeuN), dilución 1:100,

Chemicon International Inc, Temecula CA]. Las retinas del mono fueron marcadas con un antisuero anti-PRL humana (1:500) obtenido y caracterizado previamente (Dueñas et al., 2004) o con un anticuerpo monoclonal anti-receptor de PRL humana mAb (5µg/ml; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA). Después de la incubación con el anticuerpo primario, las muestras fueron lavadas 3 veces en PBS y marcadas por 2 horas con anticuerpos secundarios Alexa-594 anti-conejo ó anti-ratón y Alexa-488 anti-conejo ó anti-ratón levantados en cabra y obtenidos de Molecular Probes (Eugene, OR) y usados a una dilución de 1:1000 (anti-conejo) y 1:500 (anti-ratón), respectivamente. Para investigar la localización del receptor de la PRL (PRL-R) en la retina de la rata, los ojos fueron fijados en 10 % de formalina por 48 horas y embebidos en parafina. Secciones sagitales de 12 µm fueron desparafinados, hidratados, bloqueados e incubados toda la noche con 10 µg/ml de un anticuerpo monoclonal anti-receptor de PRL (T6) el cual interacciona con o cerca del dominio de unión al ligando del PRL-R (Okamura et al., 1989) y fue donado por P.A. Kelly (INSERM U-584, París, Francia). La reacción del anticuerpo primario fue detectada usando un kit que contiene el complejo Avidina-Biotina (Vectastain, ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Para las secciones control, la incubación con el anticuerpo primario fue omitido. Las retinas marcadas fueron examinadas bajo un microscopio de epifluorescencia (BX60; Olympus, Lake Success. NY), equipado con un sistema de análisis de imagen digital (Image Pro-plus: Media Cybernetics, Silver Spring, MD) o con un microscopio confocal (NYKON, PCM200, Melvilla, NY). Las fotografías fueron tomadas cercanas a la cabeza del nervio óptico y las imágenes fueron preparadas usando Adobe Photoshop 11.

VI. RESULTADOS

Con el propósito de valorar la posible participación de la PRL y de las vasoinhibinas en la fisiopatología de las retinopatías vasoproliferativas, iniciamos nuestro estudio valorando los niveles circulantes de estos péptidos en pacientes con retinopatía del prematuro.

5. PRL, VASOINHIBINAS Y RETINOPATÍA DEL PREMATURO.

5.1. Concentración de PRL en fluidos oculares y suero de pacientes con retinopatía del prematuro. Las muestras analizadas en este trabajo fueron de un total de 48 pacientes (21 niños y 27 niñas) con retinopatía del prematuro grado 5, el grado más severo de la enfermedad. Determinamos las concentraciones de PRL en el humor acuoso (4.8 ± 1.1 ng/ml), líquido subretiniano (23.3 ± 1.9 ng/ml) y suero (43.0 ± 5.6 ng/ml) de estos pacientes mediante ELISA (Fig. 9A). La concentración de la hormona se determinó en las mismas muestras de un subgrupo de pacientes con retinopatía del prematuro, tanto por ELISA como por el bioensayo específico para PRL de las células Nb2. Ambos métodos midieron niveles de PRL equivalentes (Fig. 9B). Una vez que determinamos que la PRL está presente en los fluidos oculares de pacientes con retinopatía del prematuro quisimos analizar si sus niveles se asocian con este padecimiento.

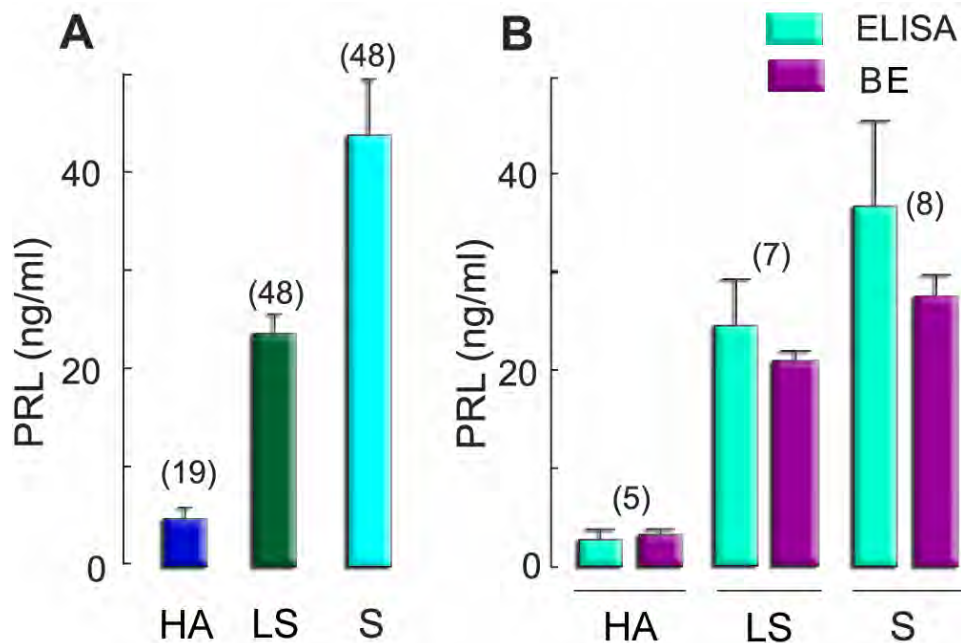


Figura 9. Concentración de PRL en el humor acuoso (HA), líquido subretiniano (LS) y suero (S) de pacientes con retinopatía del prematuro determinado por ELISA (A). Concentración de PRL en pacientes con retinopatía del prematuro determinada en las mismas muestras por ELISA y por el bioensayo de células Nb2 (BE) (B). El número de pacientes analizado en cada grupo está indicado en el paréntesis. Las barras muestran el promedio \pm el error estándar.

5.2. La concentración de PRL aumenta en pacientes con retinopatía del prematuro. Los niveles de PRL en el humor acuoso y suero de los pacientes con retinopatía del prematuro, fueron comparados con los niveles medidos en ambos fluidos de pacientes (6 niñas y 12 niñas) con un padecimiento ocular no-neovascular (catarata congénita). La concentración de PRL tanto en el humor acuoso como en el suero fueron significativamente más altos en los pacientes con retinopatía del prematuro que el grupo control con cataratas congénitas (Fig. 10). El líquido subretiniano no se incluye en estas comparaciones dado que en los pacientes control no existe desprendimiento de retina, por lo tanto, no se forma líquido subretiniano. A continuación se quiso investigar si la PRL ocular pudiera provenir de la PRL sistémica, para lo cual se compararon los niveles de esta hormona en los fluidos oculares y en el suero de los mismos individuos.

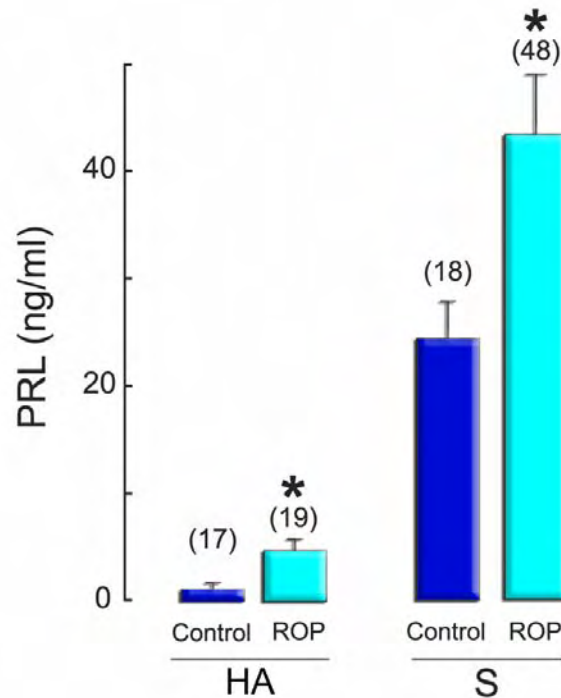


Figura 10. Niveles de PRL en el humor acuoso (HA) y suero (S) de pacientes con catarata congénita (control) y retinopatía del prematuro (ROP) medidos por ELISA. El número de pacientes analizado en cada grupo está indicado en paréntesis. Las barras muestran la media \pm el error estándar.

5.3. No se observó correlación significativa entre la concentraciones de PRL ocular y sistémica. No se encontró correlación positiva entre la concentración de PRL presente en el humor acuoso y la presente en el suero ($r=0.0103$, $p<0.96$); o entre la PRL del líquido subretiniano y el suero ($r=0.0993$, $p<0.53$). Sin embargo, la concentración de PRL en el humor acuoso tuvo una correlación significativa con la PRL presente en líquido subretiniano ($r=0.6791$, $p<0.01$) (Fig. 11).

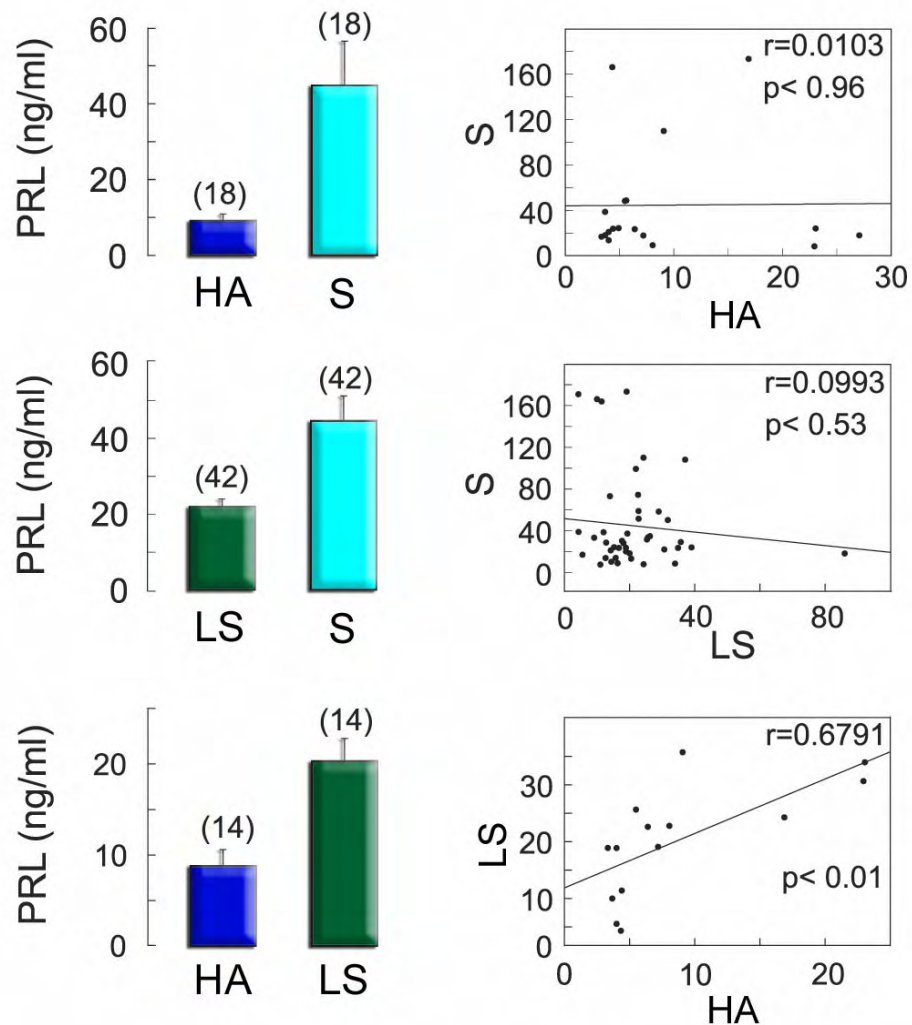


Figura 11. Ausencia de correlación entre los niveles de PRL en el suero (S) y los niveles de PRL en el humor acuoso (HA) o en el líquido subretiniano (LS), y correlación positiva entre los niveles de PRL en el HA y los niveles de PRL en el LS en pacientes con retinopatía del prematuro. Las determinaciones fueron hechas por ELISA. El número de pacientes analizados en cada grupo está indicado en paréntesis. Las barras muestran la media \pm el error estándar de los grupos respectivos donde los valores fueron correlacionados. r = coeficiente de correlación y P = el valor de significancia.

5.4. Proteólisis intraocular de la PRL. Procedimos a investigar si en los pacientes con ROP están presentes las vasoinhibinas y las enzimas capaces de generarlas. La valoración por Western-blot de membranas fibrovasculares de pacientes con retinopatía del prematuro revelaron la presencia de una PRL inmunorreactiva de 16kDa (Fig. 12A). Además, en los pacientes con retinopatía del prematuro se observó que tanto el líquido subretiniano como el suero contienen PRLs inmunorreactivas de 23 y 16 kDa, las masas moleculares de la PRL y de vasoinhibinas (Fig. 12B). Cuando se comparó el líquido subretiniano y el suero del mismo paciente, fue claro que la concentración de las vasoinhibinas fue mayor en el líquido subretiniano que en el suero (Fig. 12B). La proporción de vasoinhibinas con respecto a la PRL fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el líquido subretiniano que en el suero del mismo paciente (1.0 ± 0.2 vs 0.3 ± 0.08 , respectivamente). Esta diferencia podría resultar de la proteólisis local de PRL de origen sistémico una vez en contacto con los fluidos oculares (líquido subretiniano). Para determinar si la actividad proteolítica responsable de la generación de las vasoinhibinas está presente en este fluido ocular, PRL exógena (200 ng) fue incubada con 2 μ L de líquido subretiniano y la proteólisis de PRL fue evaluada por Western blot (Fig. 12C). Cabe señalar que la concentración de PRL endógena presente en 2 μ L de líquido subretiniano es muy pequeña para poder ser detectada por Western blot (Fig. 12C). La incubación de la PRL exógena con el líquido subretiniano resultó en su conversión parcial a vasoinhibinas (Fig. 12C). La generación de las vasoinhibinas se atribuye a la acción de proteasas presentes en el líquido subretiniano, debido a que no se observaron vasoinhibinas en ausencia de líquido subretiniano o cuando el líquido subretiniano fue inactivado con calor (Fig. 12C).

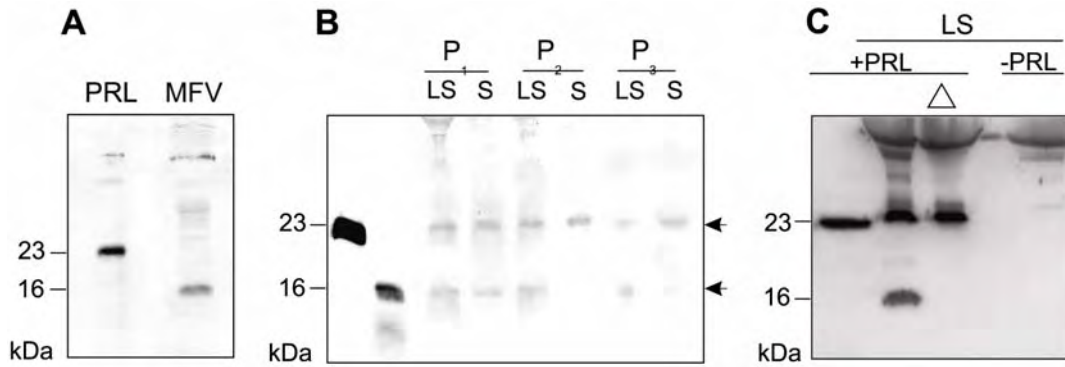


Figura 12. (A) Análisis por Western blot de PRL inmunorreactiva en lisados de membranas fibrovasculares (MFV) de pacientes con retinopatía del prematuro y de una preparación estándar de PRL humana (PRL). **(B)** Muestras de líquido subretiniano (LS) y suero (S) de tres pacientes diferentes con retinopatía del prematuro fueron inmunoprecipitadas y procesadas mediante Western blots e indican la presencia de PRLs inmunorreactivas de 23 y 16kDa (flechas). Los dos primeros carriles del gel muestran preparaciones estándar de PRL y vasoinhibinas. **(C)** Análisis por Western blot de productos generados de la proteólisis de la PRL después de incubar un estándar de PRL humana en ausencia (carril 1) o presencia de líquido subretiniano (SF) antes (carril 2) y después de su inactivación con calor (Δ) durante 30 min a 85 °C (carril 3). El líquido subretiniano fue incubado en ausencia de PRL (carril 4). Los blots son representativos de tres experimentos independientes.

5.5. Síntesis de PRL en las membranas fibrovasculares oculares de pacientes con ROP. A continuación se quiso investigar si las vasoinhibinas pudieran derivar de PRL sintetizada intraocularmente en los pacientes con retinopatía del prematuro. Para esto se determinó la expresión del ARN mensajero de PRL en las membranas fibrovasculares de estos pacientes. Así, se encontró que en este tejido la RT-PCR amplificó un transcrito de 348 pb (Fig 13A, carril 3) que es el tamaño esperado para el ARN mensajero de PRL ya que fue similar al tamaño del producto amplificado a partir del cDNA de PRL (Fig 13A, Carril 1). Adicionalmente, mediante hibridación *in situ* se observó la expresión del ARN mensajero de la PRL y su localización en los vasos sanguíneos y en los leucocitos infiltrados de las membranas fibrovasculares de pacientes con retinopatía del prematuro (Figs 13B y D).

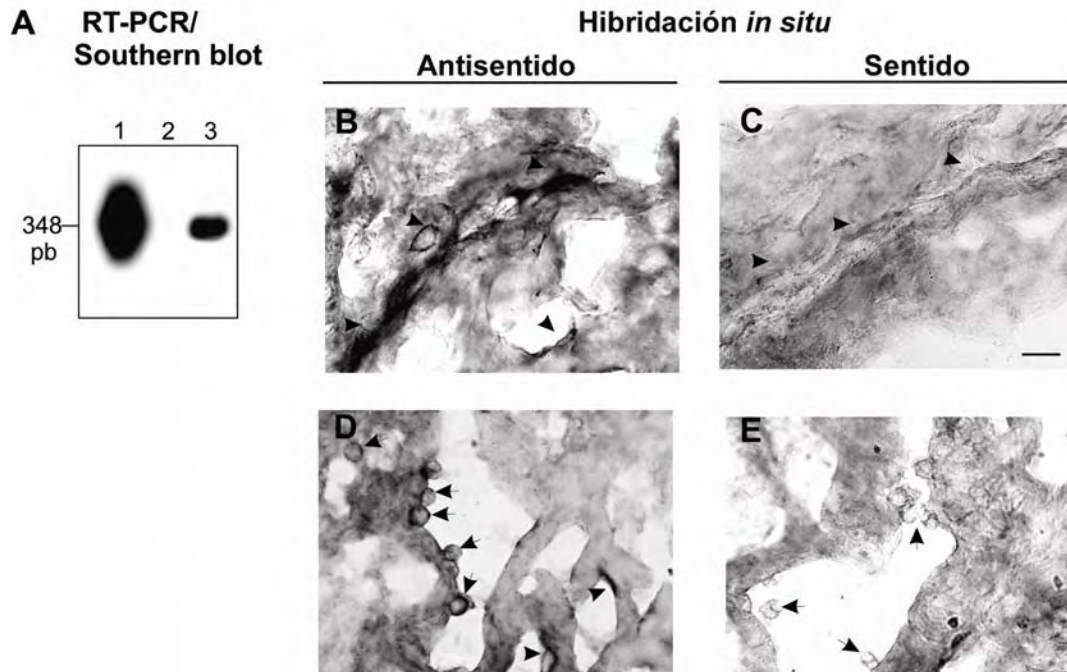


Figura 13. Expresión del ARN mensajero de PRL en las membranas fibrovasculares oculares de pacientes con retinopatía del prematuro (ROP). **(A)** Southern blot del transcrito amplificado (RT-PCR) a partir de ARN aislado de las membranas fibrovasculares (Carril 3). La amplificación del cDNA de PRL fue usada como control positivo (Carril 1), y la omisión de la transcriptasa reversa en la reacción se utilizó como control negativo (Carril 2). El ARN mensajero de PRL fue detectado por hibridación *in situ* con una sonda antisentido **(B y D)** o sentido **(C y E)** en membranas fibrovasculares de pacientes con retinopatía del prematuro. Se indica reacción positiva en vasos sanguíneos (cabeza de flecha) y en leucocitos (flechas). Escala de la barra = 50µm.

5.6. Apoptosis en membranas fibrovasculares del vítreo. La técnica de TUNEL mostró la presencia de varias células positivas asociadas a los vasos sanguíneos en las membranas fibrovasculares oculares de pacientes con retinopatía del prematuro (Figs. 14A, B, y C).

Los hallazgos muestran que las vasoinhibinas están presentes en los fluidos oculares y en las membranas fibrovasculares de pacientes con retinopatía del prematuro y que éstas pueden derivar de la proteólisis de la PRL de origen sistémico o local. La pregunta relevante es ¿cuál podría ser la función de dichas vasoinhibinas en el ojo de los pacientes con retinopatía del prematuro ?

Se propone que una posible acción de las vasoinhibinas es la de promover la regresión por apoptosis de los neovasos en retinopatía del prematuro. Esto en base a que **(a)**, en una proporción importante de los pacientes con retinopatía del prematuro (~60%) los neovasos involucionan espontáneamente por apoptosis (Eller et al., 1987); y **(b)**, las vasoinhibinas promueven la apoptosis de las células endoteliales (Martini et al., 2000).

5.7. Anticuerpos anti-PRL previenen la apoptosis de los vasos hialoideos en las ratas recién nacidas.

En apoyo a la regresión por apoptosis de los neovasos en la retinopatía del prematuro, se observó la presencia de células vasculares positivas a TUNEL en las membranas fibrovasculares de estos pacientes (Fig. 14 A, B, C). Para investigar si vasoinhibinas intraoculares pudieran promover la apoptosis de los vasos sanguíneos en las membranas fibrovasculares del vítreo de pacientes con retinopatía del prematuro, inyectamos intravítrealmente anticuerpos anti-PRL en ratas recién nacidas y evaluamos su efecto sobre la apoptosis del sistema vascular hialoideo. El sistema hialoideo es una red de vasos intraoculares presentes durante el desarrollo. En humanos, este tejido sufre involución por apoptosis normalmente antes del nacimiento, sin embargo, en las ratas la regresión de estos vasos se presenta entre los días 10-20 después del nacimiento (Taniguchi et al., 1999). De forma consistente a esta información, a los 13 días postparto el tejido hialoideo de las ratas control (inyectadas con anticuerpos controles) mostró numerosas células positivas al ensayo de TUNEL en los vasos sanguíneos (Figs. 14D y 14E). En contraste, muy pocas células positivas en el ensayo de TUNEL fueron detectadas en el tejido hialoideo de los ojos inyectados con anticuerpos anti-PRL (Figs. 14F y 14E). Las diferencias fueron significativas cuando se cuantificó el número de células vasculares en apoptosis de ojos inyectados con anticuerpos control y anticuerpos anti-PRL de tres experimentos independientes (Fig 15A). De forma similar, la cuantificación de apoptosis mediante ELISA mostró que los anticuerpos anti-PRL reducen significativamente ($p < 0.01$) la apoptosis del tejido hialoideo (Fig. 15B).

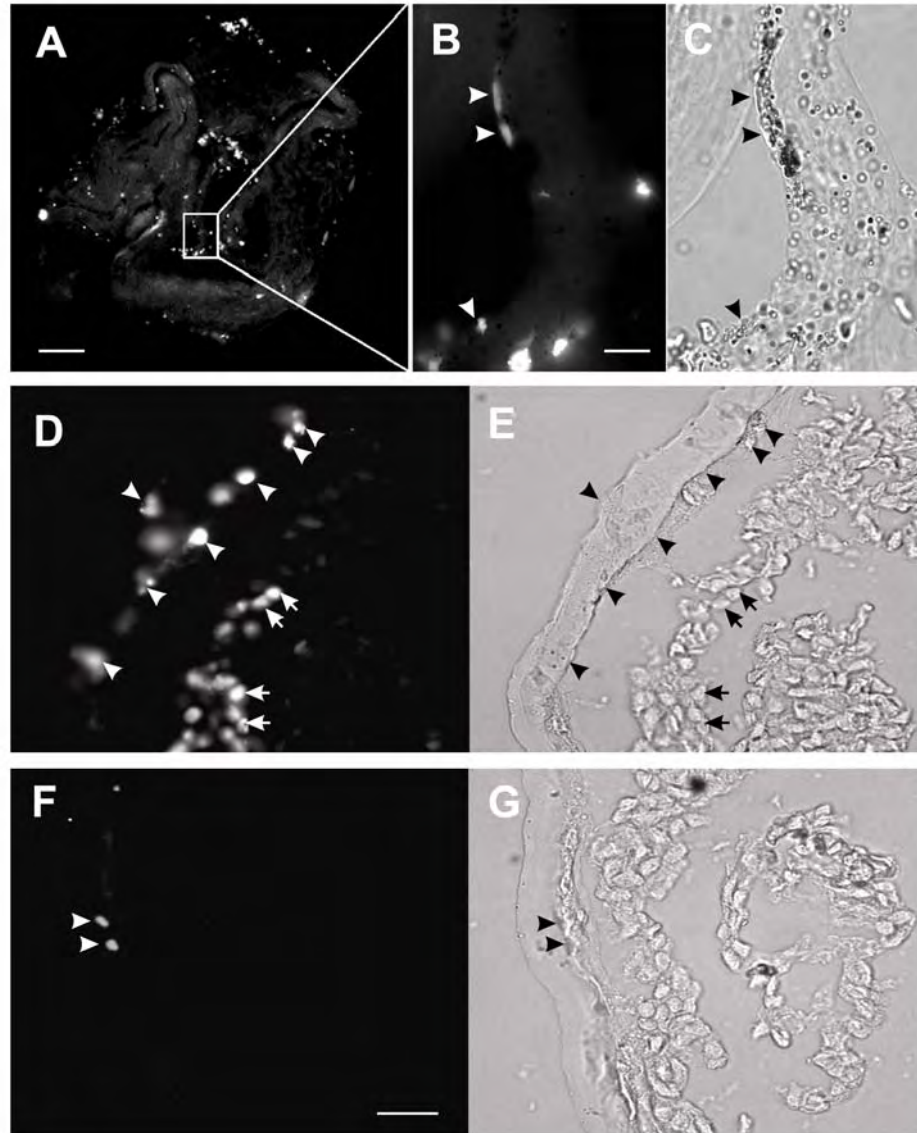


Figura 14. (A) Células en apoptosis (positivas a TUNEL) en membranas de pacientes con retinopatía del prematuro. La amplificación del recuadro en (B) ilustra la asociación de las células positivas al TUNEL con los vasos sanguíneos (cabeza de flecha) en flourescencia (B) y en campo claro (C). Células positivas a TUNEL en el sistema vascular hialoideo de ratas neonatas inyectadas intravitrealmente con anticuerpos control (D) o anticuerpos anti-PRL (F). El mismo campo ilustra las células positivas al TUNEL en los vasos sanguíneos (cabeza de flecha) en flourescencia (D, F) y campo claro (E, G). Escala de la barra: (A) 400 μm , (B, C) 50 μm , y (D,E,F,G) 100 μm .

