



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA  
"LUIS CASTELAZO AYALA"

**“Prolactina urinaria como marcador confiable  
para preeclampsia, su gravedad y la presencia  
de eventos adversos en el embarazo”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO EN LA ESPECIALIDAD DE:

**GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA**

PRESENTA:

**DRA. SARA BERMEJO HUERTA**

ASESOR DE TESIS  
DR. ALFREDO LEAÑOS MIRANDA

MEXICO D.F. AGOSTO 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.

---

Dr. Gilberto Tena Alavéz

Director General

---

Dr. Carlos Emiro Morán Villota

Director de Investigación y Educación en Salud

---

Dr. Alfredo Leños Miranda

Asesor de Tesis.

Investigador Titular Unidad Médica de Alta Especialidad

UMAE Luis Castelazo Ayala

## INDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCION	4
PACIENTES Y METODOS	5
INMUNOENSAYO DE LA PRL.	6
ANÁLISIS POR WESTERN BLOT.	7
INCUBACIÓN DE hPRL CON ORINA O CATEPSINA D	9
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	9
RESULTADOS	10
CONCENTRACIONES DE PRL SÉRICA Y URINARIA.	11
WESTERN BLOT DE PRL INMUNORREACTIVA EN ORINA Y SUERO.	17
RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE PRL URINARIA NORMALIZADA CON LA CREATININA Y LA PRESENCIA DE LAS ISOFORMAS DE PRL DE 14 Y/O 16 kDA Y LA GRAVEDAD DE LA PREECLAMPSIA.	18
RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE PRL URINARIA NORMALIZADA A CREATININA Y LA PRESENCIA DE LAS ISOFORMAS DE LA PRL DE 14 Y/O 16 kDA CON LOS RESULTADOS ADVERSOS DEL EMBARAZO EN LA PREECLAMPSIA SEVERA.	20
DISCUSION	21
REFERENCIAS	26

ARTICULO ORIGINAL PUBLICADO

J Clin Endocrinol Metab 93: 2492-2499, 2008.

# Prolactina urinaria como un marcador confiable para preeclampsia, su gravedad, y la presencia de eventos adversos en el embarazo.

## Resumen

Contexto. Ha sido propuesto que la preeclampsia puede ser el resultado de un imbalance en los factores angiogénicos. Aunque la prolactina (PRL) esta principalmente relacionada a la lactación, también esta involucrada en otras funciones biológicas, incluyendo la angiogénesis.

Objetivo. El objetivo fue determinar la relación entre la preeclampsia, la concentración sérica y urinaria de PRL, y la excreción de los fragmentos anti-angiogénicos de PRL en orina.

Diseño del estudio. Usando un diseño transversal, la concentración sérica y urinaria de PRL y la presencia de isoformas de la PRL fueron determinadas en 546 mujeres embarazadas (207 embarazadas sanas, 124 con hipertensión gestacional, 48 con preeclampsia leve y 167 con preeclampsia severa).

Resultados. Las concentraciones de PRL urinaria fueron significativamente ( $p < 0.001$ ) mayores en la preeclampsia [11.99 ng/mg creatinina] que en la embarazadas sanas [0.20 ng/mg creatinina] y la hipertensión gestacional [0.19 ng/mg creatinina], e incluso fueron mayores en la preeclampsia severa en comparación a la preeclampsia leve [21.20 vs. 2.77 ng/mg de creatinina, respectivamente ( $p < 0.001$ )]. Los fragmentos anti-angiogénicos de la PRL (14-16 kDa) fueron detectados en 21.6% de las muestras urinarias de las mujeres con preeclampsia severa, pero en ninguna de los otros grupos de estudio. Las pacientes con Síndrome HELLP y/o eclampsia, desprendimiento prematuro de placenta normoinserta, insuficiencia renal aguda o edema agudo de pulmón exhibieron las más altas concentraciones de PRL urinaria ( $p \leq 0.028$ ) y una mayor frecuencia de la presencia de fragmentos anti-angiogénicos

de la PRL en orina ( $p \leq 0.036$ ). Concentraciones altas de PRL sérica fueron asociadas con la preeclampsia severa independientemente de la edad gestacional, proteinuria y prolactinuria ( $p=0.032$ ).

Conclusiones. La preeclampsia se caracteriza por una excreción incrementada de PRL urinaria. La concentración urinaria de PRL y de sus isoformas mostraron ser marcadores adecuados para evaluar la severidad de la preeclampsia y la ocurrencia de cursos adversos. La PRL y/o sus isoformas pueden estar involucradas en la fisiopatología de la preeclampsia.

## Introducción

La preeclampsia es una enfermedad multisistémica específica del embarazo caracterizada por disfunción endotelial (1). La preeclampsia se presenta del 5% al 8% de todas las mujeres embarazadas y se mantiene como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y perinatal en todo el mundo (2-4). Aunque la etiología de este síndrome específico del embarazo no está clara, recientes evidencias sugieren que la preeclampsia puede ser el resultado de un imbalance en los factores angiogénicos (5,6) el cual daña el endotelio vascular materno, provocando las manifestaciones clínicas de esta condición (7-9). Debido a su prevalencia y gravedad, varios factores angiogénicos y anti-angiogénicos en suero y orina han sido evaluados como marcadores diagnósticos para esta complicación del embarazo o para determinar su gravedad (6,10-13).