Las diferencias en apoptosis fueron estadísticamente significativas ($p < 0.01$) cuando se evaluó el número de células positivas para TUNEL (Fig.

15A). De forma similar, la medición por ELISA del DNA fragmentado mostró que la administración intravitreal de anticuerpos anti-PRL reducen significativamente ($p < 0.01$) la apoptosis del tejido hialoideo (Fig. 15B).

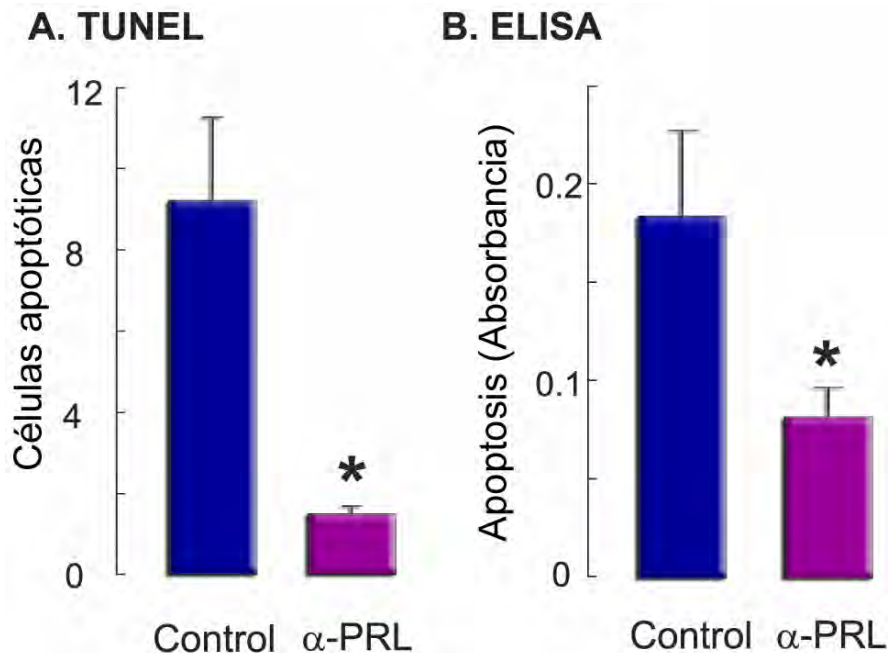


Figura 15. Cuantificación de la apoptosis en el sistema hialoideo de ratas neonatas (10 días de nacidas) inyectadas intravitrealmente con anticuerpos control (control) o con anticuerpos anti-PRL (α -PRL). **(A)** El número total de células positivas a TUNEL contado en cada sección y expresado por $50 \mu\text{m}^2$. **(B)** La apoptosis fue valorada por ELISA. Las barras muestran la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes. * $P < 0.01$ vs control.

Una limitación importante de los estudios en los pacientes con retinopatía del prematuro es que las mediciones se hicieron en pacientes entre 6 meses y 3 años de edad, que es cuando estos pacientes son sometidos a cirugía intraocular. Sin embargo, a esta edad ya no tiene lugar la angiogénesis ocular y no refleja el cuadro activo del padecimiento. Con el propósito de establecer por una parte si existe una relación entre la concentración de PRL y la generación de vaso inhibinas con la progresión de las retinopatías vasoproliferativas; y por otra parte, si las vaso inhibinas pueden tener alguna influencia sobre la retinopatía diabética, procedimos a estudiar grupos de pacientes diabéticos con grados diversos de retinopatía.

6. PROLACTINA, VASOINHIBINAS Y RETINOPATÍA DIABÉTICA

6.1. La PRL disminuye en la circulación de pacientes con retinopatía diabética proliferativa. Se analizaron un total de 196 muestras de suero pertenecientes a hombres entre 40 y 70 años de edad con diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo-1 y tipo-2 y duración del padecimiento mayor a 10 años (Tabla 1). Los diabéticos se categorizaron en tres grupos: sin retinopatía (D), que corresponden a aquellos cuyas retinas no mostraron modificaciones vasculares ni anormalidades aparentes; diabéticos con retinopatía no proliferativa (RDNP), en donde no se observó angiogénesis en la retina, pero sí microaneurismas, hemorragias, exudados, anormalidades de los vasos intrarretinianos y rosarios venosos, cuya magnitud y extensión definió la subclasificación del grupo en leve, moderada y severa (Wilkinson et al., 2003) y finalmente, los diabéticos con retinopatía proliferativa (RDP), donde tiene lugar la proliferación de nuevos vasos sanguíneos y de tejido fibroso en la retina y, cuyo grado más avanzado (alto riesgo), se caracteriza porque los neovasos invaden el vítreo, producen hemorragias severas y pueden presentar desprendimiento de retina (Wilkinson et al., 2003). Los resultados encontrados mostraron que en los tres grupos, los niveles circulantes de PRL fueron significativamente mayores a los del grupo control (C) de hombres sanos con edades similares (Fig. 16). Sin embargo, la concentración de PRL fue significativamente menor en los pacientes diabéticos con retinopatía diabética proliferativa que en aquellos sin retinopatía o con retinopatía diabética no proliferativa (Fig. 16).

Tabla 1. Características de los pacientes

	C	D	RDNP	RDP
Número de pacientes	44	37	96	63
Edad (años)	59.8 ± 1.7	62.2 ± 1.8	62.2 ± 1.04	60.7 ± 0.98
Duración de la diabetes (años)	-	9.9 ± 1.0	14.2 ± 0.64	14.3 ± 0.7
Creatinina (mg/dL)	-	0.9 ± 0.04	0.9 ± 0.03	1.2 ± 0.11

Individuos sanos (C), diabéticos sin retinopatía (D), con retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) y con retinopatía diabética proliferativa (RDP).

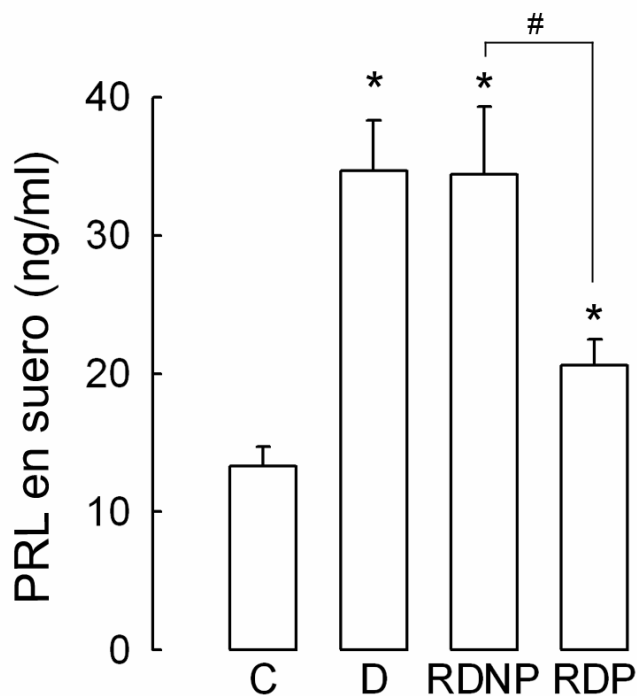


Figura 16. Concentración sérica de PRL en individuos sanos (C), diabéticos sin retinopatía (D), con retinopatía diabética no proliferativa (RDNP), y con retinopatía diabética proliferativa (RDP). Los valores son promedios ± errores estándar. *P<0.05 vs. C; # P<0.05 vs. RDNP.

Cuando los diabéticos de cada grupo se distribuyeron en subgrupos de acuerdo a la severidad de la retinopatía, fue aparente que la menor concentración de PRL sistémica se asoció con la retinopatía diabética proliferativa de alto riesgo, donde los pacientes mostraron niveles hormonales similares a los del grupo control. Sin embargo, el grupo con retinopatía diabética proliferativa de bajo riesgo mostró una tendencia hacia niveles circulantes menores de PRL, los cuales no fueron significativamente diferentes a los observados en los pacientes con retinopatía diabética proliferativa de alto riesgo (Fig. 17A). La variación en campana de la PRL circulante se observó tanto en pacientes con diabetes tipo-1 como en los de tipo-2 (Fig. 17B), y no parece ser función de otras complicaciones sistémicas asociadas a la diabetes. Por ejemplo, los valores séricos de creatinina que evalúan el daño renal, fueron similares entre los tres grupos de diabéticos (Tabla 1). Además, cuando sólo se analizaron los pacientes hipertensos de cada uno de los grupos, incluido el del grupo control sin diabetes, se siguieron observando las mismas variaciones en la PRL circulante (Fig. 17C). Por último, también se observaron las variaciones en campana de la PRL sistémica cuando sólo se promediaron los valores de aquellos pacientes sin alteraciones sistémicas aparentes asociadas a la diabetes (hipertensión, cardiopatías, neuropatías y nefropatías, etc.) (Fig. 17D). Sin embargo, en este último grupo la disminución en los valores circulantes de la PRL se extendió a los pacientes con retinopatía diabética no proliferativa severa (Fig. 17D).

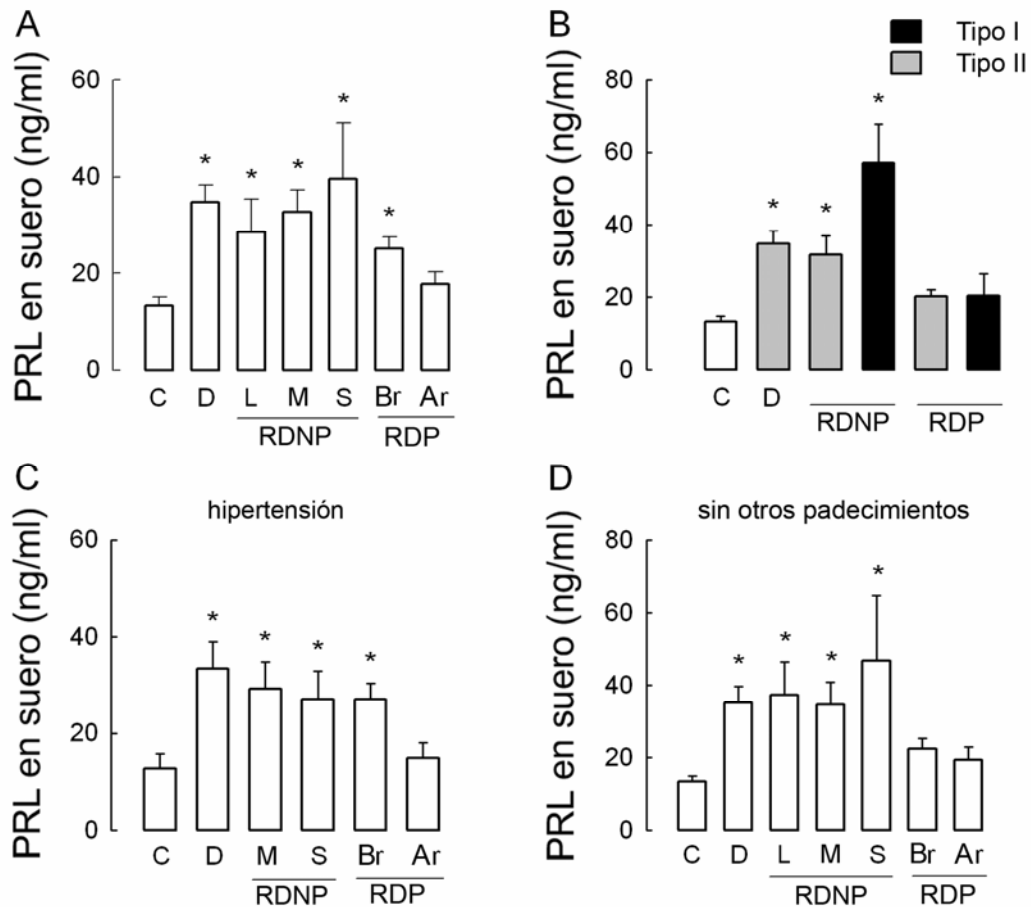


Figura 17. Concentración sérica de PRL en hombres sanos (C), diabéticos sin retinopatía (D), con retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) leve (L), moderada (M) y severa (S), y con retinopatía diabética proliferativa (RDP) de bajo riesgo (Br) y de alto riesgo (Ar). Los valores son promedios \pm errores estándar del total de los pacientes **(A)**, de los pacientes distribuidos de acuerdo al tipo de diabetes **(B)**, de los pacientes hipertensos de cada grupo **(C)**, y de los pacientes sin otros padecimientos sistémicos asociados a la diabetes **(D)**. * $P < 0.05$ vs. C; + $P < 0.05$ vs. RNP.

Estos hallazgos indican que los niveles de PRL en la circulación son función de la progresión de la retinopatía diabética. Esta implicación tendría sentido si se considera que la PRL sistémica puede incorporarse a los fluidos y tejidos oculares y funcionara como molécula precursora de vasoinhibinas capaces de controlar la progresión del padecimiento. Para investigar esta posibilidad utilizamos a la rata como modelo experimental para investigar la presencia del receptor de la PRL en los cuerpos ciliares, estructuras

responsables de la incorporación de factores sistémicos a los fluidos oculares (To et al., 2002).

6.2. El receptor de PRL está presente en los cuerpos ciliares. Para investigar si la PRL circulante podría ser incorporada a los fluidos oculares a través de un transporte activo en los cuerpos ciliares, realizamos ensayos de inmunohistoquímica para evaluar la presencia del receptor de PRL en los cuerpos ciliares de la rata. Así, observamos una marca positiva para el receptor de PRL en el epitelio de los cuerpos ciliares (Fig. 18B). No se observó marca positiva en ausencia del anticuerpo primario (Fig. 18A).

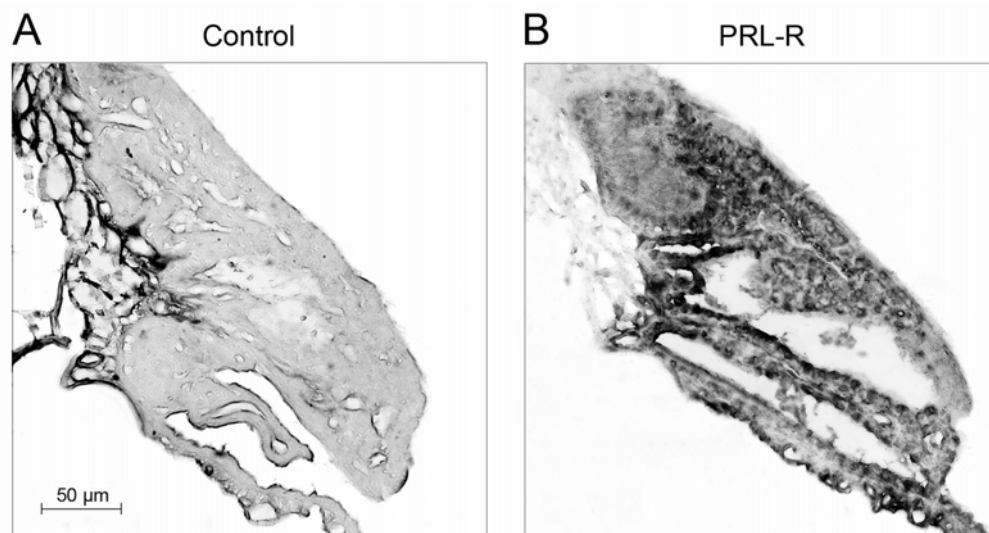


Figura 18. Detección inmunohistoquímica del receptor de PRL en los cuerpos ciliares de la rata. Secciones de los cuerpos ciliares marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-receptor de PRL U-5 (**B**) y falta de marca positiva en ausencia de este anticuerpo primario (**A**).

A continuación investigamos si el aumento en los niveles circulantes de la PRL afecta la concentración de PRL y vasoinhibinas intraoculares.

6.3. La hiperprolactinemia incrementa los niveles circulantes de PRL y de vasoinhibinas en el humor vítreo de la rata. La implantación de dos hipófisis bajo la cápsula renal resultó en un aumento significativo en los niveles de PRL circulante medida por ELISA (Fig. 19A). El análisis por inmunoprecipitación-

Western blot detectó niveles incrementados de PRL y de vaso inhibinas en el humor vítreo de la rata (Fig. 19B y C).

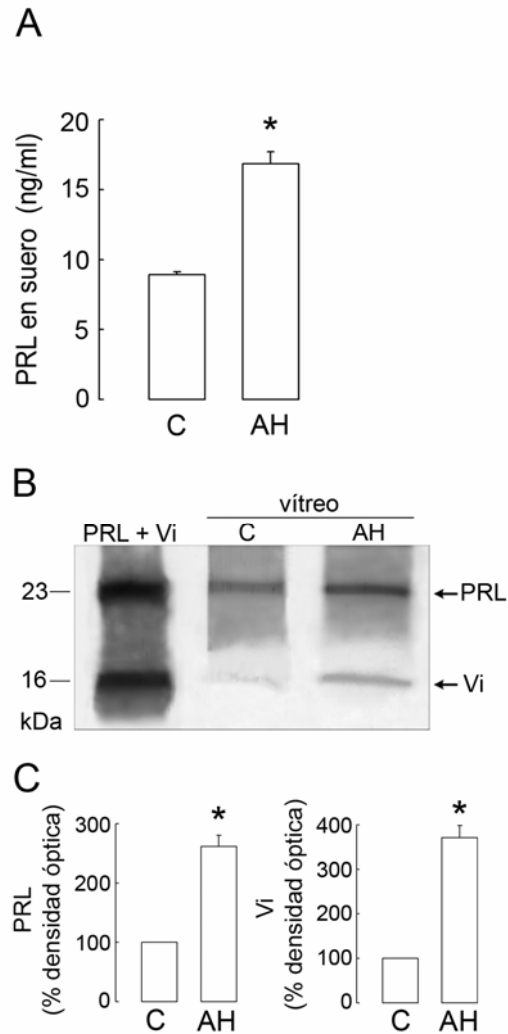


Figura 19. (A) Concentración sérica de PRL en ratas con ausencia (C) o presencia de dos adenohipófisis (AH) implantadas bajo la cápsula renal por 15 días. * $P < 0.05$ vs C. **(B)** Análisis por inmunoprecipitación-Western blot de la PRL y de las vaso inhibinas (Vi) en el humor vítreo de ratas en ausencia o presencia de los implantes adenohipofisarios. Se muestran los estándares de PRL y de vaso inhibinas y sus masas moleculares. **(C)**. Análisis densitométrico de las bandas de PRL y vaso inhibinas en ratas control y con implante.

Estos resultados apoyan el que la PRL circulante es fuente de las vaso inhibinas intraoculares. De acuerdo a los hallazgos antes mencionados en la retinopatía del prematuro (Sección 4.4), la incubación de PRL con fluídos

oculares genera a las vaso inhibinas. A continuación quisimos investigar si la generación intraocular de vaso inhibinas es función de una actividad variable de las enzimas capaces de generarlas asociada a la retinopatía diabética.

6.4. La actividad enzimática que genera vaso inhibinas a partir de la PRL está reducida en el humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa.

La incubación de PRL con el humor vítreo control, obtenido de cadáveres sin trastornos inflamatorios oculares o sistémicos aparentes, resultó en su conversión parcial a un fragmento de 16 kDa similar a las vaso inhibinas (Fig. 20). La generación de vaso inhibinas se bloqueó en presencia de inhibidores de la actividad de metaloproteasas de matriz, el EDTA y la fenantrolina. En contraposición, el vítreo de pacientes con retinopatía diabética vasoproliferativa no generó vaso inhibinas a partir de la PRL (Fig. 20).

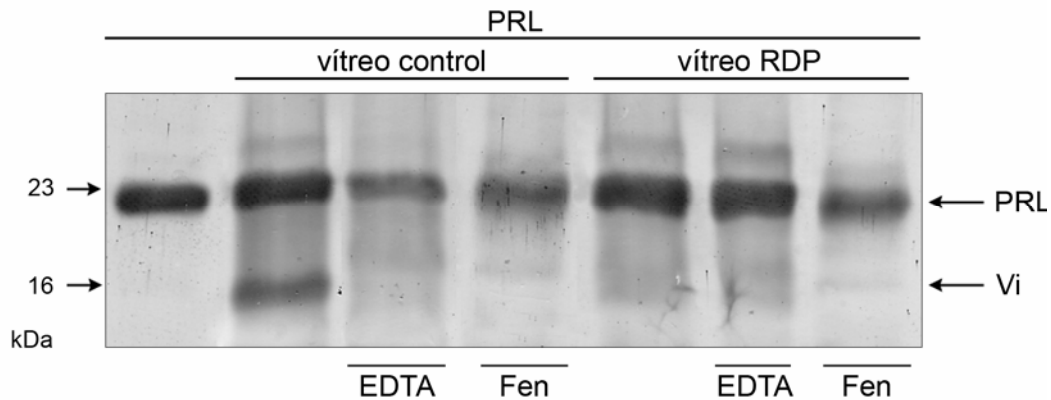


Figura 20. Análisis por Western blot de la PRL antes y después de ser incubada por 72 horas a temperatura ambiente con humor vítreo control (C) y de pacientes con retinopatía diabética proliferativa (RDP) en ausencia o presencia de los inhibidores de metaloproteasas de matriz, EDTA o 1,10 fenantrolina (Fen). Las flechas indican a la PRL y a las vaso inhibinas (Vi), así como sus masas moleculares. El humor vítreo control fue colectado de cadáveres sin trastornos inflamatorios oculares aparentes.

Sabemos que las metaloproteasas de matriz (MMPs), MMP-13, MMP-8 y MMP-3 son las más potentes para generar vaso inhibinas a partir de PRL (Macotela et al., 2006), por lo cual quisimos investigar si los niveles de estas MMPs se alteran en el humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa.

6.5. Análisis de metaloproteasas en el humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa. Se analizó la presencia de MMPs de matriz en el humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa y del grupo control (cadáveres sin trastornos inflamatorios oculares aparentes con menos de 12 horas postmortem). El análisis por Western blot de muestras de humor vítreo de cada paciente mostró que la concentración de la MMP-13 disminuye en la retinopatía diabética proliferativa con respecto al control (Fig. 21). En el caso de las MMPs 8 la concentración de la proteína activa fue mayor en pacientes con RDP que en los controles, lo mismo para el caso de la MMP-13 donde se detectó una forma pro-activa de 55 kDa y una forma activa de 45 kDa. En todos los casos se hizo un análisis densitométrico para demostrar la significancia en el incremento o decremento entre los vítreos de pacientes versus los controles.

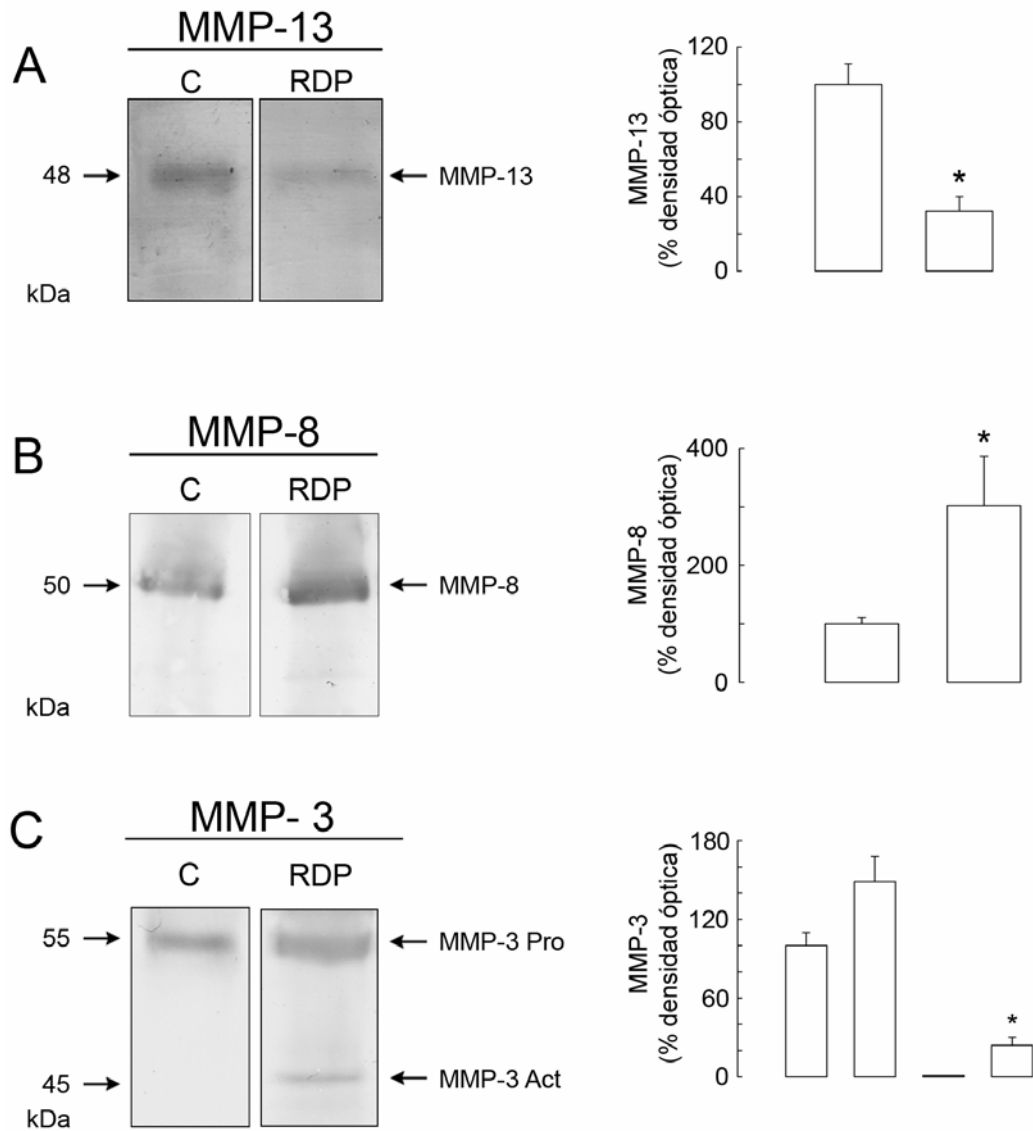


Figura 21. Análisis por Western blot de los niveles de MMPs de matriz en el humor vítreo de controles (C) y de pacientes con retinopatía diabética proliferativa (RDP). A) MMP-13, B) MMP-8 y C) MMP-3. Las barras representan el promedio \pm errores estándar de los valores densitométricos de tres experimentos independientes.

La actividad de MMPs no sólo depende de sus niveles, también de modificaciones postraduccionales. Se sabe que las MMPs son endopeptidasas dependientes de zinc que degradan la matriz extracelular. Éstas son secretadas como proenzimas inactivas (pro-MMP) y son activadas por remoción de sus pro-péptidos amino terminales (Sivak et al., 2002). Además se

conocen otras MMPs que también generan a las vasoinhibinas que aún no han sido analizadas. De cualquier manera resulta interesante que la MMP-13 que es una de las más potentes para generar vasoinhibinas esté disminuida en el humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa .

El interés central de este trabajo fue el análisis de la posible participación de las vasoinhibinas en el control de las retinopatías vasoproliferativas. Sin embargo, los resultados de este estudio que sugieren la incorporación de la PRL sistémica a los fluidos oculares, y sobre todo la demostración de que esta hormona se expresa en la retina nos llevó a investigar si la PRL pudiera ejercer acciones propias (no mediadas por vasoinhibina) en este tejido. Con esta idea en mente, abordamos el estudio de la localización celular de la expresión de la PRL y de su receptor en la retina. Cabe mencionar que las vasoinhibinas parecen no activar, o hacerlo muy débilmente, al receptor de la PRL (Clapp et al., 1989).

7. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA PRL Y DE SU RECEPTOR EN LA RETINA DE LA RATA Y DEL MONO VERDE

7.1. La PRL se detecta a lo largo de la retina. La distribución de PRL en la retina de la rata fue determinada usando anticuerpos policlonales (Fig 22A) y monoclonales (Fig 22B) anti-PRL. Se observó una distribución similar de la marca positiva de ambos anticuerpos en cuerpos celulares y procesos de todas las capas de la retina, i.e., los segmentos externos de los fotorreceptores (OS), la capa nuclear externa (ONL), la capa plexiforme externa (OPL), la capa nuclear interna (INL), la capa plexiforme interna (IPL) y la capa de células ganglionares (GCL) (Fig. 22 A y B). No hubo presencia de señal positiva para PRL en la ausencia de anticuerpos primarios (datos no mostrados).

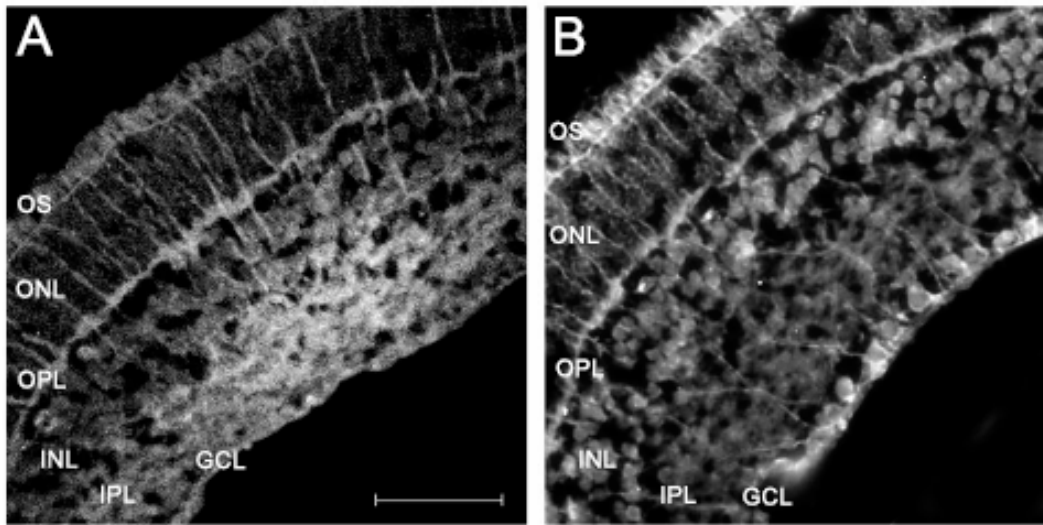


Figura 22. Análisis por inmunohistoquímica de la distribución de PRL en la retina de rata usando un anticuerpo policlonal (A) y un anticuerpo monoclonal (B) anti-PRL. Segmentos externos de los fotorreceptores (OS), capa nuclear externa (ONL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear interna (ONL), capa plexiforme interna (IPL) y la capa de células ganglionares (GCL). Escala de la barra (50 μ m).

7.2. La PRL se localiza en fotorreceptores, células de Müller, interneuronas, células ganglionares y astrocitos de la retina. La tinción positiva para PRL en los segmentos externos de los fotorreceptores señala la presencia de PRL en estas células (Fig. 23 A y B). Para identificar a los otros tipos celulares de la retina que contienen PRL se llevó a cabo una doble inmunotinción usando anticuerpos dirigidos contra proteínas específicas presentes en las células de Müller (sintetasa de glutamina, GS), neuronas (proteína neuronal nuclear, NeuN), y astrocitos (proteína glial fibrilar acidica, GFAP). Como se puede apreciar en la figura 23B, el anticuerpo anti-GS marcó células de Müller. Los núcleos de las células de Müller se localizan en la capa nuclear interna y emiten proyecciones que terminan en las membranas limitantes externa e interna, es decir que se extienden a lo largo de toda la retina (Fig. 23A). De acuerdo a dicha distribución, la inmunoreactividad de PRL se localizó en cuerpos nucleares de la capa nuclear interna y en procesos celulares que se expanden hasta la membrana limitante externa e interna (Fig. 23B). El montaje de ambas marcas corroboró la colocalización de ambos antígenos en las células de Müller (Fig. 23 A ,B y C). De la misma forma,

somas neuronales de la capa nuclear interna y la capa de células ganglionares colocalizaron la marca positiva de anticuerpos anti-NeuN y anticuerpos anti-PRL, indicando la presencia de PRL en los somas de estas neuronas (Fig. 23 D, E y F). Finalmente, el marcador específico de astrocitos colocalizó con la marca positiva a PRL en la capa de células ganglionares, que es donde se localiza este tipo celular (Fig. 23 G, H, e I).

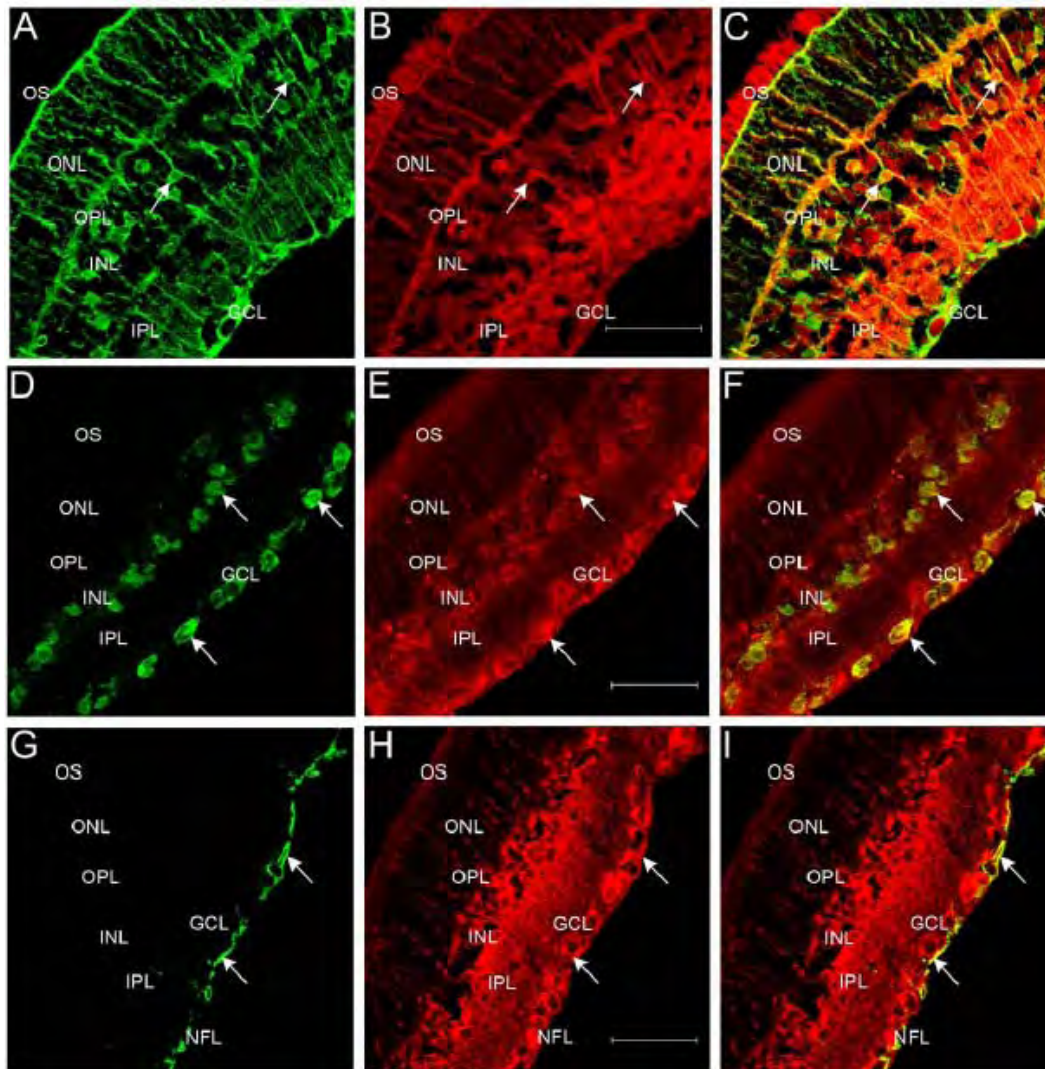


Figura 23. Análisis por doble inmunohistoquímica de la localización de la PRL en distintos tipos celulares de la retina. Doble marcaje en secciones de retina de rata usando un anticuerpo policlonal (B-C, E-F) o un anticuerpo monoclonal (H-I) anti-PRL de rata y anticuerpos que identifican células de Müller (anti-sintetasa de glutamina; A-C), neuronas (anti-proteína neuronal nuclear; D-F), o astrocitos (anti-proteína glial fibrilar ácida; G-I). La marca positiva para los distintos marcadores celulares en verde (A, D, G) y para PRL en rojo (B, E, H). La sobreposición de ambas marcas se ilustra

en amarillo (C,F,I) Las flechas indican células positivas representativas para cada marca y para la sobreposición de ambas marcas. Escala de la barra 50 μ m.

7.3. El receptor de PRL se localiza en la retina de la rata. La distribución del receptor de PRL en la retina fue examinada por hibridación *in situ* (Fig. 24 A, B) e inmunohistoquímica (Fig. 24 C, D). La hibridación *in situ* en secciones de retina de rata usando una sonda antisentido reveló la expresión del ARN mensajero del receptor de PRL en las capas nuclear externa (ONL) y en la nuclear interna (INL), y en menor grado en la capa de las células ganglionares (GCL) (Fig. 24A). No hubo marca positiva cuando se empleó la sonda sentido (Fig. 24B). Los anticuerpos monoclonales anti-receptor de PRL marcaron positivamente cuerpos y procesos celulares en las mismas tres capas de la retina donde se detectó el ARN mensajero correspondiente, i.e., ONL, INL y GCL (Fig. 24C). No se observó tinción positiva en ausencia del anticuerpo primario

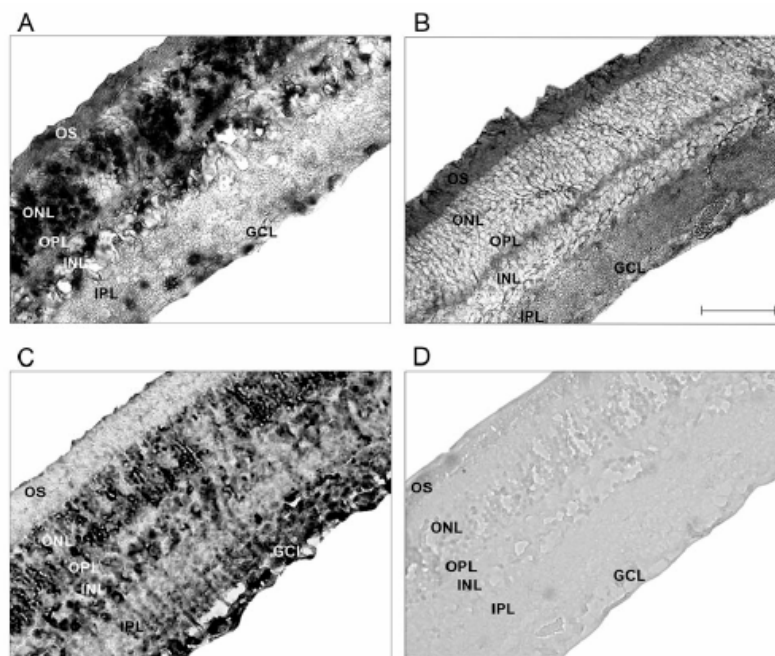


Figura 24. Distribución del ARN mensajero del receptor de PRL y su proteína en la retina de rata. Hibridación *in situ* de secciones de retina usando una sonda antisentido (A) o sentido (B) para el receptor de PRL. Inmunohistoquímica de secciones de retina de rata empleando anticuerpos anti-receptor de PRL (C) o en ausencia de dicho anticuerpo (D). Segmentos externos de los fotorreceptores (OS), capa nuclear externa (ONL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear interna (ONL), capa plexiforme interna (IPL) y capa de células ganglionares (GCL). Escala de la barra (50 μ m).

Para explorar cual isoforma del PRLR es expresada en el tejido retiniano, se amplificó el ARN mensajero usando cebadores comunes a todas las formas del receptor de la PRL o cebadores específicos para las isoformas corta y larga del receptor (Fig. 25A). De acuerdo al esquema presentado (Fig. 25A), el uso de dichos cebadores debe amplificar productos de 582pb comunes a los dos tipos de receptores, mientras que el producto amplificado para la forma larga es de 832 pb y para la isoforma corta de 1017 pb. Como era de esperarse, los tres productos se amplificaron en el control positivo donde se empleó el cDNA del receptor de PRL (Fig. 25B carriles 1, 2 y 3). La amplificación del ARN retiniano sólo resulto en los transcritos correspondientes a la isoforma larga del receptor y no a la corta (Fig. 26B carriles 4, 5, 6). Para determinar si el ARN mensajero del receptor de la PRL se traduce a una proteína del tamaño esperado, extractos de retina fueron inmunoprecipitados y analizados por Western-blot (Fig. 25C). Se detectó una proteína inmunorreactiva de 85 kDa que corresponde al tamaño esperado de la isoforma larga del receptor de la PRL (Okamura et al., 1989). También se detectaron proteínas inmunorreactivas de tamaño menor, con pesos moleculares aparentes cercanos a los reportados para las isoformas intermedia (65 kDa) y corta (45 kDa) del receptor de la PRL. Estudios adicionales son necesarios para clarificar la naturaleza de estas proteínas de menor tamaño, particularmente porque no se detectó el ARN mensajero de la isoforma corta del receptor. Como control positivo se utilizó extracto de hígado de ratas preñadas que se sabe contiene las isoformas larga y corta del receptor de la PRL (Fig. 25C, carril 1).

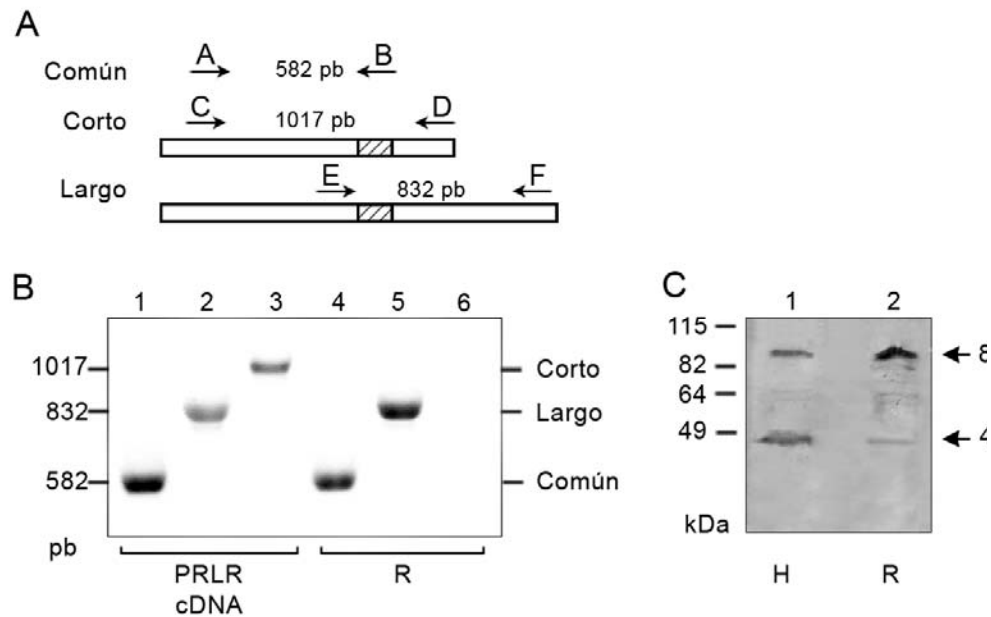


Figura 25. Expresión del receptor de PRL en la retina de rata. (A) Representación esquemática de los productos del PCR esperados usando cebadores (flechas) complementarios al gene del receptor de PRL. Los tamaños esperados de los productos del PCR para cada combinación de cebador están dados en pares de bases (pb). B. Análisis de RT-PCR del RNA total de la retina de rata (R, carriles 4-6) amplificado con las tres combinaciones de cebadores para el PRL-R mostradas en (A). Productos similares fueron amplificados por PCR del cDNA del receptor de prolactina (carriles 1-3). (C) Análisis por inmunoprecipitación-Western blot de las isoformas del receptor de la PRL presentes en la retina (R) y del hígado (H) de ratas hembra. Las flechas indican las isoformas larga (85 kDa) y corta (40 kDa) del receptor de PRL.

Los hallazgos en su conjunto indican que la PRL y su receptor se localizan a lo largo de la retina de la rata en diversos tipos celulares, lo que sugiere acciones de esta hormona a varios niveles del funcionamiento de este tejido. La posible implicación funcional de este hallazgo se apoya en el hecho de que la distribución de la PRL y de su receptor en la retina se conserva a través de la evolución. Esto lo denota la exploración de estos antígenos en la retina del mono verde, cuyo resultado se describe a continuación.

7.4. La PRL y el receptor de la PRL se localizan en la retina del mono verde. La especificidad de los anticuerpos anti-PRL y anti-receptor de PRL dirigidos contra las respectivas proteínas de origen humano se evaluó en el mono verde a través de su reacción en la glándula hipófisis. Así, estos anticuerpos reaccionaron con proteínas que tuvieron los tamaños esperados para la PRL y las dos isoformas del PRL-R en la hipófisis del mono verde. (26 A y 5B). El antisuero anti-PRL humana marcó positivamente proteínas de 25, 23 y 14 kDa, correspondientes a las masas moleculares de la PRL glicosilada, PRL no modificada y vasoinhibinas (Clapp et al., 2006), respectivamente (Fig. 26A). Asimismo, el anticuerpo anti-receptor de PRL reaccionó con dos proteínas predominantes de 85 y 42 kDa, i.e., las masas moleculares esperadas para las isoformas larga y corta del receptor de PRL, respectivamente (Fig. 26B). El análisis por inmunohistoquímica mostró una amplia distribución de PRL inmunorreactiva en los cuerpos y procesos celulares de la retina del mono, con un evidente marcaje en los fotorreceptores (OS y ONL), la GCL y la capa de fibras nerviosas (NFL) (Fig. 26C). La presencia de axones positivos en la NFL apoya la localización de PRL en las células ganglionares. Una ligera señal positiva fue observada en la capa plexiforme externa, la capa nuclear interna y la capa plexiforme interna. Similarmente, el marcaje para el receptor de PRL se localizó a lo largo de la retina y predominó en los segmentos externos de los fotorreceptores, capa plexiforme externa, la capa nuclear interna y la capa plexiforme interna (Fig. 26D). No encontramos señal positiva aparente en la ausencia de anticuerpos primarios (datos no mostrados).

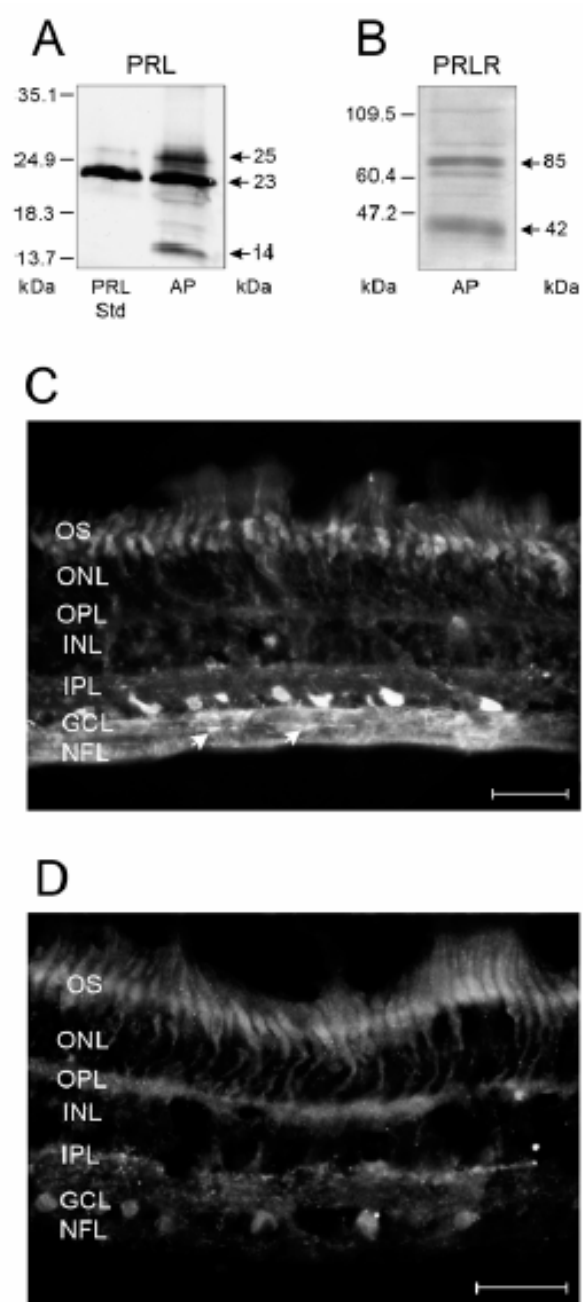


Figura 26. Expresión de PRL y del PRL-R en la retina del mono verde. Análisis por Western blot usando un suero anti-PRL humana (A) o un anticuerpo anti-receptor de PRL humana (B) en lisados de la adenohipófisis (AP) del mono verde. El estándar de PRL (PRL std) se utilizó como referencia. Análisis por inmunohistoquímica de la distribución de la PRL (C) y de su receptor (D) utilizando los anticuerpos en A y B. Los segmentos externos de los fotorreceptores (OS), capa nuclear externa (ONL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear interna (INL), capa plexiforme interna (IPL), capa de células ganglionares (GCL) y la capa de fibras nerviosa (NFL) son indicados en la figura. Las cabezas de flecha muestran axones positivos en la capa de fibras nerviosa (NFL). Escala de la barra: 50 µm.

VII. DISCUSIÓN

La angiogénesis es un proceso biológico complejo que ocurre normalmente durante el desarrollo y la reparación de la red vascular madura. Es un proceso altamente regulado por un gran número de factores estimuladores e inhibidores. El daño vascular causado por un trauma, arteroesclerosis, diabetes o un gran número de enfermedades puede conducir a la oclusión vascular la cual altera dramáticamente las concentraciones de oxígeno del tejido circundante, teniendo como resultado una hipoxia que es considerado el principal estímulo para la angiogénesis (Campochiaro, 2000). Así, la angiogénesis patológica ocurre en enfermedades oculares isquémicas, tales como la retinopatía del prematuro y la retinopatía diabética, las cuales son consideradas las principales causas de ceguera en el mundo en niños y adultos, respectivamente. En ambas enfermedades, la disminución en el flujo vascular resulta en hipoxia tisular que el tejido retiniano compensa con un incremento en la proliferación de neovasos. Con el tiempo, el crecimiento patológico de estos vasos puede producir la formación de un tejido fibroso (membrana fibrovascular) que se extiende desde la retina hacia el vítreo y el cristalino. La retracción de este tejido fibroso frecuentemente resulta en el desprendimiento retiniano y la subsecuente ceguera.

A pesar de los avances médicos y tecnológicos, las retinopatías vasoproliferativas siguen teniendo una alta prevalencia en la población mundial (Ting y Martin, 2006). Las opciones terapéuticas actuales, son la crioterapia y la fotocoagulación con láser, sin embargo, éstas reducen considerablemente la visión periférica y nocturna. Además, estos tratamientos son relativamente efectivos, sólo en el 25% de los infantes con retinopatía del prematuro y en el 50 % de los pacientes con retinopatía diabética (Chen y Smith, 2007).