La preeclampsia es una enfermedad compleja, en algunos casos el diagnóstico no es claro y hay cierta dificultad para identificar aquellas mujeres que están en riesgo de presentar resultados adversos del embarazo. Por lo tanto, hay una necesidad crítica para el descubrimiento de nuevos y confiables marcadores para la predicción, clasificación y la monitorización de la severidad de esta enfermedad, así como para identificar aquellas pacientes que pueden estar en riesgo de resultados adversos maternos y fetales. A este respecto, las mediciones de proteínas específicas excretadas en orina pueden ser clínicamente útil.

La Prolactina (PRL) es una hormona polipéptidica secretada principalmente por la hipófisis anterior. Un incremento fisiológico sustancial en las concentraciones de PRL sérica se produce durante el embarazo. Aunque las funciones biológicas más conocidas de la PRL están relacionadas con la lactancia y la reproducción, esta hormona también se ha asociado a otros procesos fisiológicos, incluyendo la angiogénesis (14,15). La principal isoforma circulante de la PRL es una cadena

polipeptídica de 23 kDa (PRL monomérica), que comprende hasta el 90% del total de la PRL; menores cantidades de big PRL y big big PRL (45-50 kDa y >100 kDa, respectivamente) también se pueden detectar utilizando cromatografía de filtración en gel (16,17). En adición, existen dos isoformas de la PRL que son el resultado del rompimiento proteolítico de la PRL monomérica (fragmentos de 16 kDa y 14 kDa) (18), y que tienen efectos anti-angiogénicos (19,20). Dado que la angiogénesis anormal es un componente esencial de la patogenia de la preeclampsia y teniendo en cuenta que la PRL tiene efectos pro y anti-angiogénicos, pensamos que la PRL podría ser un potencial candidato como biomarcador para esta enfermedad. Para analizar la relación entre la preeclampsia y la PRL, hemos medido la concentración sérica de PRL y la excreción urinaria de PRL y evaluamos la heterogeneidad molecular de la PRL en un gran número de mujeres embarazadas sanas y pacientes con desordenes hipertensivos del embarazo.

### **Pacientes y Métodos**

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de nuestro Instituto. En todas las pacientes se obtuvo el consentimiento informado por escrito. Todas las mujeres fueron pacientes ingresadas en el Departamento de Enfermedades Hipertensivas del Embarazo de nuestro Hospital. Las participantes del estudio tenían una edad gestacional  $\geq 20$  semanas e hipertensión de reciente inicio. La hipertensión fue definida como una presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg y/o una presión arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg, medida dos veces con un intervalo de por lo menos 6 horas, y que reversionó a valores normales dentro de los 3 meses posteriores al parto o cesárea. Los desordenes hipertensivos del embarazo fueron definidos de acuerdo a los criterios del Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia (21). La hipertensión gestacional se definió como hipertensión aislada sin proteinuria significativa y la

preeclampsia leve como hipertensión y proteinuria significativa [ $\geq 300$ mg de proteínas en orina de 24 horas o una relación proteína:creatinina  $\geq 0,30$  en una muestra de orina al azar (22)]. La preeclampsia severa fue considerada en la presencia de: Síndrome HELLP (hemólisis, enzimas hepáticas elevadas, recuento bajo de plaquetas), eclampsia, preeclampsia con hipertensión severa (presión arterial sistólica  $\geq 160$  mmHg y/o presión arterial diastólica  $\geq 110$  mmHg en al menos 2 ocasiones con 6 horas de diferencia) o proteinuria masiva [ $\geq 5$  g/día o una relación proteína:creatinina  $\geq 3,87$  (22)]. Otros parámetros incluidos en su definición fueron: recién nacido pequeño para la edad gestacional o restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) [definido como un bebé cuyo peso al nacer estaba por debajo de la percentila 10 (23)], cefalea persistente o alteraciones visuales, presencia de hemólisis o niveles anormales de enzimas hepáticas con dolor epigástrico o en el cuadrante superior derecho, trombocitopenia ( $< 100,000/\mu\text{l}$  en al menos dos muestras), creatinina sérica mayor de 1.0 mg/dL, edema agudo de pulmón, oliguria ( $< 500$  ml/día) u oligohidramnios.