El mayor entendimiento de las causas de la angiogénesis ocular patológica y de los factores que participan en ella permitirá impulsar el desarrollo de alternativas terapéuticas más eficaces para el control de las retinopatías vasoproliferativas. Al respecto se conocen diversos factores antiangiogénicos oculares endógenos con potencialidad clínica (Dhanabal y Sethuraman, 2006), algunos de los cuales resultan de la proteólisis de proteínas precursoras inactivas.

En el presente estudio mostramos que la PRL y sus derivados, las vasoinhibinas, están presentes en los tejidos y fluidos oculares de pacientes con retinopatía del prematuro y retinopatía diabética y funcionan como factores críticos para mantener el estado latente de la vasculatura local.

Primeramente, determinamos la presencia de PRL en el humor acuoso, líquido subretiniano y suero de pacientes con retinopatía del prematuro. Encontramos que la concentración de PRL en el suero y el humor acuoso de estos pacientes fue significativamente mayor que en los pacientes con enfermedades oculares no-neovasculares. Los valores de la PRL de ambos grupos de pacientes no mostraron diferencias en función del sexo ni de la edad. Tampoco fueron influidos aparentemente por el estrés emocional, ni la anestesia general, ya que el nivel de la PRL circulante de los individuos control (24.4 ± 3.4 ng/ml) fue similar al valor de infantes en edades similares obtenido en ausencia (13.3 a 25.5 ng/ml) (Gässler et al., 2000) o en presencia (18.4 ± 11.4 ng/ml) (Khilnani et al., 1993) de anestesia general. Desconocemos cual es la causa del incremento en la concentración de la PRL circulante en los pacientes con retinopatía del prematuro. La razón podría o no asociarse al padecimiento. Si bien no se observó una correlación significativa entre los niveles circulantes y los oculares, no se puede descartar la contribución de la PRL de origen sistémico a la PRL ocular, dado que se observó una correlación significativa entre las concentraciones de PRL en el humor acuoso y el líquido subretiniano. Este hallazgo es consistente con el transporte de la PRL vía el flujo acuoso-vítreo-líquido subretiniano y por lo tanto una posibilidad de que la PRL se incorpore a los fluidos oculares vía el epitelio ciliar donde tiene lugar la formación del humor acuoso. Si estas posibilidades son reales, las vasoinhibinas intraoculares podrían derivar de la PRL circulante. Además, en apoyo a que altos niveles de PRL circulante puedan causar un incremento en la concentración de PRL en los fluidos oculares, estudios autorradiográficos han mostrado que PRL radioactiva inyectada intracardialmente es incorporada en los tejidos oculares (O'Steen y Sundberg, 1982). Dicha incorporación puede ser mediada vía su receptor como lo discutiremos más adelante. Sin embargo, de forma importante los resultados también apoyan la posibilidad de que la PRL puede ser sintetizada intraocularmente en el ojo de estos pacientes. Encontramos que los vasos sanguíneos y leucocitos infiltrados en las

membranas fibrovasculares oculares de los pacientes con retinopatía del prematuro expresan el RNA mensajero de PRL. Es posible que la expresión de PRL por las células de los vasos sanguíneos pueda ser de origen endotelial, ya que células endoteliales de los capilares retinianos (Ochoa et al., 2000) y de otros lechos vasculares en especies que incluyen al humano, sintetizan PRL (Clapp et al., 1998, Corbacho et al., 2000). Asimismo, el hecho de que los leucocitos expresen el RNA mensajero de PRL no es novedoso pues ya se ha mostrado que las células inmunes expresan y responden a esta hormona (Ben-Jonathan et al., 1996). Si bien, el RNA mensajero amplificado por RT-PCR corresponde en tamaño al que codifica para la PRL completa (PRL 23K), el análisis por Western blot en homogenados de membranas fibrovasculares sólo detectó a las vasoinhibinas. En apoyo a la generación intraocular de vasoinhibinas, encontramos que el líquido subretiniano contiene enzimas capaces de generarlas a partir de PRL. De hecho, la alta proporción de vasoinhibinas encontrada en el líquido subretiniano comparada con la presente en el suero del mismo paciente apoya la posibilidad de que la proteólisis enzimática de PRL hacia vasoinhibinas pueda tener lugar intraocularmente.

Las vasoinhibinas derivadas de la PRL sistémica o de la PRL local, pueden tener un papel importante en el desarrollo y progresión de la retinopatía del prematuro. Estudios previos han mostrado que las vasoinhibinas estimulan la apoptosis en las células endoteliales (Martini et al., 2000) y la apoptosis del endotelio media la regresión de los vasos sanguíneos en los pacientes con retinopatía del prematuro (Palmer et al., 1991). Se ha reportado que el 60% de los niños que nacen con un peso de 1250 g o menos desarrollan neovasos en la retina, pero sólo aproximadamente el 6% progresan a los grados avanzados de este padecimiento, además aún la retinopatía del prematuro en su grado más severo puede sufrir una regresión espontánea exitosa (Eller et al., 1987). Nuestros hallazgos demuestran la presencia de apoptosis en los vasos sanguíneos de las membranas fibrovasculares de pacientes con retinopatía del prematuro grado 5. Proponemos que las vasoinhibinas presentes en estas membranas fibrovasculares contribuirían a promover dicha apoptosis. Para investigar esta posibilidad utilizamos como modelo el sistema hialoideo ocular, una red transitoria de vasos intraoculares que irriga el cristalino, la retina y el

humor vítreo durante el desarrollo (Eller et al., 1987). En los humanos, este sistema normalmente involucre antes del nacimiento, sin embargo, en otros mamíferos tales como la rata, el sistema hialoideo permanece después del nacimiento e involucre vía apoptosis hacia la segunda semana postparto (Taniguchi et al., 1999). Utilizamos la regresión del tejido hialoideo en ratas recién nacidas como modelo para investigar si las vaso-inhibinas podrían promover la apoptosis de los vasos sanguíneos en la retinopatía del prematuro. Encontramos que la administración intravítrea de anticuerpos anti-PRL, pero no de anticuerpos control, causa una reducción significativa en el número de células vasculares en apoptosis. Estos datos sugieren que el efecto inhibitorio de los anticuerpos puede deberse a su capacidad de inmunoneutralizar vaso-inhibinas oculares proapoptóticas presentes en el ojo de la rata neonata.

En su conjunto nuestros hallazgos proponen que niveles altos de PRL ocular originados a partir de la internalización de PRL circulante o de la hormona sintetizada localmente, producen un incremento en la concentración ocular de vaso-inhibinas. Este incremento podría contrarrestar la angiogénesis patológica a través de estimular la apoptosis de los vasos sanguíneos, y así contribuir a la resolución favorable de la enfermedad. Bajo este contexto, niveles altos de PRL circulante pudieran tener un impacto favorable en la prognosis de la retinopatía del prematuro a través de la generación de vaso-inhibinas oculares. Además, el encontrar que las vaso-inhibinas promueven la regresión vascular es clínicamente relevante, debido a que puede funcionar como un tratamiento potencial para pacientes con una neovascularización ocular establecida. Debido a esta hipótesis decidimos investigar si hallazgos similares ocurren en la retinopatía diabética y por lo tanto, si la acción de las PRLs es general a otras retinopatías vasoproliferativas.

Analizamos los niveles circulantes de PRL en 196 pacientes diabéticos con diferentes grados de retinopatía diabética y comparamos sus niveles con sujetos normales. Los resultados mostraron que la concentración circulante de PRL es más alta en pacientes diabéticos sin retinopatía o con retinopatía no proliferativa que en sujetos normales. Esta observación confirma resultados previos en pacientes con diabetes tipo-1 y tipo-2, con edades similares y con niveles de hiperprolactinemia dentro del rango de este estudio (30 ng/ml) (Mooradian et al., 1985, Hunter et al., 1974 y Harter et al., 1976). Las razones

de este incremento en la PRL sistémica se desconocen, pero se han propuesto como posibles causas los hábitos dietéticos, las concentraciones de glucosa y posibles alteraciones vasculares en la hipófisis (Mooradian et al., 1985). Sin embargo, el aumento de la PRL circulante asociado a la diabetes disminuye en la retinopatía diabética proliferativa y esta disminución no depende del tipo de diabetes, ni de otras alteraciones sistémicas asociadas a la diabetes, como la hipertensión y el daño renal.

La posible relación entre PRL y la retinopatía diabética se exploró hace tiempo a consecuencia de la observación de que la hipofisectomía promueve la regresión vascular ocular (Wright et al., 1969). En la actualidad, estos efectos benéficos se atribuyen a la supresión de la hormona de crecimiento que es diabetogénica (Jeffcoate, 2002) y puede estimular la neovascularización a través de inducir la expresión del factor angiogénico IGF-1 (Frank, 2004). Sin embargo, y consistentemente con nuestros hallazgos, los estudios iniciales reportaron niveles circulantes de PRL más altos en pacientes diabéticos sin retinopatía severa que en aquellos con retinopatía severa (Hunter et al., 1974, Harter et al., 1976). Ahora bien, estos estudios se realizaron en grupos reducidos de pacientes y estudios posteriores no confirmaron estos hallazgos (Mooradian et al., 1985, Froland et al., 1977), por lo que el tema dejó de explorarse, a pesar de que los reportes negativos no fueron concluyentes pues, o bien, no especificaron el tipo de retinopatía (proliferativa *versus* no proliferativa), o su grado de severidad. El presente trabajo corrobora las observaciones iniciales utilizando un grupo grande de pacientes y establece que la PRL sistémica aumenta con la diabetes y disminuye en los estadios avanzados de la retinopatía diabética proliferativa.

De forma importante, encontramos que en el modelo de hiperprolactinemia el aumento sistémico de esta hormona resulta en un incremento de PRL y de vasoinhibinas en el humor vítreo. Asimismo, detectamos la presencia del receptor de PRL en los cuerpos ciliares, estructuras responsables de regular el intercambio entre el plasma y los fluidos del ojo y con ello la posibilidad de que dicho receptor medie el transporte activo de la PRL circulante a los fluidos oculares. En apoyo a que la hiperprolactinemia pudiera tener un valor protector contra la retinopatía diabética, se ha mostrado que al final del embarazo y en el período postparto,

cuando los niveles circulantes de PRL son elevados, aumenta la regresión de la retinopatía diabética (Srivatsa, 1994, Sheth, 2002). Además, la leche materna protege contra la retinopatía del prematuro (Hylander et al., 2001) y este efecto puede deberse, entre otros factores, a la presencia de PRL en la leche, desde donde puede incorporarse a la circulación de las crías (Healy et al., 1980, Grosvenor y Whitworth, 1983). Más aún, se ha reportado que la PRL puede tener efectos benéficos capaces de reducir la incidencia y progresión de la diabetes, a través de acciones conjuntas sobre el sistema neuroendócrino, el sistema inmune y sobre la función, proliferación y supervivencia de las células beta (Hawkins et al., 1994, Holstad y Sandler, 1999, Fujinaka et al., 2007).

Otro posible mecanismo protector de la PRL sistémica contra la retinopatías vasoproliferativas podría ser su conversión intraocular a vasoinhibinas. Como mencionamos la concentración de vasoinhibinas es mayor en el líquido subretiniano que en el suero de pacientes con retinopatía del prematuro y este incremento podría contrarrestar la angiogénesis patológica a través de estimular la apoptosis en los vasos sanguíneos, y así contribuir a la resolución favorable de la enfermedad. Trabajos recientes en el laboratorio mostraron que la generación de vasoinhibinas por el humor vítreo puede ocurrir *in vivo*, en condiciones normales y por acción de MMPs (Aranda et al., 2007). Se sabe que varias MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 y MMP-13) convierten parcialmente a la PRL en vasoinhibinas (Macotela et al., 2006), que las MMP-1, MMP-2, MMP-3 y MMP-9 están presentes en el humor vítreo y que su concentración puede aumentar durante la retinopatía diabética (Sivak y Fini, 2002). Al respecto, encontramos que la concentración de la MMP-13 disminuyó asociada al padecimiento y que la MMP-2, la MMP-3, la MMP-8 y la MMP-9 están incrementadas en el humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética proliferativa en comparación a los vítreos obtenidos de cadáveres. Sin embargo, contrario a lo que sucede con el líquido subretiniano, en los pacientes con retinopatía del prematuro, el procesamiento proteolítico de la PRL a vasoinhibinas fue menor en el vítreo de pacientes con retinopatía diabética que en el humor vítreo de cadáveres sin ningún padecimiento ocular vascular. Esta disminución en el procesamiento de vasoinhibinas puede favorecer el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, desconocemos si la potencia de dichas proteasas varía en función de la

progresión del padecimiento. Por otra parte sabemos, que si bien, el aumento en la concentración de MMPs puede resultar en una mayor generación de vasoinhibinas también puede conducir a su degradación total (Macotela et al., 2006).

La retinopatía diabética no proliferativa se asocia a un aumento en la vasodilatación y la vasopermeabilidad de la microvasculatura retinal que conduce a hemorragias, microaneurismas y exudados. Recientemente, se encontró que la inyección intravítrea de vasoinhibinas puede bloquear la permeabilidad vascular retiniana en ratas diabéticas, así como la inducida por la inyección intravítrea de VEGF o del humor vítreo de pacientes con retinopatía diabética (García et al., 2008). Estas acciones de las vasoinhibinas son consistentes con su efecto inhibitorio sobre la activación de la sintetasa endotelial de óxido nítrico en respuesta al VEGF (González et al., 2004), que es el mecanismo por el cual este factor induce la vasodilatación y estimula la vasopermeabilidad en la retinopatía diabética (Kimura y Esumi, 2003). El hecho de que las vasoinhibinas interfieran con ambos efectos del VEGF, las señala como candidatos potenciales capaces de contrarrestar estos cambios durante la retinopatía diabética no proliferativa. Pero además, las vasoinhibinas también pueden interferir con los efectos vasoproliferativos y antiapoptóticos del VEGF y de otros factores angiogénicos. Las vasoinhibinas inhiben la proliferación de células endoteliales en cultivo inducida por el VEGF y por el factor básico derivado de fibroblastos (Clapp et al., 1993), y promueven la apoptosis de los vasos retinianos (Dueñas et al., 2004), a través de acciones proapoptóticas directas sobre las células endoteliales, que incluyen la conversión de la proteína antiapoptótica Bcl-X_L a su forma proapoptótica Bcl-X_S, y la inducción de la vía de las caspasas 8,9 y 3 a través de la activación del factor de transcripción NFκB (Martíni et al., 2000). Por lo tanto, la acción protectora de las vasoinhibinas podría extenderse a las diferentes fases de la retinopatía diabética y ser efectiva para bloquear los efectos de diversos factores angiogénicos.

Los resultados obtenidos hasta el momento permiten proponer que la hiperprolactinemia podría tener un valor pronóstico favorable para las retinopatías vasoproliferativas vía la generación intraocular de vasoinhibinas, y por lo tanto, que la reducción en la PRL sistémica podría asociarse

causalmente con la progresión de estos padecimientos. Más aún, es necesario identificar y caracterizar la actividad de las metaloproteasas, capaces de generar vasoinhibinas que permitan contrarrestar alteraciones vasculares tempranas de la retinopatías vasoproliferativas y apoyar su potencial terapéutico a lo largo de estas enfermedades.

Finalmente, y en apoyo a que la PRL es una proteína pleiotrópica con efectos sobre la diferenciación celular, crecimiento y sobrevivencia en los tejidos, nos dimos a la tarea de investigar si la PRL sintetizada localmente pudiera ejercer algún efecto biológico adicional a la angiogénesis (independiente de las vasoinhibinas) en la retina de mamíferos.

Primeramente, estudios de inmunomarcaje indicaron que la proteína PRL está ampliamente distribuida en la retina de la rata y del mono verde. La especificidad de la inmunodetección fue apoyada en el uso de anticuerpos anti-PRL tanto monoclonales como policlonales, y por la falta de señal positiva en ausencia de ambos anticuerpos. Más aún, la distribución de PRL fue paralela a la expresión de su ARN mensajero reportado en la ONL, INL y GCL de retinas de rata (Aranda et al., 2005). Nuestro trabajo mostró la localización de la PRL en los segmentos de los fotorreceptores y en las células de Müller. La marca positiva de anticuerpos contra la glutamino-sintetasa y contra PRL se colocó en los procesos y somas de las células de Müller. Asimismo, la co-localización de la inmunotinción de PRL con otros marcadores específicos de los tipos celulares de la retina reveló la presencia de PRL en interneuronas, células ganglionares y astrocitos. Estos hallazgos sugieren que la PRL puede servir como un mediador autócrino o parácrino en estos distintos tipos celulares de la retina.

Consistentemente con esta propuesta, identificamos la presencia del receptor de PRL en diferentes tipos celulares de la retina, que incluyen a los fotorreceptores, y células de la capa nuclear interna y ganglionar. Los receptores de PRL existen en diferentes isoformas y difieren principalmente en la secuencia y longitud del dominio citoplasmático (Bole-Feysot et al., 1998). La mayor proporción del receptor de PRL en la retina corresponde a la forma larga, que es la isoforma responsable de la transducción de la señal de la PRL en la mayoría de los tipos celulares (Schuler et al., 2001). La ausencia del RNA mensajero de la isoforma corta del receptor de PRL indica que dicha isoforma

está ausente en la retina. Sin embargo, el análisis por Western blot detectó una proteína inmunorreactiva con el tamaño esperado para el receptor corto de la PRL, si bien en cantidades muy menores. Esta discrepancia podría deberse a una reacción no específica de los anticuerpos o bien, a una baja estabilidad del transcrito correspondiente a la forma corta del receptor en comparación a la de la proteína (Wong et al., 1998; Yoshiko et al., 2002).

De manera interesante la retina del mono verde mostró una distribución de la PRL y de su receptor similar a la de la rata, es decir localizada en los segmentos externos de los fotorreceptores, en las capas nucleares externa e interna y en la capa de las células ganglionares. Esta similitud indica la conservación de ambas proteínas y de su posible función a través de la evolución. Por su parte la distribución similar de la PRL y de su receptor en la retina de ambas especies apoya acciones parácrinas o autócrinas de la PRL en la fisiología de la retina.

Existe poca información acerca de la función de la PRL en la retina. La expresión predominante de la PRL y de su receptor en los fotorreceptores coincide con los estudios pioneros que muestran que la PRL puede promover la modificación de los pigmentos visuales en peces teleosteos migratorios (Allen y Cristo, 1978) y en anfibios que sufren una segunda metamorfosis (Crim, 1975). En ratas, se propuso que la PRL aumenta la susceptibilidad de los fotorreceptores al daño en un modelo de lesión retiniana inducida por exposición a luz continua durante 21 días. En ese estudio, la remoción de la glándula pituitaria protegió a los fotorreceptores de la destrucción por luz y la administración de PRL revirtió el efecto protector de la hipofisectomía (O'Steen y Kraeer, 1977). Contrario a lo anterior, estudios preliminares en nuestro laboratorio usando el mismo modelo de daño retiniano inducido por luz pero con periodos más cortos de exposición (2 días) mostraron que la inyección intravitreal de PRL y la hiperprolactinemia (2 adenohipofisis en la cápsula renal) protegen a los fotorreceptores de la apoptosis inducida por luz en la rata (Rivera y Clapp, resultados no publicados). Además de la PRL de origen hipofisiario, nuestros resultados sugieren que la PRL podría actuar directamente sobre los fotorreceptores en forma autócrina o parácrina. Asimismo, la PRL local puede funcionar como un factor trófico para las células de Müller, interneuronas, células ganglionares y astrocitos. Por ejemplo, la

deleción genética de la PRL en el pez cebra conduce a la formación de ojos de menor tamaño (Zhu et al., 2007), sugiriendo que la PRL participa en el desarrollo de los ojos. Es también conocido que el crecimiento de los ojos es sensible a la experiencia visual y que la retina neural es una fuente de factores de crecimiento entre los cuales podría incluirse a la PRL (Rymer y Wildsoet, 2005). Al respecto, se sabe que la PRL puede actuar sobre el sistema nervioso central para promover la proliferación neuronal (Shingo et al., 2003) y de los astrocitos (De Vito et al., 1992), además de controlar la liberación de neurotransmisores, neuropeptidos y citocinas (Ben-Jonathan et al., 1996). De forma interesante, la PRL incrementa la expresión del factor de necrosis tumoral- α , interleucina 1- α , y del factor de crecimiento transformante- α en los astrocitos del cerebro (De Vito et al., 1995), y algunas de estas citocinas se expresan a consecuencia del desprendimiento de la retina en los astrocitos y en las células de Müller (Nakazawa et al., 2006).

Sabemos que las vasoinhibinas, son inhibidores naturales de la angiogénesis retiniana (Clapp et al., 2006). Las vasoinhibinas se han detectado por Western blot en homogenados de la retina de rata (Aranda et al., 2005), y el bloqueo de su producción o efecto por la inyección intravitreal de pequeños RNAs de transferencia o de anticuerpos neutralizantes estimula el crecimiento y dilatación de los vasos en la retina (Aranda et al., 2005). El presente estudio no nos permite distinguir entre la localización de PRL y de vasoinhibinas en la retina. Sin embargo, el hecho de que las vasoinhibinas se han detectado en los extractos retinianos (Aranda et al., 2004) y son generadas por proteólisis de la PRL sugiere que estos péptidos podrían ser generados por el corte de la PRL en los diferentes tipos celulares. Más aún, la localización de PRL y potencialmente de vasoinhibinas en fotorreceptores, células de Müller, células ganglionares, y astrocitos es consistente con la observación de que estas células producen factores anti-angiogénicos, incluyendo el factor de crecimiento derivado de epitelio pigmentario (Karakousis et al., 2001), la condromodulina-1 (Funaki et al., 2001), y la angiostatina (Pearce et al., 2007).

Las retinas de los monos fueron inmunomarcadas con un anticuerpo policlonal que reconoce varias isoformas de PRLs hipofisiarias, incluyendo a las vasoinhibinas. La distribución de la PRL inmunorreactiva en la retina de la rata y del mono, así como la detección en los tejidos y fluidos oculares en el

humano sugiere que la PRL y las vasoinhibinas pudieran tener acciones en la fisiología retiniana conservadas a través de la evolución en los mamíferos.

VIII. CONCLUSIÓN

En conclusión, los resultados de este trabajo de tesis apoyan la participación de la PRL y de las vaso inhibinas en el control de las retinopatías vasoproliferativas. Proponemos que la PRL presente en la retina proviene de la hormona circulante y de la PRL producida localmente. Además, planteamos que la PRL retiniana es procesada intraocularmente a vaso inhibinas por metaloproteasas de matriz, y que estos péptidos contribuyen a mantener inhibida la angiogénesis retiniana durante la vida adulta y promueven la remodelación vascular durante el desarrollo. Sabemos que bajo condiciones de enfermedad (retinopatía del prematuro o retinopatía diabética) la isquemia y subsecuente hipoxia estimula la progresión de factores angiogénicos que cotrarrestan la acción de factores anti-angiogénicos locales, entre los que proponemos se encuentran las vaso inhibinas. Además, nuestro trabajo plantea que la disminución de los niveles circulantes de PRL en la diabetes reduciría la concentración de vaso inhibinas intraoculares, y por ende, la progresión de la retinopatía a sus niveles más severos. En contraposición, el aumento en los niveles circulantes de PRL en etapas tardías de la retinopatía del prematuro traería consigo un aumento en las vaso inhibinas intraoculares y con ello favorecería la regresión de los neovasos, interfiriendo con la progresión del padecimiento. Finalmente, las acciones fisiológicas de la PRL parecen abarcar otros tipos celulares de la retina y queda por investigar su naturaleza.

IX. PERSPECTIVAS

En su conjunto los resultados obtenidos plantean muchas interrogantes que deberán ser exploradas experimental y clínicamente. Las más importantes son en torno a las retinopatías vasoproliferativas e incluyen: (1) el análisis del valor pronóstico de la PRL sistémica en función de su carácter de molécula precursora de vaso inhibinas intraoculares. Y (2), la determinación del valor terapéutico de las vaso inhibinas para el control de estos padecimientos. Dado que el tratamiento con láser no es siempre efectivo para controlar las retinopatías vasoproliferativas, es altamente deseable el desarrollo de alternativas terapéuticas como es el uso de agentes, que como las vaso inhibinas, bloqueen la formación de los neovasos o

promuevan su involución. Al respecto, la valoración del potencial terapéutico de las vasoinhibinas en el control de la retinopatías vasoproliferativas requiere de estudios encaminados a mejorar la eficiencia de su producción y la administración intraocular de estos péptidos, así como la caracterización de sus acciones en diversos modelos experimentales de neovascularización retiniana. En todo caso, la obtención de mayor información sobre la generación intraocular de las vasoinhibinas y sobre sus mecanismos de acción, permitirá reforzar la noción de la participación de la PRL y de las vasoinhibinas en el control fisiológico y patológico de la angiogénesis ocular.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Adamis AP, Aiello LP, D'Amato RA. (1999). Angiogenesis and ophthalmic disease. *Angiogenesis*. 3:9-14.
- Adams JC, Bentley AA, Kvansakul M, Hatherley D, Hohenester E. (2008). Extracellular matrix retention of thrombospondin 1 is controlled by its conserved C-terminal region. *J Cell Sci*. 15:784-795.
- Adler RA. (1986). The anterior pituitary-grafted rat: A valid model of chronic hyperprolactinemia. *Endocrine Rev*. 7:302-313.
- Aiello LP, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FR 3rd, Klein R. (1998). Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 21:143-156.
- Ali S, Pellegrini I, Kelly PA. (1991). A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *J Biol Chem*. 266:20110-20117.
- Allen DM, Cristy M. (1978). Thiourea does not block visual pigment responses to prolactin in trout. *Vision Res*. 18:859-860.
- Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo-Escovar J, Nava G, López-Barrera F, Quiroz-Mercado H, Berger P, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2005). Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46:2947-2953.
- 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 cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology*. 133:935-938.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. (1996). Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, function, and clinical aspect. *Endocr Rev*. 17: 639-669.
- Bole-Feysot C, Goffin 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*. 19:225-268.
- Cai J, Boulton M. (2002). The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye*. 16:242-260.
- Campochiaro PA. (2000). Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol*. 184:301-310.
- Chen J, Smith LE. (2007). Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis* 10:133–140.
- Clapp C, González C, Macotela Y, Aranda J, Rivera JC, García C, Guzmán-Morales J, Zamorano M, Vega C, Martín C, Jeziorski MC, Martínez de la

Escalera G. (2006). Vasoinhibins: A family of N-Terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function. *Front Horm Res.* 35:64-73.

- 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.* 133:1292-1299.
- Clapp C, Torner L, Gutiérrez-Ospina G, Alcántara E, López-Gómez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejía S, Morales MA, Martínez 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.* 91:10384-10388.
- Clapp C. (1987). Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology.* 121:2055-2064.
- Clapp C, Weiner RI. (1992). A specific, high affinity saturable binding site for the 16-kilodaltons fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology.* 130:1380-1386.
- Clapp C, López-Gómez FJ, Nava G, Corbacho A, Torner L, Macotela Y, Dueñas Z, Ochoa A, Noris G, Acosta E, Garay E, Martínez de la Escalera G. (1998). Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *J Endocrinol.* 158:137-144.
- Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Torner L, Dueñas Z, Noris G, Morales MA, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2000a). Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J Endocrinol.* 166:53-62.
- Corbacho AM, Martínez 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.* 173:219-238.
- Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, Noris G, Macotela Y, Struman I, Martínez de la Escalera G, Freeman BA, Clapp C. (2000b). Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *J Biol Chem.* 275:13183-13186.
- Cosío G, Jeziorski MC, López-Barrera F, Martínez 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.* 83:1-10.
- Crim JW. (1975). Prolactin-induced modification on visual pigments in the eastern red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens*. *Gen Comp Endocrinol.* 26:233-242.
- 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 16kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:6374–6378.

- 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*. 13:692–704.
- Dawson DW, Volpert O, Gillis P, Crawford H, Ju H, Benedic W, Bouck P. (1999). Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science*. 285:245-248.
- De Vlaming VL. (1979). Actions of prolactin among the vertebrates. In: Barrington EJW (ed) *Hormones and Evolution*, Academic Press, New York, pp 561-642.
- DeVito WJ, Avakian C, Stone S, Okulicz WC, Tang KT, Shamgochian M. (1995). Prolactin induced expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-alpha in cultured astrocytes. *J Cell Biochem*. 57:290-298.
- DeVito WJ, Okulicz WC, Stone S, Avakian C. (1992). Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology*. 130:2549-2556.
- Dhanabal M, Sethuraman N. (2006). Endogenous angiogenesis inhibitors as therapeutic agents: historical perspective and future direction. *Recent Patents Anticancer Drug Discov*. 1:223-236.
- Dueñas Z, Rivera JC, Quiroz-Mercado H, Aranda J, Macotela Y, Montes de Oca P, López-Barrera F, Nava G, Guerrero JL, Suarez A, De Regil M, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2004). Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45:2049-2055.
- Dueñas Z, Torner L, Corbacho AM, Ochoa A, Gutiérrez-Ospina G, López-Barrera F, Barrios FA, Berger P, Martínez 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*. 40:2498-2505.
- Eller AW, Jabbour NM, Hirose T, Schepens CL. (1987). Retinopathy of prematurity. The association of a persistent hyaloid artery. *Ophthalmology*. 94:1640-1646.
- Ferrone PJ, Trese MT. (1999). Retinopathy of prematurity: stages 1 through 3. In: *Retina, vitreous and macula*. Guyer D, Yannuzzi L, Chang S, Saunders WB, Shelds J, Green WR, (Eds) Vol. 1 Chapter 32:407-414.
- Folkman J. (1995). Clinical applications of research on angiogenesis. *New Engl J Med*. 333:1757-1763.
- Frank RN. (2004). Diabetic Retinopathy. *New Engl J Med*. 350:48-58.

- Frawley SL. (1989). Mammosomatotropes: current status and posible functions. *Trends Endocrinol Metab.* 1:31.
- Freeman M.E, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 80:1523-1563.
- Froland A, Hagen C, Lauritzen E. (1977). Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet* i:45.
- Fujinaka Y, Takane K, Yamashita H, Vasavada RC. (2007). Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *J Biol Chem.* 282:30707-30717.
- Funaki H, Sawaguchi S, Yaoeda K, Koyama Y, Yaoita E, Funaki S, Shirakashi M, Oshima Y, Shukunami C, Hiraki Y, Abe H, Yamamoto T. (2001). Expression and localization of angiogenic inhibitory factor, chondromodulin-I, in adult rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:1193-1200.
- García C, Aranda J, Arnold E, Thebault S, Macotela Y, López-Casillas F, Mendoza V, Quiroz-Mercado H, Lin SH, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2008). Vasoinhibins prevent increased retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J. Clin. Invest.* In press.
- Gässler N, Peuschel T, Pankau R. (2000). Pediatric reference values of estradiol, testosterone, lutro pin, follitropin and prolactin. *Clin Lab.* 46:553–560.
- Ge G, Fernández CA, Moses MA, Greenspan DS. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:10010-10015.
- González C, Corbacho AM, Eiserich JP, García C, López-Barrera F, Morales-Tlalpan V, Barajas-Espinosa A, Díaz-Muñoz M, Rubio R, Lin S-H, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2004). 16K-Prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology.* 145:5714-5722.
- Gopal L, Sharma T, Shanmugam M, Badrinath SS, Sharma A, Agraharam SG. (2000). Surgery for stage 5 retinopathy of prematurity: the learning curve and evolving technique. *Indian J Ophthalmol.* 48:101-106.
- Grosvenor CE, Whitworth NS. (1983). Accumulation of prolactin in maternal milk and its transfer to circulation of neonate rat: a review. *Endocrinol Exp.* 17:271-286.
- Hanahan D, Folkman J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 86:353-364.
- Hart WM. (1992). Adler's physiology of the eye. Mosby Year Book. Ninth edition. St. Louis Missouri. USA. 1-16 pp.

- Harter M, Balarac N, Pourcher Ph, Kowlowski JM, Krebs B, Ramaioli A. (1976). Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet* ii:961-962.
- Hawkins TA, Gala RR, Dunbar JC. (1994). Prolactin modulates the incidence of diabetes in male and female NOD mice. *Autoimmunity*. 18:155-162.
- Healy DL, Rattigan S, Hartmann PE, Herington AC, Burger HG. (1980). Prolactin in human milk: correlation with lactose, total protein, and alpha-lactalbumin levels. *Am J Physiol*. 238:E83-E86.
- Henkind P, Hansen RI, Szalay J. (1979). Ocular circulation. In "Physiology of the human eye and visual system" (Ed. Records, R.E.) Harper & Row, New York. pp 98-155.
- Holstad M, Sandler S. (1999). Prolactin protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *J Endocrinol*. 163:229-234.
- Hunter PR, Anderson J, Lunn TA, Horrobin DF, Boyns AR, Cole EN. (1974). Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet* i:1237.
- Hylander MA, Strobino DM, Pezzullo JC, Dhanireddy R. (2001). Association of human milk feedings with a reduction in retinopathy of prematurity among very low birthweight infants. *J Perinatol*. 21:356-362.
- Jeffcoate W. (2002). Growth hormone therapy and its relationship to insulin resistance, glucose intolerance and diabetes mellitus: a review of recent evidence. *Drug Saf*. 25:199-212.
- Karakousis PC, John SK, Behling KC, Surace EM, Smith JE, Hendrickson A, Tang WX, Bennett J, Milam AH. (2001). Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol Vis*. 7:154-163.
- Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Ederly M. (1991). The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine Rev*. 12:235-251.
- Kent D, Pennie F, Laws D, White S, Clark D. (2000). The influence of retinopathy of prematurity on ocular growth. *Eye*. 14 (Pt 1):23-9.
- Khilnani P, Muñoz R, Salem M, Gelb C, Todres ID, Chernow B. (1993) Hormonal responses to surgical stress in children. *J Pediatr Surg*. 28:1-4.
- Kimura H, Esumi H. (2003). Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol*. 50:49-59.
- Kolb H, Fernandez E, Nelson R. (2002). Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. <http://www.webvision.med.utah.edu>.
- Lee H, Struman I, Clapp C, Martial J, Weiner RI. (1998). Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: Activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology*. 139:3696-3703.

- Macotela Y, Aguilar MB, Guzmán-Morales J, Rivera JC, Zermeño C, López-Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2006). Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16kDa prolactin. *J Cell Sci.* 119:1790-1800.
- Mann I. (1964). *The development of the human eye.* Grune and Stratton, New York.
- 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.* 14:1536-154.
- Mooradian AD, Morley JE, Billington CJ, Slag MF, Elson MK, Shafer RB. (1985). Hyperprolactinaemia in male diabetics. *Postgrad Med J.* 61:11-14.
- Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods.* 65:55-63.
- Nakazawa T, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Skondra D, Miyahara S, Sobrin L, Thomas KL, Chen DF, Grosskreutz CL, Hafezi-Moghadam A, Miller JW. (2006). Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. *Mol Vis.* 12:867-878.
- Nicoll CS. (1980). Prolactin: ontogeny and evolution of prolactin's functions. *Federation Proc.* 39:2563-2566.
- O'Steen WK, Sundberg DK. (1982). Patterns of Radioactivity in the eyes of rats after Injections of Iodinated Prolactin. *Ophthalmic Res.* 14:54-62.
- Ochoa A, Montes de Oca P, Rivera JC, Dueñas Z, Nava G, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2001). Rat retinal capillary endothelial cells produced and secrete Prolactin. *Invest Ophthalmol & Vis Sci.* 42:1639-1645.
- Okamura H, Zachwieja J, Raguette S, Kelly PA. (1989). Characterization and applications of monoclonal antibodies to the prolactin receptor. *Endocrinology.* 124:2499-2508.
- O'Reilly MS. (1997). Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *Cell.* 79:273-294.
- O'Steen, WK, Kraeer SL. (1977). Effects of hypophysectomy, pituitary gland homogenates and transplants, and prolactin on photoreceptor destruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 16:940-946.
- Palmer EA, Flynn JT, Hardy RJ, Phelps DL, Phillips CL, Schaffer DB, Tung B. (1991). Incidence and early course of retinopathy of prematurity. The cryotherapy for retinopathy of prematurity cooperative group. *Ophthalmology.* 98:1628-1640.
- Pan H, Nguyen NQ, Yoshida H, Bentzien F, Shaw LC, Rentier-Delrue F, Martial JA, Weiner R, Struman I, Grant MB. (2004). Molecular targeting of

antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:2413–2419.

- Patz A. (1980). Studies on retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 19:1133-1138.
- Pearce JW, Janardhan KS, Caldwell S, Singh B. (2007). Angiostatin and integrin alphavbeta3 in the feline, bovine, canine, equine, porcine and murine retina and cornea. *Vet Ophthalmol.* 10:313-319.
- Piwnica D, Touraine F, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial J A, Kelly PA, Goffin V. (2004). Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol.* 18:2522-2542.
- Pleyer U, Gupta D, Weidle EG, Lisch W, Zierhut M, Thiel HJ. (1991). Elevated prolactin levels in human aqueous humor of patients with anterior uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 229:447-451.
- Quiroz-Mercado H, Suarez-Tatá L, Magdalenic R, Murillo-López S, García-Aguirre G, Guerrero-Naranjo J, Rodríguez-Reyes AA. (2004). Perfluorocarbon perfused vitrectomy: animal studies. *Am J Ophthalmol.* 137:287-293.
- Quiroz-Mercado H, Roig-Meli E, Morales-Canton V, Garza-Karren C, Guerrero-Naranjo JL, Barojas-Weber E. (2000). Prevalencia y gravedad de la retinopatía diabética en una población del estado de Durango. *Rev Mex Oftalmol.* 68:61-66.
- Rymer J, Wildsoet CF. (2005). The role of the retinal pigment epithelium in eye growth regulation and myopia: a review. *Vis Neurosci.* 22:251-261.
- Schnitzer J, Karschin A. (1986) The shape and distribution of astrocytes in the retina of the adult rabbit. *Cell Tissue Res.* 246:91–102.
- Schuler LA, Lu JC, Brockman JL. (2001). Prolactin receptor heterogeneity: processing and signalling of the long and short isoforms during development. *Biochem Soc Trans.* 29:52-56.
- Secretaría de Salud. Dirección General de Estadística e Informática. Mortalidad 1998. Contexto actual y Aspectos Relevantes. 1999. ISBN-968-811-733-0.
- Sheth BP. (2002). Does pregnancy accelerate the rate of progression of diabetic retinopathy? *Curr Diab Rep.* 2:327-330.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S. (2003). Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science.* 299:117-120.
- Sinha YN. (1992). Prolactin Variants. *Trends Endocrinol Metab.* 3:100-106.
- Sinha YN. (1995). Estructural variants of prolactin: Occurrence and physiological significance. *Endocrine Rev.* 16:354-369.

- Sivak JM, Fini ME. (2002). MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Ret Eye Res.* 21:1-14.
- Skovseth DK, Veuger MJ, Sorensen DR, De Angelis PM, Haraldsen G. (2004). Endostatin dramatically inhibits endothelial cell migration, vascular morphogenesis and perivascular cell recruitment in vivo. *Blood.* 3:1-36.
- Srivatsa LP. (1994). Evolution and natural history of diabetic retinopathy during pregnancy. *Metab Ped Sys Ophthalmol.* 17:19-28.
- Stellmach V, Crawford S, Zhou W, Bouck N. (2000). Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *PNAS.* 1:1-5.
- Tabruyn SP, Sorlet CM, Rentier-Delrue F, Bours V, Weiner RI, Martial JA, Struman I. (2003). The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol.* 17:1815-1823.
- Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG. (1980). A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 51:1058-1063.
- Taniguchi H, Kitaoka T, Gong H, Amemiya T. (1999). Apoptosis of the hyaloid artery in the rat eye. *Anat Anz.* 181:555-560.
- Ting JH, Martin DK. (2006). Basic and clinical aspects of gene therapy for retinopathy induced by diabetes. *Curr Gene Ther.* 6:193-214.
- To CH, Kong CW, Chan CY, Shahidullah M, Do CW. (2002). The mechanism of aqueous humour formation. *Clin Exp Optom.* 85:335-349.
- Torner L, Mejía S, López-Gómez FJ, Quintanar A, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (1995). A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology.* 136:5454-5460.
- Triviño A, Ramírez JM, Salazar JJ, and Ramírez AI. (2000). Human retinal astroglia. A comparative study of adult and the 18 month postnatal developmental stage. *J Anat.* 196(Pt 1): 61–70.
- Triviño A, Ramírez JM, Ramírez AI, Salazar JJ, García-Sánchez J. (1997). Comparative study of astrocytes in human and rabbit retinae. *Vision Res.* 37:1707–1711.
- Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, Dills D, Kampik A, Pararajasegaram R, Verdager JT. (2003). Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology.* 110:1677-1682.

- Wong CK, Ho MA, Wagner GF. (1998). The co-localization of stanniocalcin protein, mRNA and kidney cell markers in the rat kidney. *J Endocrinol.* 158:183-189.
- Wright AD, Kohner EM, Oakley NW, Hartog M, Joplin GF, Fraser TR. (1969). Serum growth hormone levels and the response of diabetic retinopathy to pituitary ablation. *Br Med J.* 2:346-348.
- Yoshiko Y, Aubin JE, Maeda N. (2002). Stanniocalcin 1 (STC1) protein and mRNA are developmentally regulated during embryonic mouse osteogenesis: the potential of stc1 as an autocrine/paracrine factor for osteoblast development and bone formation. *J Histochem Cytochem.* 50:483-492.
- Yu-Lee LY. (1997). Molecular actions of prolactin in the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med.* 215:35-52.
- Zermeño C, Guzmán-Morales J, Macotela Y, Nava G, López-Barrera F, Kouri JB, Lavalle C, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2006). Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J Endocrinol.* 189:R1-R8.
- Zhu Y, Song D, Tran NT, Nguyen N. (2007). The effects of the members of growth hormone family knockdown in zebrafish development. *Gen Comp Endocrinol.* 150:395-404.
- Ziche M, Morbidelli L. (2000). Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol.* 50:139–148.

Prolactin in Eyes of Patients with Retinopathy of Prematurity: Implications for Vascular Regression

Zulma Dueñas,^{1,2,3} José C. Rivera,^{1,2} Hugo Quiróz-Mercado,⁴ Jorge Aranda,¹ Yazmín Macotela,¹ Pável Montes de Oca,¹ Fernando López-Barrera,¹ Gabriel Nava,¹ José L. Guerrero,⁴ Ana Suarez,⁴ Mateo De Regil,⁴ Gonzalo Martínez de la Escalera,¹ and Carmen Clapp¹

PURPOSE. Disruption of the anti-angiogenic environment of the retina leads to neovascular eye diseases, including retinopathy of prematurity (ROP). Prolactin (PRL), the hormone originally associated with milk secretion, is proteolytically processed to 16K-PRL, a fragment with potent antiangiogenic, proapoptotic effects. Whether 16K-PRL is produced in eyes of patients with ROP and promotes the regression of intraocular blood vessels associated with this disease was investigated.

METHODS. PRL was quantified in the aqueous humor, subretinal fluid, and serum from patients with stage 5 ROP and in patients with non-neovascular eye disorders. Intraocular expression of PRL was evaluated by RT-PCR, in situ hybridization, and Western blot analysis. AntiPRL antibodies were injected intravitreally in neonatal rats, and apoptosis of hyaloid vessels determined by TUNEL and ELISA.

RESULTS. PRL was elevated in ocular fluids and serum from ROP patients. There was no correlation between PRL in ocular fluids and its level in serum, whereas PRL in aqueous humor and subretinal fluid were significantly correlated. PRL mRNA was expressed in blood vessels and leukocytes within retrolental fibrovascular membranes of ROP patients, and these membranes contained a 16 kDa immunoreactive PRL. The 16K-PRL isoform was more concentrated in subretinal fluid than in serum and was generated from PRL by subretinal fluid proteases. Intravitreal injection of neutralizing antiPRL antibodies inhibited the apoptosis of hyaloid vessels in neonatal rats.

CONCLUSIONS. 16K-PRL derived from PRL internalized from the circulation or synthesized intraocularly can stimulate apoptosis-induced vascular regression and contribute to the development and progression of ROP. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:2049-2055) DOI:10.1167/iovs.03-1346

Retinopathy of prematurity (ROP) is a major cause of blindness in children throughout the world.¹ Current treatment damages the retina and is frequently only partially effective at reducing blindness. ROP is initiated by delayed retinal vascular growth after premature birth, which leads to hypoxia-induced formation of surplus abnormal vessels and the attendant risk of retinal detachment and blindness.^{1,2} These alterations reflect an imbalance between factors that either stimulate or inhibit vessel growth. Vasoproliferative retinopathies are associated with elevated levels in the eye of multiple inducers of angiogenesis, including vascular endothelial growth factor,^{3,4} basic fibroblast growth factor (bFGF),⁵ insulin-like growth factor -1,⁶ angiogenin,⁷ placental growth factor,⁸ and hepatocyte growth factor.⁹ Likewise, pigment epithelium-derived factor, a major inhibitor of angiogenesis in the eye, is downregulated during ocular neovascularization.¹⁰ However, in contrast to angiogenesis stimulators, few angiogenesis inhibitors are known to operate in the eye, and little attention has been given to the discovery of new inhibitors.¹¹ This is surprising, considering that ocular tissues are maintained physiologically without the occurrence of neovascularization, and the ocular vasculature is highly restricted despite the presence of many angiogenesis stimulators in the eye.^{5,12,13}

PRL, originally identified as a lactotrophic hormone secreted by the pituitary gland, is now known to be produced by numerous extrapituitary tissues, including endothelial cells,¹⁴⁻¹⁶ neuronal, and immune cells,¹⁷ and it is implicated in a vast array of physiological functions that range from reproduction and osmoregulation to immunomodulation and angiogenesis.^{18,19} PRL can be proteolytically cleaved to 16K-PRL, a fragment that acts as a potent inhibitor of angiogenesis both in vivo and in vitro, inhibiting endothelial cell proliferation,²⁰ and stimulating expression of the type-1 plasminogen activator inhibitor²¹ and endothelial cell apoptosis.²² The potential involvement of 16K-PRL in ocular angiogenesis is suggested by studies showing that 16K-PRL inhibits bFGF-induced corneal angiogenesis, and that implants containing antiPRL antibodies induce angiogenesis in the cornea.²³ In addition, PRL mRNA and PRL and 16K-PRL have been detected in the cornea, iris, and retina of rats,²⁴ and cultures of rat retinal capillary endothelial cells express and release PRL.¹⁶ Furthermore, hypoxia, the main trigger of ocular neovascularization, decreases PRL synthesis and suppresses its conversion to 16K-PRL in rat pituitary tumor cells.²⁵ Here, measurements were made of PRL and 16K-PRL in sera, ocular fluids and fibrovascular membranes

From the ¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro, México; and ⁴Hospital "Luis Sánchez Bulnes," Asociación para Evitar la Ceguera (APEC), México D.F., México.

²ZD and JCR contributed equally to this work.

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

Supported by National Autonomous University of Mexico Grants PUIS, and IN227502, the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT) Grant 36041-N, and Howard Hughes Medical Institute Grant 55000595.

Submitted for publication December 12, 2003; revised February 12, 2004; accepted February 25, 2004.

Disclosure: **Z. Dueñas**, None; **J.C. Rivera**, None; **H. Quiróz-Mercado**, None; **J. Aranda**, None; **Y. Macotela**, None; **P. Montes de Oca**, None; **F. López-Barrera**, None; **G. Nava**, None; **J.L. Guerrero**, None; **A. Suarez**, None; **M. De Regil**, None; **G. Martínez de la Escalera**, None; **C. Clapp**, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Carmen Clapp, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM-Juriquilla, Km 15 Carretera Qro-SLP, Querétaro, Qro., Mexico 76230; clapp@servidor.unam.mx.

from patients with ROP. Evidence is presented that they are synthesized within the eye and that 16K-PRL can promote vascular regression in ROP. A preliminary report on some of these findings has appeared (Quiroz-Mercado H, et al. *IOVS* 2000;41:ARVO Abstract 1766).

METHODS

Study Subjects

Undiluted samples of aqueous humor, subretinal fluid, serum, and retrolental fibrovascular membrane (FVM) were obtained from patients with stage 5 ROP undergoing open-sky vitrectomy. For comparison, PRL determinations in aqueous humor and serum were taken from age-matched infants undergoing intraocular surgery for congenital cataracts. The protocol for sample collection followed the tenets of the Declaration of Helsinki, was approved by the Ethics Committee of the Hospital "Luis Sánchez Bulnes," and informed consent was obtained from the infants' parents. Age at surgery ranged from 6 months to 3 years. Medical histories were taken of these patients to exclude any underlying systemic disease including diabetes mellitus, congestive heart failure, hypertension, renal or hepatic insufficiency, and seizure disorders. The duration and extent of retinal detachment were recorded. Blood samples were obtained from the anesthetized infants immediately before surgery, and sera were immediately separated by 5 minutes microfuge centrifugation, and stored at -70°C until assayed.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit for PRL was purchased from Alexon-Trend Laboratories (Ramsey, MN) and used according to instructions with a detection limit of 2 ng/mL.

Bioassay

Bioactive PRL was determined using the Nb2-cell bioassay as detailed previously.²⁶ Incubations were carried out for 48 hours in the absence or presence of different dilutions of aqueous humor, subretinal fluid, serum, or of the human PRL standard purchased from A. F. Parlow (National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA) with or without a 1:500 dilution of PRL antiserum. The human PRL antiserum (HC-1) was generated in our laboratory and characterized as described.¹⁵ Proliferation of Nb2 cells is linear in the range of 0.05 to 1 ng/mL PRL and is a standard procedure used to determine PRL levels in serum samples.²⁷

Immunoprecipitation–Western Blot Analysis

Size heterogeneity of PRL was determined in subretinal fluid and serum samples by immunoprecipitation–Western blot analysis using antiPRL antiserum (HC-1), and the previously reported technique.¹⁵ Optical density values were determined using 1D image analysis software, version 3.5 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY).

Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNA from FVM of ROP patients was obtained and RT-PCR performed essentially as described by Clapp and colleagues.²⁸ Two primers complementary to human PRL cDNA were synthesized: upstream primer from exon 2 (5'-GATGCCAGGTGACCCTTCGAGA-3') and downstream primer from exon 5 (5'-GCAGTTGTGTTGTGGATGATT-3'). RT-PCR products were confirmed by Southern blot analysis.

In Situ Hybridization

Sense and antisense PRL mRNA probes were transcribed in vitro from a linearized plasmid (pcDNA3; Invitrogen, Carlsbad, CA) containing the cDNA for human PRL with T7 and SP6 polymerases and labeled with Digoxigenin-UTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). FVM from ROP patients were washed in PBS, embedded in Tissue-Freezing Medium (Leica Instruments, Nussloch, Germany), sectioned (10 μM), and subjected to in situ hybridization performed as previously described.¹⁶

PRL Cleavage Analysis

The activity of the enzymes that cleave PRL to 16K-PRL was assayed by the reported method²⁹ with the following modifications. Briefly, 10 μL of subretinal fluid diluted 1:5 in water were mixed with 10 μL of the human PRL standard (20 ng per μL of 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4) and with 20 μL of reaction buffer (0.1 M citrate-phosphate, 0.15 M NaCl, pH 5.0) for 24 h at 37°C . The PRL cleavage products were separated by SDS-PAGE under reducing conditions and subjected to Western blot analysis.

Intravitreal Injection

An antirat PRL polyclonal antibody able to neutralize the activity of PRL and 16K-PRL in vivo²³ and in vitro was used.^{16,30} Animals were maintained and treated in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Wistar rats at postnatal day 10 (P10) were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital (20 ng per g of body weight) and their eyes intravitreally injected with 2 μL (2 μg) of purified antiPRL polyclonal antibodies, control antibodies (purified from normal serum), or vehicle only (PBS). At P13, eyes were enucleated and the hyaloid tissue removed.

Apoptosis Determination

Samples were evaluated for evidence of DNA fragmentation associated with apoptosis by the following techniques.

TUNEL assay. FVM from ROP patients or the hyaloid tissue from rats was fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4 for 10 minutes or 20 minutes, respectively. Subsequently, the tissues were washed in PBS, embedded in Tissue-Tek, sectioned (10 μm), and analyzed for apoptotic cells by terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated UTP end labeling (TUNEL) staining, using a Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and a fluorescence microscope (Olympus BX60, Lake Success, NY). Each section was visually scanned with a high power (40X) objective in a serpentine manner to record the total number of TUNEL positive cells in the entire section. The total number of TUNEL-positive cells per unit area was calculated after determining the area by tracing the outline of each section with an image analysis system attached to the microscope.

ELISA. The apoptotic cell death detection ELISA (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) was used to quantitatively determine fragmented nucleosomal DNA associated with apoptotic cell death, according to manufacturer's instructions.

Statistics

Experiments were replicated at least three times. Means were compared using Student's *t*-test, and correlations were evaluated by linear regression analysis. When comparing more than three groups, ANOVA with post hoc analysis was used. The significance level was set to 5%.

RESULTS

PRL Levels in Ocular Fluids and Serum from Patients with ROP

Samples were obtained from 48 patients (21 females and 27 males) with stage 5 ROP. The mean age of the patients was 1.2 years (range, 0.5 to 3 years). The ELISA measured PRL in all samples of subretinal fluid and serum with mean values of 23.3 ± 1.9 ng/mL and 43.0 ± 5.6 ng/mL, respectively (Fig. 1A). The concentration of PRL in serum was significantly higher ($P < 0.05$) than in subretinal fluid. In the aqueous humor, average immunoreactive PRL (4.8 ± 1.1 ng/mL) was lower ($P < 0.05$) than in the subretinal fluid, and was detected only in 51.3% of the samples (19 of 37 patients) (Fig. 1A). There was no significant correlation between PRL concentration and age ($P = 0.3$, ANOVA) or sex ($P = 0.4$, $P = 0.2$, and $P = 0.3$, for the aqueous humor, subretinal fluid, and serum, respectively).

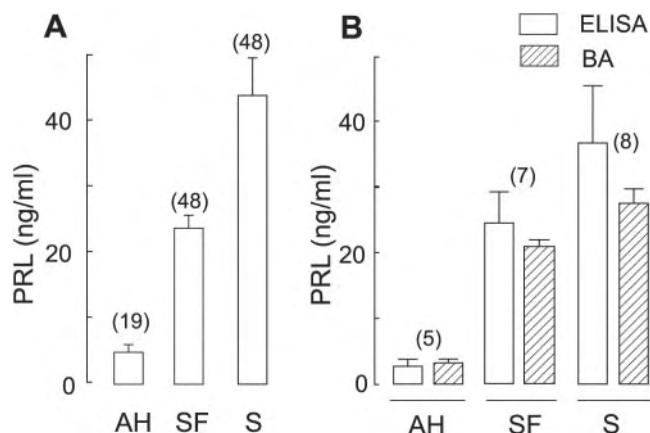


FIGURE 1. (A) PRL levels in the aqueous humor (AH), subretinal fluid (SF), and serum (S) of patients with retinopathy of prematurity determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (B) PRL levels in patients with ROP determined in the same samples by ELISA and by the specific PRL Nb2-cell bioassay (BA). The number of patients analyzed in each group is indicated in parentheses. Bars show the mean \pm SEM.

of the patients. To further substantiate the presence of PRL in ocular fluids, PRL concentration was determined in the same samples from a subgroup of ROP patients, by both ELISA and the specific PRL Nb2-cell bioassay (Fig. 1B). Both methods measured equivalent amounts of PRL. Because the sensitivity of the bioassay is 40-fold higher than that of ELISA, its use helped validate PRL concentrations in the aqueous humor, and confirmed the presence of PRL in ocular samples of ROP patients.

Elevation of PRL Levels in ROP Patients

PRL levels in ROP patients were compared to those in 18 patients (6 females and 12 males) with a non-neovascular eye disorder (congenital cataracts). The mean age of these patients was 3 years (range, 1 to 6 years). Because there is no retinal detachment in these patients, the subretinal fluid is not amenable to sampling. As in the ROP group, patients with congenital cataracts showed no correlation between PRL levels and the age or sex status. The mean PRL values measured in both the aqueous humor and serum of these patients were significantly lower than corresponding values in ROP patients (Fig. 2).

Lack of Correlation between Ocular and Circulating PRL Levels

To investigate whether ocular PRL could originate from systemic PRL, the concentrations of PRL in ocular fluids and those in serum were compared in the same individuals. However, no correlation was found between PRL concentration in aqueous humor and PRL concentration in serum ($r = 0.0103$, $P < 0.96$, Fig. 3), nor between PRL in subretinal fluid and PRL in serum ($r = 0.0993$, $P < 0.53$, Fig. 3). However, the concentration of PRL in aqueous humor was significantly correlated with its concentration in subretinal fluid ($r = 0.6791$, $P < 0.01$, Fig. 3).

PRL Synthesis in FVM of ROP Patients

RT-PCR—Southern blot analysis detected the expression of PRL mRNA in FVM from patients with ROP. RT-PCR amplified a single product with a corresponding length of 348 bp (Fig. 4A, lane 3), which is similar to the one amplified from the PRL cDNA positive control (Fig. 4A, lane 1). To localize the expression of the PRL message, FVM were subjected to in situ hybridization using an antisense PRL RNA probe. The membranes were comprised of a fibrous component with interspersed

blood vessels. PRL mRNA was detected in the vascular portions within vessel walls and in infiltrated leukocytes (Figs. 4B and 4D). In contrast, no apparent hybridization signal was found in FVM hybridized with the sense probe (Figs. 4C and 4E).

Intraocular Generation of 16K-PRL

Consistent with the translation of PRL mRNA and the posttranslational cleavage of the protein, a 16 kDa immunoreactive PRL was detected by Western blot analysis in lysates from FVM (Fig. 5A). In addition, immunoprecipitation–Western blot analysis revealed PRL immunoreactive proteins of 23 and 16 kDa in subretinal fluid and sera from three different ROP patients (Fig. 5B). The ratio of 16K-PRL to full-length protein (23K-PRL) was significantly higher ($P < 0.05$) in subretinal fluid than in serum from the same patients (1.0 ± 0.2 vs. 0.3 ± 0.08 , respectively). This difference may result from the local proteolysis of PRL by subretinal fluid proteases. To determine whether the proteolytic activity responsible for generation of 16K-PRL is present in subretinal fluid, exogenous PRL (200 ng) was incubated with 2 μ L of subretinal fluid, and PRL proteolysis was evaluated by Western blot analysis (Fig. 5C). Because the concentration of endogenous PRL in 2 μ L of subretinal fluid is not enough to be detected by Western blot analysis (Fig. 5C), any PRL-immunoreactive protein should derive from the exogenous hormone. After incubation, in addition to PRL, a second immunoreactive product was seen that corresponded in size to 16K-PRL (Fig. 5C). The generation of the 16 kDa product seemed to be attributable to the action of a protease in the subretinal fluid, because no 16K-PRL was evident when the 23K-PRL standard was incubated with heat-inactivated subretinal fluid or in the absence of subretinal fluid (Fig. 5C).

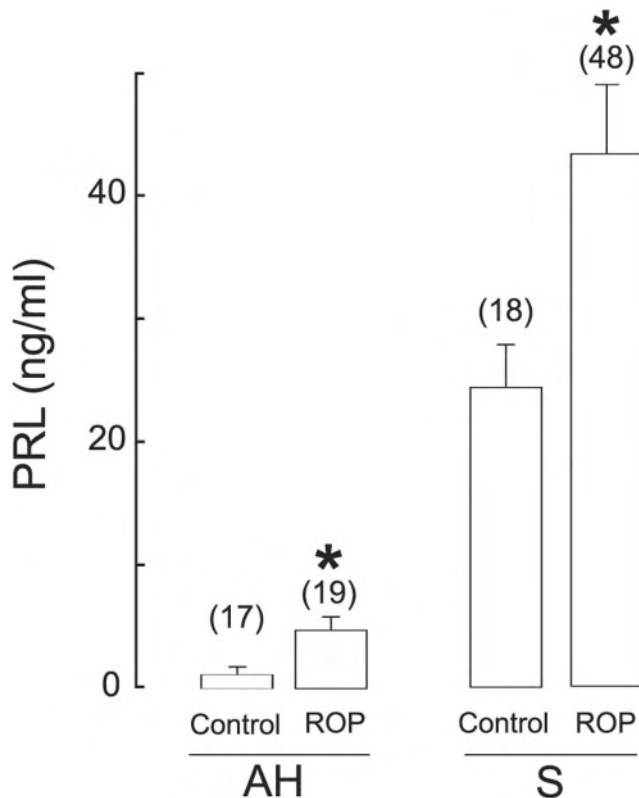


FIGURE 2. PRL levels in aqueous humor (AH) and serum (S) of patients with congenital cataracts (control) and retinopathy of prematurity (ROP) measured by ELISA. The number of patients analyzed in each group is indicated in parentheses. Bars show the mean \pm SEM; * $P < 0.05$ vs. values in control patients.

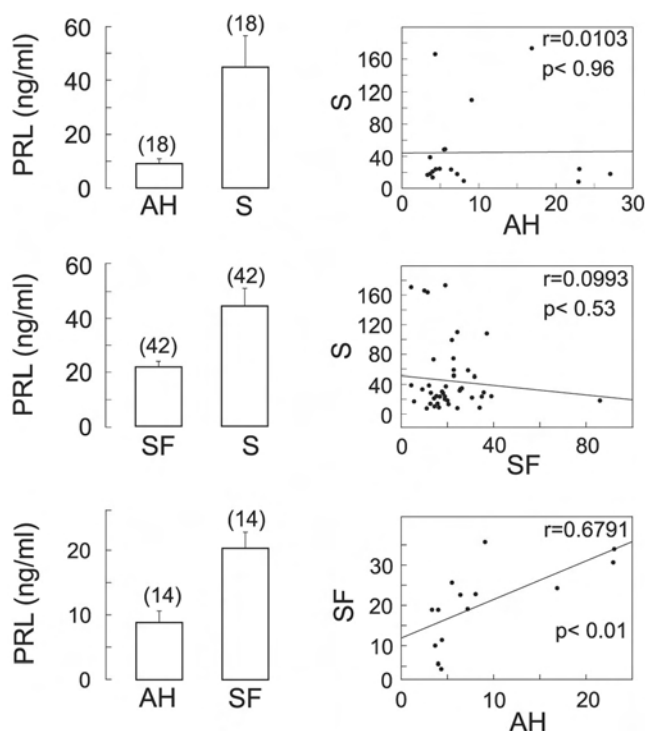


FIGURE 3. Lack of correlation between PRL levels in serum and PRL levels in aqueous humor (AH) or in subretinal fluid (SF), and significant positive correlation between PRL levels in AH and PRL levels in SF of patients with ROP. Determinations were by ELISA. The number of patients analyzed in each group is indicated in parentheses. Bars show the mean \pm SEM of the respective groups whose individual values were correlated. The correlation coefficient (r) and significance level (P) are indicated.

Apoptosis in FVM

Several TUNEL-positive cells were visualized throughout the FVM from ROP patients, many of which were associated with vascular structures (Figs. 6A, 6B, and 6C).

AntiPRL Antibodies Prevent Apoptosis in Hyaloid Vessels from Neonatal Rats

To investigate whether PRL-derived peptides could play a role in promoting apoptosis of blood vessels in FVM of ROP, evaluation was made of the effect of the intravitreal injection of neutralizing antiPRL antibodies on apoptosis of the hyaloid vascular system in neonatal rats. The hyaloid system is a transient network of intraocular vessels present during development; in humans it normally regresses by apoptosis before birth, whereas in the rat it regresses mainly between P10 and P20.³¹ We observed that at P13 the hyaloid tissue removed from rat eyes treated with control antibodies (Figs. 6D and 6E) or vehicle (not shown) showed prominent TUNEL staining in association with blood vessels and in cells interspersed within the stroma. In contrast, very few TUNEL-positive cells were detected in the hyaloid system from eyes injected with antiPRL antibodies (Figs. 6F and 6G). These differences were found to be statistically significant ($P < 0.01$) after counting the number of TUNEL-positive cells (Fig. 7A). Similarly, measurement of fragmented nucleosomal DNA by cell death ELISA showed that intravitreal administration of PRL antibodies significantly ($P < 0.01$) reduced apoptosis of the hyaloid tissue (Fig. 7B).

DISCUSSION

ROP is an ischemia-induced proliferative retinopathy that shares pathophysiological characteristics with other common ocular diseases including diabetic retinopathy and age-related macular degeneration. While different etiologies lead to insufficient perfusion of the retina, once a critical level of ischemia has been achieved, the different forms of retinopathy converge on the common hypoxia-induced formation of blood vessels that may invade the vitreous and lead to retinal detachment and blindness. Current laser therapy has reduced the incidence of blindness by suppressing neovascular growth leading to retinal detachment; however, visual outcome after treatment is often poor. Extending the knowledge of natural angiogenesis inhibitors within the eye is key to developing more effective approaches for the treatment and prevention of these diseases. 16K-PRL, a potent inhibitor of angiogenesis, is produced locally within the eye of patients with ROP, and may be involved in the regression of intraocular blood vessels.

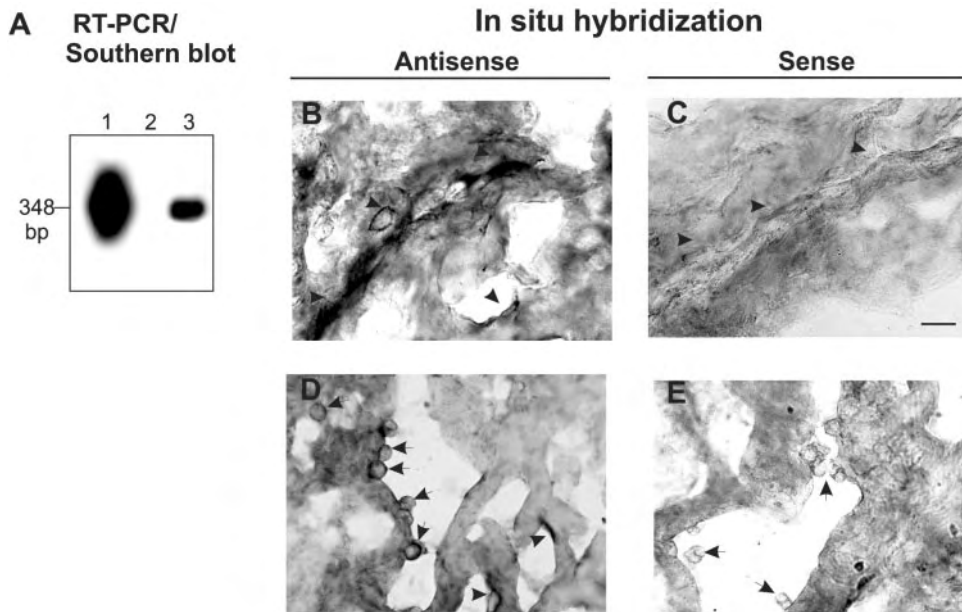
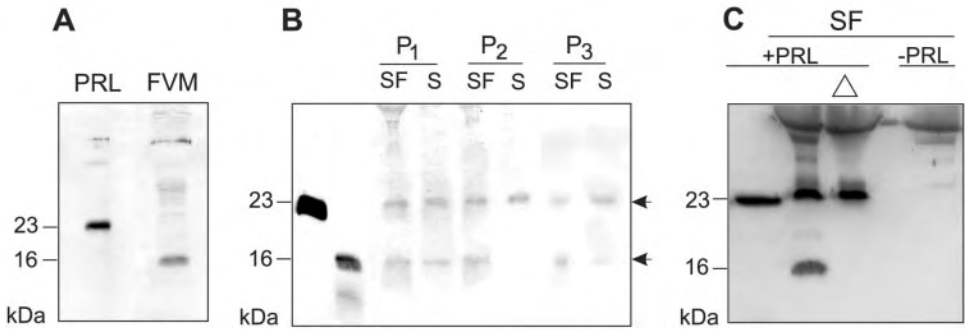


FIGURE 4. Expression of PRL mRNA in fibrovascular membranes of ROP patients. (A) Southern blot of the RT-PCR product obtained by using primers specific for PRL in fibrovascular membranes from patients with ROP (lane 3). PRL cDNA was used as a positive control (lane 1), and omission of reverse transcriptase served as a negative control (lane 2). (B) and (D) PRL mRNA is visualized by in situ hybridization with an antisense RNA probe in blood vessels (arrowheads) and in leukocytes (arrows) of fibrovascular membranes from patients with ROP. No positive signal follows hybridization with the sense probe (C, E). Scale bar = 50 μ m (B-E).

FIGURE 5. (A) Western blot analysis of immunoreactive PRL-like proteins in fibrovascular membranes (FVM) of patients with ROP. Human PRL standard marks the 23 kDa position. (B) Subretinal fluid (SF) and serum (S) samples from three different patients with ROP were immunoprecipitated and subjected to Western blot analysis. Immunoreactive proteins of 23 and 16 kDa are indicated (arrows). (C) Western blot analysis of PRL cleaved products generated after a purified human PRL standard was incubated in the absence (lane 1) or presence of subretinal fluid (SF) from patients with ROP, before (lane 2) and after heat inactivation for 30 minutes at 85°C (Δ , lane 3). SF incubated in the absence of PRL (lane 4). Blots are representative of three independent experiments.



PRL acts as a circulating hormone and as a cytokine in a wide variety of processes including angiogenesis. PRL can be posttranslationally modified by proteolytic cleavage to 16K-PRL, a fragment with antiangiogenic actions.¹⁹ PRL in the aqueous humor, subretinal fluid, and serum of patients with stage 5 ROP was determined by both ELISA and the specific Nb2-cell bioassay. The values did not vary with the gender or age of the patients, and were not influenced by emotional stress since samples were obtained from patients under general anesthesia. Actually, PRL values in serum of control patients (congenital cataracts) were equivalent to those reported in

anesthetized children (24.4 ± 3.4 vs. 18.4 ± 11.4 ng/mL, respectively) and in conscious children (13.3 to 25.5 ng/mL) with matching ages (between 1 and 6 years).^{32,33} Likewise, PRL levels in aqueous humor of control infants were similar to those reported in adult patients (0.5 to 1.9 ng/mL) undergoing cataract surgery.³⁴

Interestingly, higher PRL values were measured in serum and aqueous humor from ROP patients than from patients with a non-neovascular eye disorder (congenital cataracts). It is unclear whether this increase is functionally related to the disease. A functional connection between pituitary hormones and vasoproliferative retinopathies was hypothesized a long time ago after finding that regression of retinal neovascularization followed pituitary infarction.³⁵ In fact, based on this observation, pituitary ablation was used as a form of therapy for proliferative diabetic retinopathy.³⁶ Nevertheless, analysis of diabetics has either shown reduced circulating levels of PRL in association with severe retinopathy,³⁷ or no change in connection with this disease.³⁸ The reasons for these discrepancies are not immediately obvious, but may suggest that changes in systemic PRL relate to general conditions associated with the specific disease other than retinopathy itself. Diabetes can affect the secretion of PRL,³⁹ and several studies describe hyperprolactinemia in preterm and term infants.^{40,41}

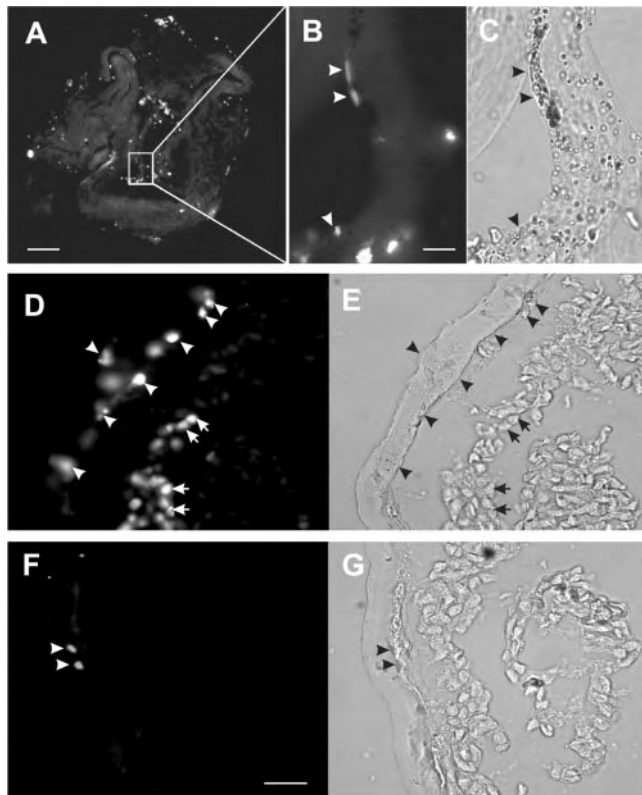


FIGURE 6. (A) TUNEL-positive cells in fibrovascular membranes from patients with ROP. Magnification of *insert* in (A) illustrates the association of TUNEL-positive cells with blood vessels (arrowheads) under fluorescence (B) and light-field microscopy (C). TUNEL-positive cells in the hyaloid vascular system of neonatal rats injected intravitreally with control antibodies (D) or antiPRL antibodies (F). Same fields illustrating TUNEL-labeled cells in blood vessels (arrowheads) under fluorescence (D, F) and light-field microscopy (E, G). Scale bar: (A) 400 μ m, (B, C) 50 μ m, and (D–G) 100 μ m.

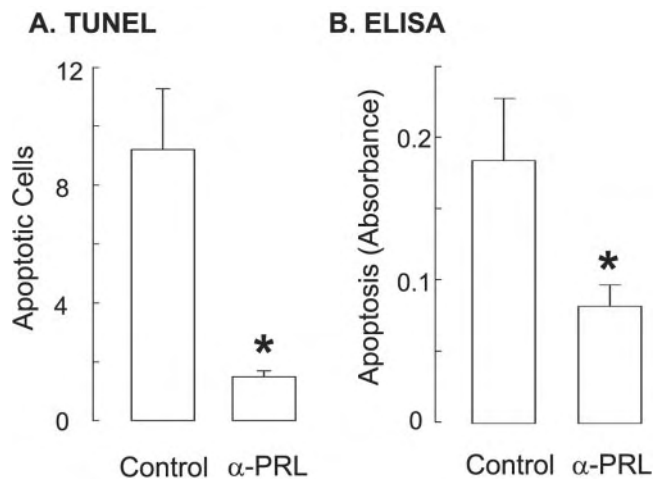


FIGURE 7. Quantitative analysis of apoptosis in the hyaloid system of the neonatal rat injected intravitreally with control antibodies (control) or with antiPRL antibodies (α -PRL). (A) The total number of TUNEL-positive cells was counted in each section and expressed per 50 μ m². (B) Apoptosis was quantified by cell-death ELISA. Absorbance was measured at 405 nm. Bars show the mean \pm SEM from three independent samples. * $P < 0.01$ vs. control.

High circulating PRL could cause an increase of its concentration in ocular fluids. Radioautographic studies have shown that iodinated PRL injected intracardially is incorporated into ocular tissues, including the retina, choroid, and ciliary body.⁴² Such incorporation could be mediated by specific receptor-mediated transport, since PRL receptors are localized in the ciliary epithelium (Dueñas Z and Clapp C, unpublished observations, 2003). Also, impairment of the blood ocular barrier in ROP patients⁴³ could favor ocular accessibility of the circulating hormone. However, against the latter, no correlation was found between the concentration of PRL in serum and PRL values in aqueous humor or in subretinal fluid of ROP patients. Nonetheless, the concentration of PRL in aqueous humor correlated significantly with that in subretinal fluid. This observation is consistent with subretinal fluid being derived mostly from the vitreous and the posterior aqueous humor flow,⁴⁴ and suggests that PRL is internalized into the eye by receptor-mediated transport at the level of the aqueous humor-producing ciliary epithelium.

In addition to its active uptake from the circulation, PRL can be synthesized intraocularly. PRL mRNA has been detected in the cornea, iris, and retina of rats,²⁴ and cultures of rat retinal capillary endothelial cells express and release PRL.¹⁶ Retrolental FVM of ROP patients express the PRL mRNA, localized within blood vessels and interspersed leukocytes. The cells expressing PRL in the blood vessels could be of endothelial origin, because endothelial cells from retinal capillaries¹⁶ and other vascular beds, in species including the human, synthesize PRL.^{14,15} Also, finding PRL mRNA in leukocytes is not surprising, since compelling evidence shows that immune cells express and respond to this hormone.¹⁷ Whereas the mRNA amplified by RT-PCR corresponded in size to the one encoding for the full-length protein (23K-PRL), Western blot analysis of homogenates from FVM only detected a 16 kDa PRL-like protein. Thus, in these membranes, as at other PRL-producing sites,¹⁹ 16K-PRL appears to be generated not by alternative splicing but by the proteolytic cleavage of PRL. The demonstration that subretinal fluid contains PRL, 16K-PRL, and PRL-cleaving enzymes, substantiates this conclusion. Also, the higher proportion of 16K-PRL found in subretinal fluid relative to that in serum provides evidence that the cleavage of PRL to 16K-PRL can take place intraocularly.

Whether derived from the cleavage of PRL internalized from the circulation or synthesized intraocularly, 16K-PRL may play an important role in the development and progression of ROP. 16K-PRL can halt angiogenesis by inducing the apoptosis of endothelial cells,²² and endothelial cell apoptosis is an important event mediating the regression of blood vessels in ROP, which in turn, can lead to the resolution of the disease.⁴⁵ Investigators have found that two thirds of infants who are born weighing 1250 g or less develop ROP, but only ~6% require treatment,⁴⁶ and that even severe ROP can undergo successful spontaneous involution.⁴⁷ This report demonstrates that blood vessels in FVM from stage 5 ROP are undergoing apoptosis-mediated regression. Because pro-apoptotic 16K-PRL is present in these membranes, 16K-PRL may promote vascular regression in ROP patients.

The vascular system in ROP membranes includes portions of the hyaloid vasculature,⁴⁸⁻⁵¹ a transient network of intraocular vessels that nourish the immature lens, retina, and vitreous. This system normally regresses before birth, but in premature infants hyaloid vessels can persist and exacerbate ROP.⁴⁸⁻⁵¹ In other mammals such as the rat, the hyaloid system remains after birth and regresses via apoptosis by the second week postpartum.³¹ To investigate whether 16K-PRL can promote the apoptosis of blood vessels in ROP, the contribution of ocular PRLs to apoptosis of hyaloid vessels in the neonatal rat was examined. Intravitreal administration of anti-PRL antibodies, but not of control antibodies, caused a significant

reduction in the number of hyaloid cells undergoing apoptosis, as measured by two independent methods. These findings are consistent with the antibodies sequestering endogenous PRLs able to promote apoptosis of hyaloid vessels, and thus, with PRL molecules having a role in retinal vascular development. Because the antibodies inhibit apoptosis of both vessel-associated and nonvessel-associated cells, it is clear that not only endothelial cells but also other cell types are targets of pro-apoptotic PRLs.

In summary, PRL levels are elevated in the circulation and in the eyes of ROP patients, suggesting that PRL-derived peptides promote the regression of retinal neovascularization in ROP. In these patients, high levels of ocular PRL, originating from internalized systemic PRL or from the hormone synthesized locally, may lead to an increase in the ocular concentration of 16K-PRL. This increase would help counterbalance pathologic angiogenesis by stimulating the apoptosis of blood vessels, and thus, contribute to the favorable resolution of the disease. In this regard, high levels of circulating PRL could have a favorable impact on the prognosis of ROP, since they may enable greater production of 16K-PRL within the eye. In addition, the finding that 16K-PRL promotes vascular regression is clinically relevant, indicating a potential treatment for patients who already have established ocular neovascularization. Notably, the observation that human milk feeding reduces ROP,⁵² can be explained on the basis of the present work, since high PRL concentrations are found in milk,⁵³ milk PRL can reach systemic circulation,⁵⁴ and PRL in systemic circulation can reach ocular fluids (present results). In conclusion, these findings link PRL peptides with the underlying causes of ROP, and with the prevention and course of the disease, and they warrant further investigation.

Acknowledgments

The authors thank María Antonieta Burgoa, Antonio Prado, Daniel Mondragón, Martín García, and Pilar Galarza for their expert technical assistance, and Dorothy D. Pless for editing the manuscript.

References

1. Wheatley CM, Dickinson JL, Mackey DA, Craig JE, Sale MM. Retinopathy of prematurity: recent advances in our understanding. *Br J Ophthalmol*. 2002;86:696-701.
2. Smith LE. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Acta Paediatr Suppl*. 2002;91:26-28.
3. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*. 1994;331:1480-1487.
4. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 1994;118:445-450.
5. Sivalingam J, Kenney GC, Brown WE, Benson WE, Donoso L. Basic fibroblast growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*. 1990;108:869-872.
6. Smith LE, Shen W, Perruzzi C, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nature Med*. 1999;5:1390-1395.
7. Ozaki H, Hayashi H, Oshima K. Angiogenin levels in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res*. 1996;28:356-360.
8. Khaliq A, Foreman D, Ahmed A, et al. Increased expression of placenta growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Lab Invest*. 1998;78:109-116.
9. Lashkari K, Hirose T, Yazdany J, Wallace J, Kazlauskas A, Rahimi N. Vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor levels are differentially elevated in patients with advanced retinopathy of prematurity. *Am J Pathol*. 2000;156:1337-1344.
10. Ogata N, Nishikawa M, Nishimura T, Mitsuma Y, Matsumura M. Unbalanced vitreous levels of pigment epithelium derived factor and vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2002;134:348-353.

11. Stone J, Maslim J. Mechanisms of retinal angiogenesis. *Prog Retin Eye Res.* 1997;16:157-181.
12. Meyer-Schwickerath R, Pfeiffer A, Blum WF, et al. Vitreous levels of the insulin-like growth factors I and II, and the insulin-like growth factor binding proteins 2 and 3, increase in neovascular eye disease. Studies in nondiabetic and diabetic subjects. *J Clin Invest.* 1993;92:2620-2625.
13. Gerhardinger C, Brown LF, Roy S, Mizutani M, Zucker CL, Lorenzi M. Expression of vascular endothelial growth factor in the human retina and in nonproliferative diabetic retinopathy. *Am J Pathol.* 1998;152:1453-1462.
14. Clapp C, López-Gómez FJ, Nava G, et al. Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *J Endocrinol.* 1998;158:137-144.
15. Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, et al. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J Endocrinol.* 2000;166:53-62.
16. Ochoa A, Montes de Oca P, Rivera JC, et al. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:1639-1645.
17. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, function, and clinical aspects. *Endocr Rev.* 1996;17:639-669.
18. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.* 1998;19:225-268.
19. Corbacho AM, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol.* 2002;173:219-238.
20. Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology.* 1993;133:1292-1299.
21. Lee H, Struman I, Clapp C, Martial J, Weiner RI. Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology.* 1998;139:3696-3703.
22. Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol.* 2000;14:1536-1549.
23. Dueñas Z, Torner L, Corbacho AM, et al. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2498-2505.
24. Dueñas Z, Nava G, Rivera JC, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Detection of prolactin expression and of the prolactin receptor in ocular tissues and fluids of the rat (Abstract). *Endocr Soc.* 1999;81:158, P1-112.
25. Cosío G, Jeziorski MC, López-Barrera F, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Hypoxia inhibits expression of prolactin and secretion of cathepsin-D by the GH4C1 pituitary adenoma cell line. *Lab Invest.* 2003;84:1627-1636.
26. Cruz J, Aviña-Zubieta A, Martínez de la Escalera G, Clapp C, Lavalle C. Molecular heterogeneity of prolactin in the plasma of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1331-1335.
27. Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51:1058-1063.
28. Clapp C, Torner L, Gutiérrez-Ospina G, et al. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophysial system and the protein is processed into a 14 kDa fragment with activity like 16kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:10384-10388.
29. Clapp C. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology.* 1987;121:2055-2064.
30. López-Gómez FJ, Torner L, Mejía S, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Immunoreactive prolactins of the neurohypophysial system display actions characteristic of prolactin and 16K prolactin. *Endocrine.* 1995;3:573-578.
31. Taniguchi H, Kitaoka T, Gong H, Amemiya T. Apoptosis of the hyaloid artery in the rat eye. *Anat Anz.* 1999;181:555-560.
32. Khilnani P, Muñoz R, Salem M, Gelb C, Todres ID, Chernow B. Hormonal responses to surgical stress in children. *J Pediatr Surg.* 1993;28:1-4.
33. Gässler N, Peuschel T, Pankau R. Pediatric reference values of estradiol, testosterone, lutro pin, follitropin and prolactin. *Clin Lab.* 2000;46:553-560.
34. Pleyer U, Gupta D, Weidle EG, Lisch W, Zierhut M, Thiel HJ. Elevated prolactin levels in human aqueous humor of patients with anterior uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1991;29:447-451.
35. Poulsen JE. The Houssay phenomenon in man: recovery from retinopathy in a case of diabetes with Simmonds' disease. *Diabetes.* 1953;2:7-12.
36. Wright AD, Kohner EM, Oakley NW, Hartog M, Joplin GF, Fraser TR. Serum growth hormone levels and the response of diabetic retinopathy to pituitary ablation. *Br Med J.* 1969;2:346-348.
37. Hunter PR, Anderson J, Lunn TA, Horrobin DF, Boyns AR, Cole EN. Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet.* 1974;1:1237.
38. Cerasola GA, Donatelli M, Sinagra D, Russo V, Amico LM, Lodato G. Study of pituitary secretion in relation to retinopathy in patients with juvenile diabetes mellitus. *Acta Diabetol Lat.* 1981;18:319-328.
39. Ikawa H, Irahara M, Matsuzaki T, Saito S, Sano T, Aono T. Impaired induction of prolactin secretion from the anterior pituitary by suckling in streptozotocin-induced diabetic rat. *Acta Endocrinol.* 1992;126:167-172.
40. Perlman M, Schenker J, Glassman M, Ben-David M. Prolonged hyperprolactinemia in preterm infants. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978;47:894-897.
41. Lucas A, Baker BA, Cole TJ. Plasma prolactin and clinical outcome in preterm infants. *Arch Dis Child.* 1990;65:977-983.
42. O'Steen WK, Sundberg DK. Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injections of iodinated prolactin. *Ophthalmic Res.* 1982;14:54-62.
43. Berrod JP, Kayl P, Rozot P, Raspiller A. Proteins in the subretinal fluid. *Eur J Ophthalmol.* 1993;3:132-137.
44. Pederson JE, Toris CB. Experimental retinal detachment. IX. Aqueous, vitreous, and subretinal protein concentrations. *Arch Ophthalmol.* 1985;103:835-836.
45. Repka MX, Palmer EA, Tung B. Involution of retinopathy of prematurity. Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Arch Ophthalmol.* 2000;118:645-649.
46. Palmer EA, Flynn JT, Hardy RJ, et al. Incidence and early course of retinopathy of prematurity. The Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Ophthalmology.* 1991;98:1628-1640.
47. IVE Name the Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group Collective Name. Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity: natural history ROP: ocular outcome at 5(1/2) years in premature infants with birth weights less than 1251 g. *Arch Ophthalmol.* 2002;120:595-599.
48. Eller AW, Jabbour NM, Hirose T, Schepens CL. Retinopathy of prematurity. The association of a persistent hyaloid artery. *Ophthalmology.* 1987;94:444-448.
49. Jabbour NM, Eller AE, Hirose T, Schepens CL, Liberfarb R. Stage 5 retinopathy of prematurity. Prognostic value of morphologic findings. *Ophthalmology.* 1987;94:1640-1646.
50. Goldberg MF. Persistent fetal vasculature (PFV): an integrated interpretation of signs and symptoms associated with persistent hyperplastic primary vitreous (PHPV). LIV Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol.* 1997;124:587-626.
51. Prenner JL, Capone A, Trese MT. Prominent tunica vasculosa lentis in a child with retinopathy of prematurity. *Retina.* 2003;23:267-268.
52. Hylander MA, Strobino DM, Pezzullo JC, Dhanireddy R. Association of human milk feedings with a reduction in retinopathy of prematurity among very low birthweight infants. *J Perinatol.* 2001;21:356-362.
53. Healy DL, Rattigan S, Hartmann PE, Herington AC, Burger HG. Prolactin in human milk: correlation with lactose, total protein, and alpha-lactalbumin levels. *Am J Physiol.* 1980;238:E83-E86.
54. Grosvenor CE, Whitworth NS. Accumulation of prolactin in maternal milk and its transfer to circulation of neonate rat: a review. *Endocrinol Exp.* 1983;17:271-286.

Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina

José C. Rivera, Jorge Aranda, Juan Riesgo, Gabriel Nava, Stéphanie Thebault, Fernando López-Barrera, Mayda Ramírez, Gonzalo Martínez de la Escalera, Carmen Clapp*

Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, 76230 Querétaro, Qro., Mexico

Received 17 September 2007; accepted in revised form 6 November 2007

Available online 12 November 2007

Abstract

Prolactin (PRL), originally associated with milk secretion, is known to have a wide variety of biological actions and diverse sites of production beyond the pituitary gland. Recent studies have demonstrated that PRL is synthesized in retinal tissue. To gain insights into the functional role of PRL in the mammalian retina, we mapped the distribution of the PRL protein and the expression and localization of the PRL receptor (PRLR) in the retina of adult rats and green monkeys. PRL was examined in retinal sections by double immunolabeling combining anti-PRL antibodies with antibodies specific for glutamine synthetase (labeling Müller cells), glial fibrillary acidic protein (labeling astrocytes), or neuronal nuclei protein (labeling neurons). PRL was detected throughout the rat retina: in the photoreceptor outer segments, Müller cells, interneurons, ganglion cells, and astrocytes. The PRLR was examined by RT–PCR, in situ hybridization, immunohistochemistry, and Western blot. The long isoform of the PRLR was localized in the photoreceptor nuclear layer, inner nuclear layer, and ganglion cell layer of rat retina. The monkey retina showed a similar distribution of PRL and PRLR immunoreactivities. These findings suggest that PRL functions as a local regulator of various cell types in the mammalian retina.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: prolactin; prolactin receptor; retina

1. Introduction

Although prolactin (PRL) was originally identified as a lactotrophic hormone secreted by the pituitary gland, accumulating evidence indicates that PRL acts both as a circulating hormone and a cytokine in a vast array of physiological functions that range from reproduction and osmoregulation to immunomodulation and angiogenesis (Bole-Feysot et al., 1998; Clapp et al., 2006). PRL synthesis has been demonstrated in numerous extra-pituitary tissues (Ben-Jonathan et al., 1996) including the retina, where in situ hybridization revealed its widespread expression (Aranda et al., 2005). Consistent with this finding, the expression of the PRL receptor (PRLR)

mRNA was detected in the retina (Ochoa et al., 2001), and early studies have shown that PRL may serve a regulatory function at this site.

PRL indeed promotes the modification of visual pigments in migratory teleosts (Allen and Cristy, 1978) and in amphibians undergoing a second metamorphosis (Crim, 1975). In rats, PRL enhances the severity of light-induced retinal photoreceptor damage (O'Steen and Kraeer, 1977), and vaso-inhibins, a family of PRL-derived peptides (Clapp et al., 2006), inhibit retinal angiogenesis. Gene transfer of vaso-inhibins via an adenoviral vector inhibits blood vessel growth in ischemia-induced retinopathy (Pan et al., 2004). Furthermore, intravitreal injection of antibodies directed against vaso-inhibins stimulates retinal angiogenesis, and intraocular transfection of small interfering RNAs to block expression of PRL, and thereby also of vaso-inhibins, promotes vessel growth and dilation (Aranda et al., 2005).

* Corresponding author. Tel.: +52 442 238 1028; fax: +52 442 238 1005.

E-mail address: clapp@servidor.unam.mx (C. Clapp).

In order to gain insight into the role of PRL as a neurotrophic factor and a source of anti-angiogenic peptides, we used immunofluorescence and cell-specific markers to establish the cellular distribution of PRL in the adult rat and green monkey retinas. We also combined *in situ* hybridization, immunofluorescence, and Western blot analyses to investigate PRLR retinal localization. We demonstrated that both proteins have a largely similar, widespread retinal distribution in mammals.

2. Materials and methods

2.1. Animal care and retinal tissue

Animal care and treatment were according to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Male Wistar rats (200–250 g) were killed by CO₂ inhalation and decapitation. The retinas were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde for one hour and placed sequentially in PBS containing 20% and 30% sucrose (24 h each). Green monkeys (*Cercopithecus aethiops sabeus*) between 4 and 6 years of age obtained from the island of St. Kitts (West Indies) were anesthetized with ketamine hydrochloride and then given a lethal dose of sodium barbitone. The monkey retinas were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h at 4 °C and then placed in 20%, then in 30% sucrose (5 days each). The tissues were frozen (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA), and 12- μ m cryostat sections were mounted on gelatin-coated slides.

2.2. Immunohistochemistry

Cryosections were blocked in PBS containing 1% bovine serum albumin, 1% normal goat serum, and 0.1% Triton X-100 for 1 h and labeled overnight at 4 °C with a 1:500 dilution of anti-PRL polyclonal antibodies (IC-5 pAb; National Hormone and Pituitary Program, Torrance, CA), or a 1:100 dilution of the anti-PRL monoclonal antibody (INN-1 mAb), provided by Peter Berger (Austrian Academy of Science, Innsbruck, Austria). Double labeling was performed with both anti-PRL antibodies and antibodies for cell-specific proteins: Müller cells [anti-glutamine synthetase mAb (GS), dilution 1:100; Chemicon International, Inc., Temecula, CA], astrocytes [anti-gial fibrillary acidic protein pAb (GFAP), dilution 1:500; Dako, Carpinteria, CA], and neurons [anti-neuronal nuclei mAb (NeuN), dilution 1:100, Chemicon]. Monkey retinas were labeled with anti-human PRL antiserum (1:500) obtained and characterized as reported (Dueñas et al., 2004) or with anti-human PRLR mAb (5 μ g/ml; Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA). After incubation with the primary antibodies, samples were rinsed 3 times in PBS and labeled for 2 h with Alexa-594-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse IgG, or Alexa-488 goat anti-rabbit or anti-mouse IgG obtained from Molecular Probes (Eugene, OR) and used at dilutions of 1:1000 (anti-rabbit) or 1:500 (anti-mouse), respectively. To investigate the PRLR distribution in rat retina, the eyes were fixed in 10% formalin for 48 h and embedded in paraffin. Sagittal 12- μ m sections were de-waxed, hydrated, blocked, and

incubated overnight with 10 μ g/ml of the T6 anti-mouse PRLR mAb, which interacts at or near the ligand-binding domain of the PRLR (Okamura et al., 1989) and was a gift from P.A. Kelly (INSERM U-584, Paris, France). The primary antibody reaction was detected using the avidin–biotin complex-detection kit (Vectastain, ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA). For control sections, incubation with primary antibodies was omitted. Labeled retinas were examined under an epifluorescence microscope (BX60; Olympus, Lake Success, NY) equipped with a digital image analysis system (Image Pro-Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD), or with a laser scanning confocal microscope (NYKON, PCM200, Melville, NY). Photographs were taken close to the optic nerve head, and images were prepared using Adobe Photoshop 11.0 Limited Edition.

2.3. *In situ* hybridization

Sense and antisense PRLR RNA probes labeled with digoxigenin were synthesized from a linearized plasmid containing the rat PRLR cDNA. Isolated retinas were fixed for 24 h in 4% formaldehyde, incubated for 24 h in RNase-free 10% sucrose-PBS, then for 3 days in 30% sucrose–PBS. Retinas were embedded in Tissue-Freezing Medium (Leica Instruments, Neussloch, Germany), sectioned (12 μ m), and mounted on slides (Superfrost/Plus; A. Daigger & Co., Vernon Hills, IL). Sections were dried for 15 min at 60 °C, fixed with 4% formaldehyde for 10–15 min in PBS, and washed in PBT (PBS + 0.1% Tween 20). Sections were incubated in a 1:1 mixture of PBT and hybridization solution (5 \times SSC, 0.1% Tween 20, 50% deionized formamide, 100 μ g/ml sonicated salmon sperm DNA) and prehybridized in hybridization solution for 1 h at 55 °C. Probes were denatured in hybridization solution and allowed to hybridize to tissue sections overnight at 55 °C. Slides were washed at 60 °C with hybridization solution and then with PBT. They were incubated for 2 h with an anti-digoxigenin antibody coupled to alkaline phosphatase (Roche, Basel, Switzerland), washed in PBT. Signal was detected using tetrazolium blue and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate as substrates in alkaline buffer (Roche).

2.4. RT–PCR analysis

Total retinal RNA was extracted and quantified. A 5- μ g sample was reverse transcribed in a 25- μ l reaction using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). Two-microliter aliquots were used for cDNA amplification by PCR using oligonucleotides specific for all forms of the PRLR (sense primer A, CCC CAA CTC CTG CTT CTT TAG, and antisense primer B, TAT TTT TGG CCC AGG AAC TA), or oligonucleotides specific for the short form (sense primer C, ATC CTG GGA CAG ATG GAG GAC, and antisense primer D, TGG CTG AGG CTG ACA AAA GAG), or for the long form (sense primer E, CCA GGA GAG TTC CGT TGA AA and antisense primer F, AGA CAG TGG GGC TTT TCT CCT). In all cases, amplification

was for 40 cycles. For primers A–B cycling was as follows: 30 s at 94 °C, 45 s at 56 °C, and 45 s at 72 °C; for primers C–D and E–F, cycling was: 30 s at 94 °C, 45 s at 56 °C, and 60 s at 72 °C. The products resulting from reactions with primers A–B, C–D, and E–F were 582 bp, 1017 bp, and 833 bp, respectively (Fig. 4A).

2.5. Immunoprecipitation and Western blot analyses

A pool of 20 rat retinas was homogenized in lysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7) and immunoprecipitated with 2.5 µg/ml anti-PRLR U-5 mAb donated by P.A. Kelly, using the previously reported technique (Corbacho et al., 2000). The U-5 mAb is directed against epitopes located outside the binding domain of the PRLR (Okamura et al., 1989). Immunoprecipitates were subjected to SDS–PAGE on a 7% acrylamide gel under reducing conditions, then blotted and probed with 2 µg/ml of the U-5 mAb. Eighty micrograms of protein from a green monkey anterior pituitary gland was subjected to reducing SDS–PAGE on a 12% acrylamide gel, and blots were probed with a 1:500 dilution of the anti-human PRL antiserum or with 1 µg/ml of the anti-human PRLR mAb. In all cases the antigen–antibody complex was detected using the alkaline phosphatase secondary antibody kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

3. Results

3.1. PRL is localized in photoreceptors, Müller cells, interneurons, ganglion cells, and astrocytes of rat retina

The distribution of PRL in rat retina was determined by using polyclonal (Fig. 1A) and monoclonal anti-rat PRL (Fig. 1B) antibodies. Both showed a similar distribution of

PRL signal in cellular bodies and processes throughout all the layers of the retina, i.e., at the photoreceptor outer segments (OS), the outer nuclear layer (ONL), the outer plexiform layer (OPL), the inner nuclear layer (INL), the inner plexiform layer (IPL), and the ganglion cell layer (GCL) (Fig. 1). No staining was observed in the absence of primary antibodies (data not shown). To identify the cells containing PRL, double fluorescent labeling was carried out with antibodies directed against proteins in Müller cells (glutamine synthetase, GS), neurons (neuronal nuclei protein, NeuN), and astrocytes (glial fibrillary acidic protein, GFAP). As one can see, anti-GS labeled Müller cells to their full extent, from their cell bodies in the center of the INL to their radial processes terminating at the outer and inner limiting membranes (Fig. 2A). Similarly, PRL immunoreactivity was present in many circular profiles of the INL and in cellular processes spanning the retina to the outer and inner membranes (Fig. 2B). Double labeling, shown by the yellow color after merging, was observed in many Müller cell bodies and processes, indicating the presence of PRL in these cells (Fig. 2C). Neuronal cell bodies in the INL and GCL were stained by both NeuN (Fig. 2D) and anti-PRL antibodies (Fig. 2E), as indicated in Fig. 2F. GFAP-positive retinal astrocytes are distributed in the GCL (Fig. 2G). We also found PRL immunoreactivity in retinal astrocytes (Fig. 2H and I).

3.2. The long form of the PRL receptor is expressed in the ONL, INL, and GCL of rat retina

The retinal distribution of the PRL receptor (PRLR) was examined by in situ hybridization and immunohistochemistry (Fig. 3). In situ hybridization using an antisense probe revealed significant retinal expression of the PRLR mRNA, mostly in the ONL and the INL, and few labeled cells in the GCL (Fig. 3A). No labeling was evident with a sense probe

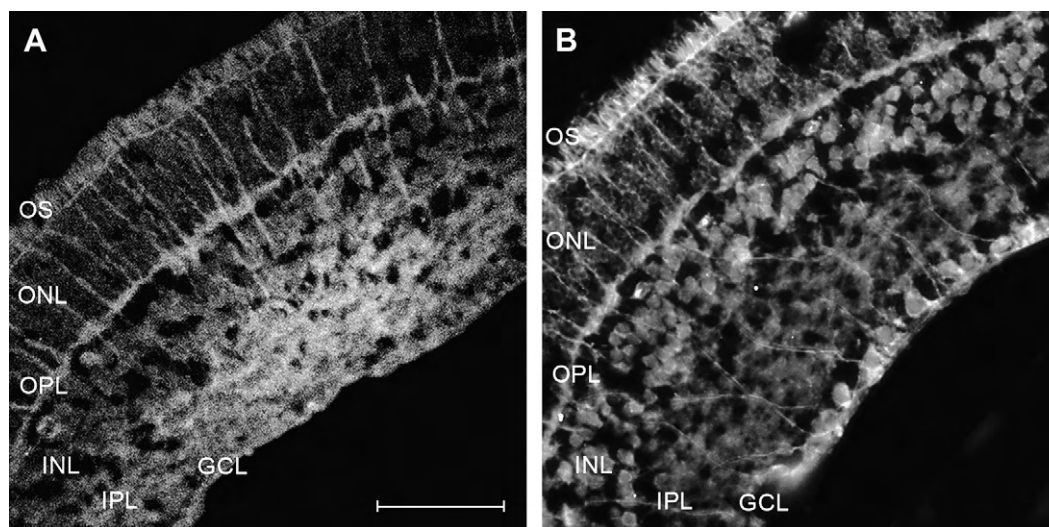


Fig. 1. Distribution of PRL in rat retina. PRL was detected in all layers of rat retina, i.e., in the photoreceptor outer segments (OS), the outer nuclear layer (ONL), the outer plexiform layer (OPL), the inner nuclear layer (INL), the inner plexiform layer (IPL), and the ganglion cell layer (GCL), using either a polyclonal (A) or monoclonal (B) anti-rat PRL antibody. Scale bar: 50 µm.

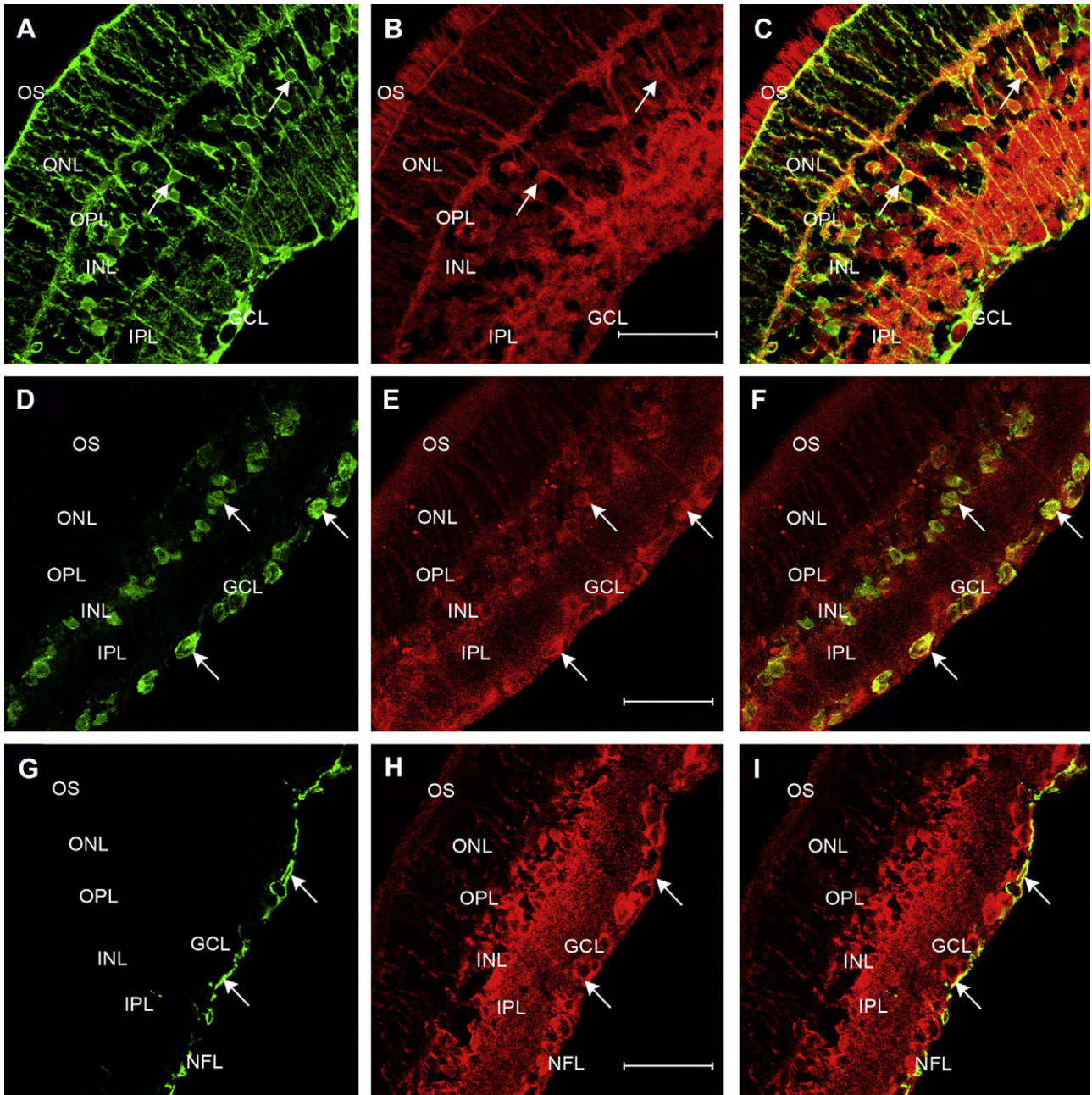


Fig. 2. Cellular distribution of PRL in rat retina. Double labeling of rat retinal sections with polyclonal (B–C, E–F) or monoclonal (H–I) anti-rat PRL and either anti-glutamine synthetase (A–C), anti-neuronal nuclei protein (D–F), or anti-glia fibrillary acidic protein (G–I) antibodies. Arrows indicate representative positive cells for each label and for the merge of both labels. Scale bar: 50 μ m.

(Fig. 3B). Immunolabeling with an anti-PRLR murine antibody stained cellular bodies and processes in the same three layers of the retina (Fig. 3C). No positive label was evident in the absence of the primary antibody (Fig. 3D).

To explore which isoform of the PRLR is expressed in retinal tissue, the PRLR mRNA was amplified using primers common to all forms of the PRLR or specific for either the short or the long isoform (Fig. 4A). Amplification of total retina RNA yielded products of 582 bp and 832 bp, expected sizes for the common and the long isoform of PRLR transcripts, respectively (Fig. 4B, lanes 4 and 5). These products migrated similarly to the control PCR bands amplified from

the rat PRLR cDNA (Fig. 4B, lanes 1 and 2). No product was amplified from retinas when primers specific for the short isoform of the PRLR were used (Fig. 4B, lane 6). To determine whether the PRLR mRNA was translated into the long PRLR protein isoform, PRLR was immunoprecipitated from retina lysates and analyzed by immunoblotting (Fig. 4C). An anti-PRLR antibody precipitated a major protein of 85 kDa, corresponding to the expected size of the long form of the PRLR (Okamura et al., 1989), and several minor bands below this size (Fig. 4C, lane 2). Some of the bands are close to the size estimated for the intermediate (65 kDa) and the short (40 kDa) PRLR variants, but additional studies are needed to

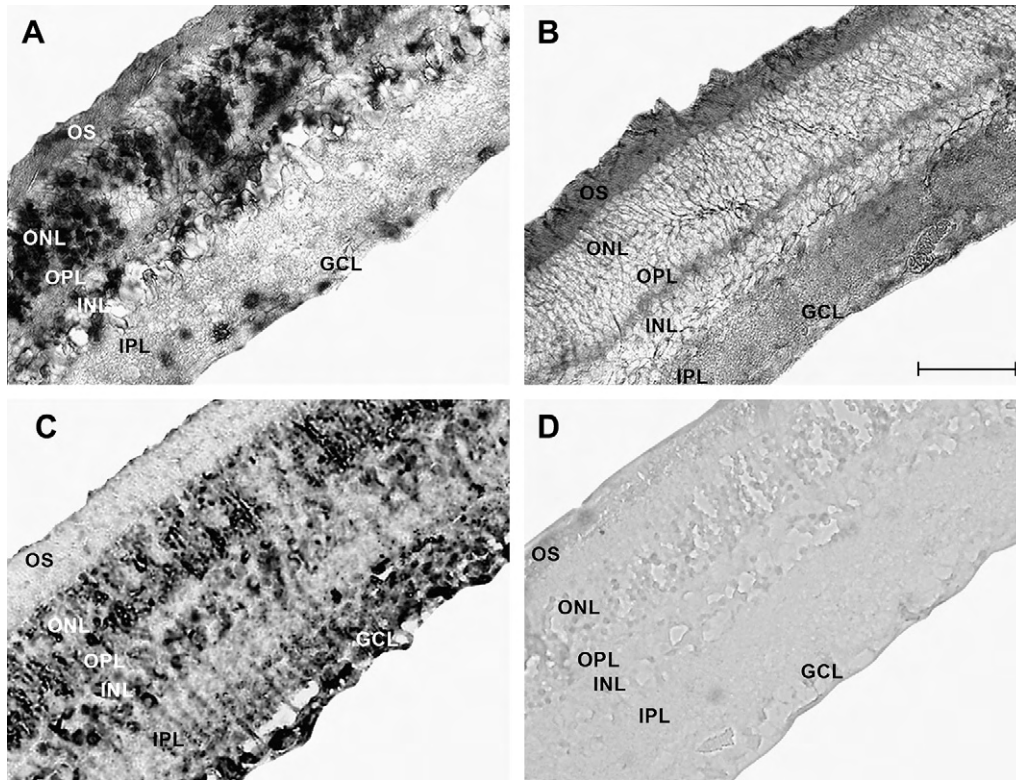


Fig. 3. Distribution of PRLR mRNA and protein in rat retina. In situ hybridization of rat retinal sections with antisense (A) or sense (B) probe for PRLR. Immunohistochemistry of rat retinal sections with anti-PRLR antibody (C) or without primary antibody (D). The photoreceptor outer segments (OS), the outer nuclear layer (ONL), the outer plexiform layer (OPL), the inner nuclear layer (INL), the inner plexiform layer (IPL), and the ganglion cell layer (GCL) are indicated. Scale bar: 50 μ m.

clarify their nature, inasmuch as no short PRLR mRNA was detected. The PRLR long and short isoforms detected from pregnant rat liver RNA were used as positive controls (Fig. 4C, lane 1).

3.3. PRL and the PRLR are localized in ONL, INL, and GCL of the green monkey retina

Reactivity of the anti-human PRL and PRLR antibodies to their cognate proteins in the green monkey was demonstrated showing their ability to bind to proteins having the expected sizes for PRL and the two PRLR isoforms in the green monkey pituitary gland (Fig. 5A and B). The anti-human PRL antiserum reacted with monkey pituitary proteins of 25, 23, and 14 kDa (Fig. 5A), the molecular masses of glycosylated PRL, unmodified PRL, and vasoinhibins (Clapp et al., 2006), respectively. Likewise, the anti-human PRLR antibody precipitated two predominant proteins of 85 and 40 kDa (Fig. 5B), the expected molecular weights for the long and short isoforms of the PRLR, respectively. Immunohistochemistry showed a widespread distribution of PRL immunoreactivity in cell bodies and processes of the monkey retina, with the most prominent labeling in the photoreceptors (OS and ONL), the GCL, and the nerve fiber layer (NFL) (Fig. 5C). The presence of positive axons in the NFL supported the localization of PRL within ganglion cells of the GCL. Of note, despite a weaker signal, positive staining was observed in the OPL, INL and

IPL. Similarly, PRLR labeling was localized throughout the retina, but it was especially abundant at the photoreceptors (OS), OPL, IPL, and GCL (Fig. 5D). No staining was observed in the absence of primary antibodies (data not shown).

4. Discussion

To provide normal vision, the retina produces biological mediators that act in an autocrine/paracrine manner to regulate the function of multiple layers of neurons, glial cells, and blood vessels. The present study demonstrates that various types of retinal cells express the PRLR and its ligand PRL, a pleiotropic protein with effects on cell differentiation, growth, and survival. This is the first histological visualization of PRL and the PRLR proteins in the retina of any species.

Immunolabeling studies indicate that the PRL protein is broadly distributed in both the rat and green monkey retinas. The specificity of the immunodetection is supported by the use of both monoclonal and polyclonal anti-PRL antibodies and by the lack of immunostain in their absence. Moreover, the distribution of PRL parallels the reported expression of its mRNA in the ONL, INL, and GCL of rat retinas (Aranda et al., 2005). Accordingly, the PRL protein is located in photoreceptor segments and in Müller cells. Antibodies against GS label Müller cells (Riepe and Norenburg, 1977), and we found almost complete co-localization of GS and PRL immunoreactivities in cell bodies and processes with the characteristic

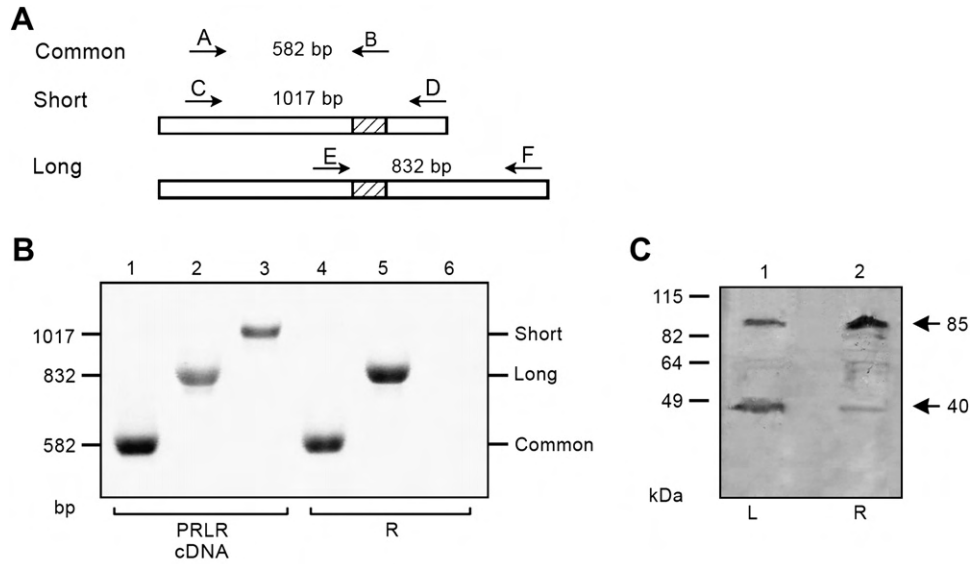


Fig. 4. Expression of PRLR in rat retina. (A) Schematic representation of expected PCR products using primers (arrows) complementary to the PRLR gene. The predicted sizes of PCR products for each primer combination are given in base pairs (bp). (B) RT-PCR analysis of reverse-transcribed total RNA from rat retinas (R, lanes 4–6) amplified with the three combinations of PRLR primers shown in (A). Similar PCR products were amplified from rat PRLR cDNA (lanes 1–3). (C) Western blot analysis probed with anti-PRLR antibody showing an 85-kDa immunoreactive protein in tissue lysate from rat retinas (R) and rat liver (L). Arrows indicate the long (85-kDa) and short (40-kDa) isoforms of PRLR.

Müller cell morphology. In addition, co-localization of PRL immunostaining with that of cell-type specific markers revealed the presence of endogenous PRL in interneurons, ganglion cells, and astrocytes. These findings suggest that PRL may subservise both autocrine- and paracrine-specific functions in these distinct cellular locations.

Consistent with the distribution of PRL, we here identify the PRLR in the retina and provide the first anatomical evidence that PRL transduction pathways may operate in different retinal cell types. PRL receptors exist in several isoforms that differ primarily in the sequence and length of the cytoplasmic domain (Bole-Feysot et al., 1998). We found that in the retina most of the receptor corresponds to the long form, which is the isoform responsible for transducing PRL signaling in most cells (Schuler et al., 2001). The lack of detection of the short isoform of PRLR mRNA when a minor band that likely corresponds to the protein can be observed, could result from non specific cross-reactivity of antibodies or, as discrepancies between protein and mRNA expression have been already reported (Wong et al., 1998; Yoshiko et al., 2002), a lower mRNA stability in comparison to the protein stability. The PRLR mRNA and protein were localized in photoreceptor cells and in cells of the INL and GCL of both rat and green monkey retinas. The similarity with PRL distribution indicates that these are the receptors likely to be available to interact with the PRL produced by the same or neighboring retinal cells.

Little is known about the functional role of PRL in the retina. The prominent expression of PRL and the PRLR within photoreceptors coincides with early studies showing that PRL can promote the modification of visual pigments in migratory teleosts (Allen and Cristy, 1978) and in amphibians undergoing a second metamorphosis (Crim, 1975). In rats, PRL was

proposed to enhance the severity of light-induced retinal photoreceptor damage. Removal of the pituitary gland protected photoreceptors from light destruction, and PRL administration reversed the protective effect of hypophysectomy (O'Steen and Kraer, 1977). While systemic PRL, internalized into the eye by active uptake (O'Steen and Sundberg, 1982), could act directly on photoreceptors, our findings suggest that PRL is also an autocrine regulator of their function. In addition, local PRL may function as a trophic factor for Müller cells, interneurons, ganglion cells, and astrocytes. For example, genetic deletion of PRL in zebra fish results in reduced eye size (Zhu et al., 2007), suggesting that PRL participates in eye development. It is also known that eye growth is sensitive to visual experience and that neural retina itself is a source of growth-regulatory signals where PRL might play a role (Rymer and Wildsoet, 2005). PRL can act on the central nervous system to promote neuron (Shingo et al., 2003) and astrocyte growth (DeVito et al., 1992) and to control the release of neurotransmitters, neuropeptides, and cytokines (Ben-Jonathan et al., 1996). Interestingly, PRL increases the expression of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and transforming growth factor- α in brain astrocytes (DeVito et al., 1995), and some of these cytokines are induced after retinal detachment in retinal glial cells, including astrocytes and Müller cells (Nakazawa et al., 2006).

Importantly, PRL-derived peptides are natural inhibitors of retinal angiogenesis. PRL is proteolytically cleaved in the retina to yield vaso-inhibins, a family of PRL fragments that act on endothelial cells to inhibit blood vessel growth, dilation, and to promote apoptosis-mediated vascular regression (Clapp et al., 2006). PRL and vaso-inhibins have been detected by Western blot in rat retinal homogenates (Aranda et al., 2005), and the blockage of vaso-inhibins, by the intravitreal

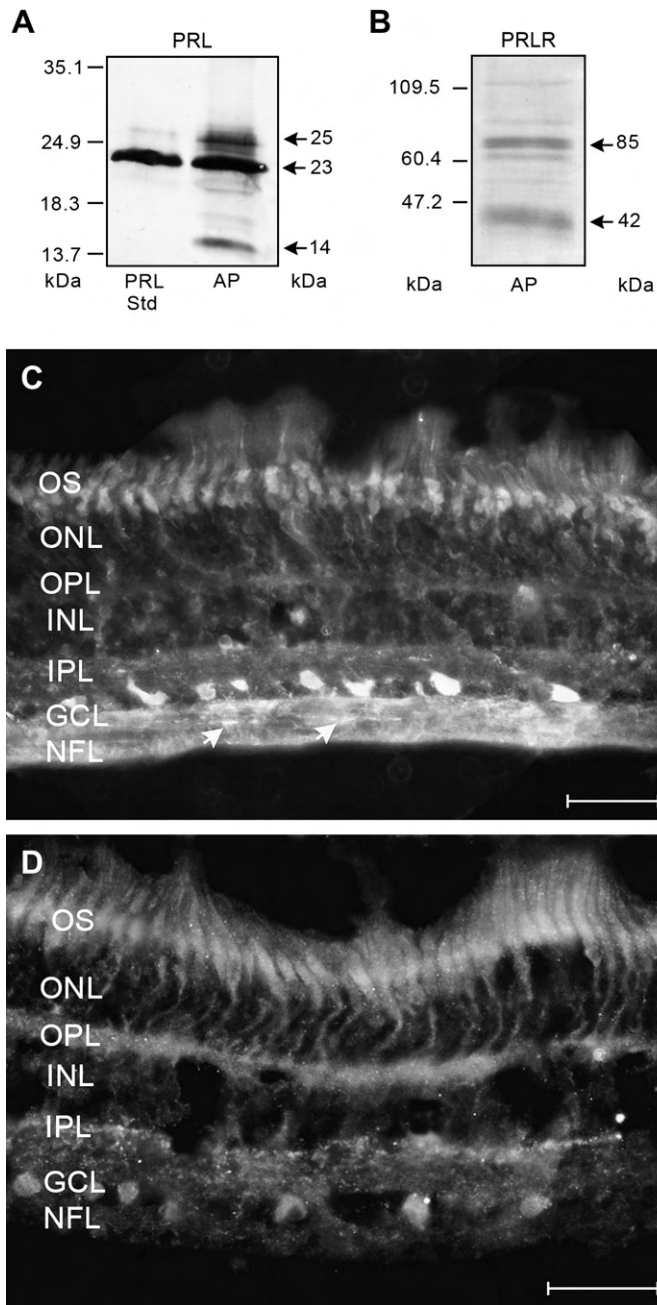


Fig. 5. Expression of PRL and PRLR in green monkey retina. Western blot analysis probed with anti-human PRL serum (A) or anti-human PRLR antibody (B) in green monkey adenohypophysis (AP) lysates. PRL standard (PRL Std) used shows a 23-kDa immunopositive control. Immunohistochemistry of green monkey retina sections with anti-human PRL (C) or anti-human PRLR (D) antibodies. The photoreceptor outer segments (OS), the outer nuclear layer (ONL), the outer plexiform layer (OPL), the inner nuclear layer (INL), the inner plexiform layer (IPL), the ganglion cell layer (GCL), and the inner fiber layer (IFL) are indicated. Arrow heads show positive axons in nerve fiber layer (NFL). Scale bar: 50 μ m.

injection of small interfering RNAs or neutralizing antibodies, stimulates vessel growth and dilation in the retina (Aranda et al., 2005) and inhibits apoptosis-mediated regression of hyaloid vessels during development (Dueñas et al., 2004). It is clear that this study does not allow distinguishing between

the localization of PRL and vasoinhibins in the retina. However, the facts that vasoinhibins have been detected in retinal extracts (Aranda et al., 2005) and are generated upon PRL proteolysis suggest that these peptides could be generated upon PRL cleavage at the different cellular locations. Indeed, the localization of PRL, and potentially of vasoinhibins, in photoreceptors, Müller cells, ganglion cells, and astrocytes is consistent with the observation that these cells produce anti-angiogenic factors, including pigment epithelium-derived growth factor (Karakousis et al., 2001), chondromodulin-I (Funaki et al., 2001), and proteolytically generated angiostatin (Pearce et al., 2007).

Monkey retinas were immunolabeled with a polyclonal antibody that recognizes several pituitary PRL isoforms, including vasoinhibins. The correspondence between the distribution of PRL-immunoreactivity in rat and monkey retinas suggests that the retinal distribution of PRL and vasoinhibins might be conserved throughout mammalian evolution. In this regard, PRL and vasoinhibins have been detected in the subretinal fluid and fibrovascular membranes of patients with retinopathy of prematurity (Dueñas et al., 2004). Vasoinhibins act directly on endothelial cells through a still-unidentified, saturable, high-affinity binding site distinct from the PRLR (Clapp and Weiner, 1992), and their mechanisms of action are only partially known (Clapp et al., 2006). Notably, vasoinhibins inhibit VEGF-mediated activation of MAPK at the level of ras (D'Angelo et al., 1999) and can block VEGF-induced activation of endothelial NOS by inhibiting the mobilization of intracellular calcium (Gonzalez et al., 2004).

In conclusion, we show that various cell types of the mammalian retina produce PRL and its receptor. These findings support a functional role of PRL and potentially vasoinhibins at different retinal cellular locations, and warrant further investigation.

Acknowledgments

We thank Daniel Mondragón, Antonio Prado, Martín García, Elsa Nidia Hernández, and Pilar Galarza for their technical assistance, and Dorothy D. Pless for critically editing the manuscript. This study was supported by the National Council of Science and Technology of Mexico grant SALUD-2004-CO2-16.

References

- Allen, D.M., Cristy, M., 1978. Thiourea does not block visual pigment responses to prolactin in trout. *Vision Res.* 18, 859–860.
- Aranda, J., Rivera, J.C., Jeziorski, M.C., Riesgo-Escovar, 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.* 46, 2947–2953.
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen, D.L., Steinmetz, R.W., 1996. Extrahypothalamic prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.* 17, 639–669.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P.A., 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19, 225–268.

- Clapp, C., Weiner, R.I., 1992. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 130, 1380–1386.
- Clapp, C., Aranda, J., Gonzalez, C., Jeziorski, M.C., Martinez de la Escalera, G., 2006. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 301–307.
- Corbacho, A.M., Macotela, Y., Nava, G., Torner, L., Duenas, Z., Noris, G., Morales, M.A., Martinez De La Escalera, G., Clapp, C., 2000. Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J. Endocrinol.* 166, 53–62.
- Crim, J.W., 1975. Prolactin-induced modification on visual pigments in the eastern red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 26, 233–242.
- D'Angelo, G., Martini, J.F., Iiri, T., Fantl, W.J., Martial, J., Weiner, R.I., 1999. 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol. Endocrinol.* 13, 692–704.
- DeVito, W.J., Okulicz, W.C., Stone, S., Avakian, C., 1992. Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology* 130, 2549–2556.
- DeVito, W.J., Avakian, C., Stone, S., Okulicz, W.C., Tang, K.T., Shamgochian, M., 1995. Prolactin induced expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-alpha in cultured astrocytes. *J. Cell. Biochem.* 57, 290–298.
- Duenas, Z., Rivera, J.C., Quiroz-Mercado, H., Aranda, J., Macotela, Y., Montes de Oca, P., Lopez-Barrera, F., Nava, G., Guerrero, J.L., Suarez, A., et al., 2004. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2049–2055.
- Funaki, H., Sawaguchi, S., Yaoeda, K., Koyama, Y., Yaoita, E., Funaki, S., Shirakashi, M., Oshima, Y., Shukunami, C., Hiraki, Y., et al., 2001. Expression and localization of angiogenic inhibitory factor, chondromodulin-I, in adult rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1193–1200.
- Gonzalez, C., Corbacho, A.M., Eiserich, J.P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., Barajas-Espinosa, A., Diaz-Munoz, M., Rubio, R., Lin, S.H., et al., 2004. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* 145, 5714–5722.
- Karakousis, P.C., John, S.K., Behling, K.C., Surace, E.M., Smith, J.E., Hendrickson, A., Tang, W.X., Bennett, J., Milam, A.H., 2001. Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol. Vis.* 7, 154–163.
- Nakazawa, T., Matsubara, A., Noda, K., Hisatomi, T., She, H., Skondra, D., Miyahara, S., Sobrin, L., Thomas, K.L., Chen, D.F., et al., 2006. Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. *Mol. Vis.* 12, 867–878.
- O'Steen, W.K., Kraer, S.L., 1977. Effects of hypophysectomy, pituitary gland homogenates and transplants, and prolactin on photoreceptor destruction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16, 940–946.
- O'Steen, W.K., Sundberg, D.K., 1982. Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic Res.* 14, 54–62.
- Ochoa, A., Montes de Oca, P., Rivera, J.C., Duenas, Z., Nava, G., de La Escalera, G.M., Clapp, C., 2001. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1639–1645.
- Okamura, H., Zachwieja, J., Raguet, S., Kelly, P.A., 1989. Characterization and applications of monoclonal antibodies to the prolactin receptor. *Endocrinology* 124, 2499–2508.
- Pan, H., Nguyen, N.Q., Yoshida, H., Bentzien, F., Shaw, L.C., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Weiner, R., Struman, I., Grant, M.B., 2004. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 2413–2419.
- Pearce, J.W., Janardhan, K.S., Caldwell, S., Singh, B., 2007. Angiostatin and integrin alphavbeta3 in the feline, bovine, canine, equine, porcine and murine retina and cornea. *Vet. Ophthalmol.* 10, 313–319.
- Riepe, R.E., Norenburg, M.D., 1977. Muller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature* 268, 654–655.
- Rymer, J., Wildsoet, C.F., 2005. The role of the retinal pigment epithelium in eye growth regulation and myopia: a review. *Vis. Neurosci.* 22, 251–261.
- Schuler, L.A., Lu, J.C., Brockman, J.L., 2001. Prolactin receptor heterogeneity: processing and signalling of the long and short isoforms during development. *Biochem. Soc. Trans.* 29, 52–56.
- Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C., Weiss, S., 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299, 117–120.
- Wong, C.K., Ho, M.A., Wagner, G.F., 1998. The co-localization of stanniocalcin protein, mRNA and kidney cell markers in the rat kidney. *J. Endocrinol.* 158, 183–189.
- Yoshiko, Y., Aubin, J.E., Maeda, N., 2002. Stanniocalcin 1 (STC1) protein and mRNA are developmentally regulated during embryonic mouse osteogenesis: the potential of stc1 as an autocrine/paracrine factor for osteoblast development and bone formation. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 483–492.
- Zhu, Y., Song, D., Tran, N.T., Nguyen, N., 2007. The effects of the members of growth hormone family knockdown in zebrafish development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 150, 395–404.