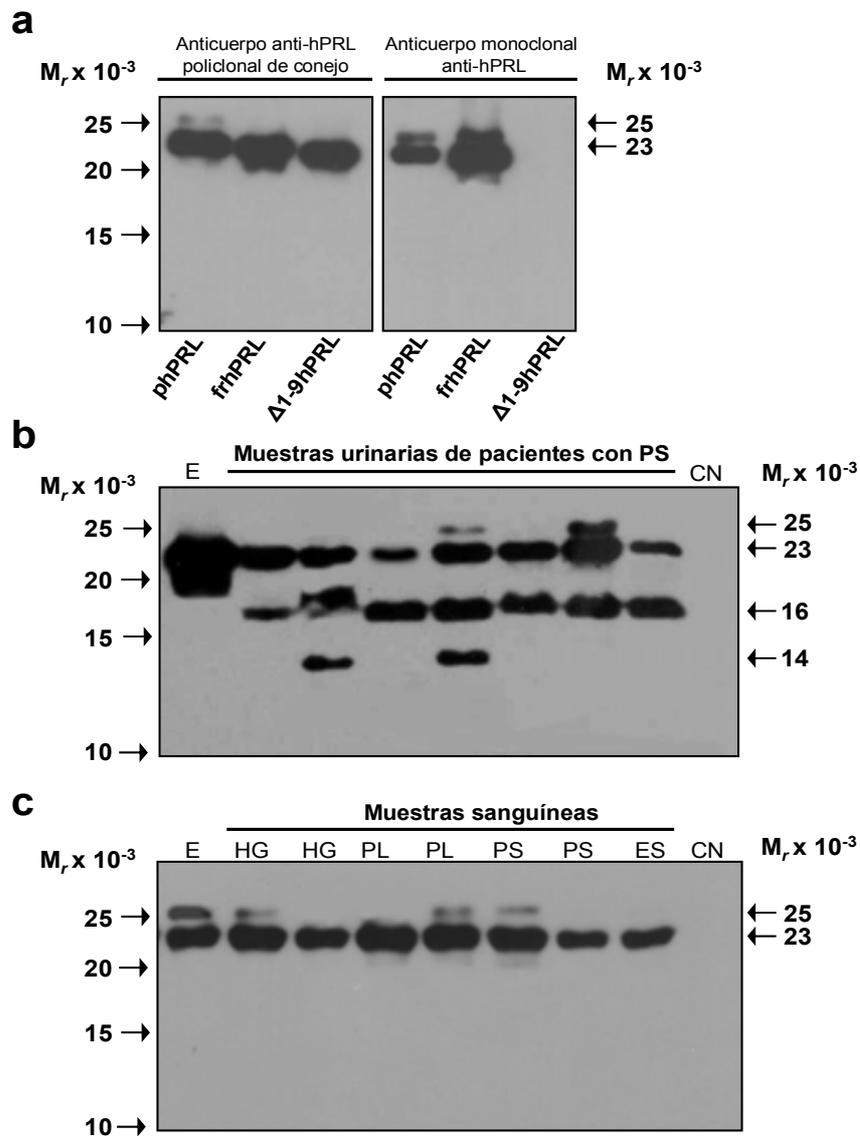
Se colectó una muestra de orina al azar la cual fue tomada en condiciones estériles (mediante una sonda de Foley o con la técnica de chorro medio) y en forma conjunta una muestra de sangre venosa en condiciones basales y sin estímulo hormonal o con drogas que incrementen la secreción de PRL. Las muestras fueron centrifugadas y el suero o la orina libre de sedimento fueron alicuotadas y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de analizarse. Todas las muestras fueron tomadas antes de la inducción del parto o cesárea.

**Inmunoensayo de la PRL.** La concentración de PRL inmunorreactiva del suero y orina fue determinada por un ensayo inmunoenzimático ultrasensible tal como fue descrito previamente (24). La sensibilidad del ensayo fue 0,018 ng/ml, y sus coeficientes de

variación intra e interensayo fueron de 4.7% y 6.1%, respectivamente. La concentración de PRL urinaria fue normalizada a la concentración de creatinina urinaria y expresada en ng de PRL/mg de creatinina. La concentración de creatinina y proteínas en orina fueron medidas de acuerdo a los procedimientos previamente descritos (22).

**Análisis por Western blot.** El procedimiento empleado fue similar a lo reportado previamente (25). Brevemente, las muestras (600  $\mu$ l de orina o 400  $\mu$ l de suero) fueron inmunoprecipitadas con 5  $\mu$ l de anticuerpo anti-hPRL policlonal de conejo (anti-hPRL [NIDDK-anti-hPRL-IC-5, CYTO]) durante 72 h a 4 °C y posteriormente con 5  $\mu$ l de anticuerpos de cabra anti-gammaglobulinas de conejo (Dako Corp, Carpinteria, CA) durante 24 h a 4 °C. El suero normal de conejo se utilizó como control negativo. Los inmunoprecipitados fueron sujetos a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 15% (SDS-PAGE). Después, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF y se incubaron durante toda la noche a 4 °C en con el mismo antisuero de conejo anti-hPRL a una dilución final 1:1,000 o con un anticuerpo monoclonal anti-hPRL (American Qualex, San Clemente, CA). Posteriormente, las membranas fueron incubadas con antisuero de cabra anti-gammaglobulinas de conejo o de ratón conjugado a peroxidasa a una dilución de 1:2,000 (Dako). El estuche comercial ECL Western Blot substrate SuperSignal West Pico substrate kit (Pierce Biotechnology Inc, Rockford, IL) fue utilizado para localizar los immuno-complejos. La intensidad de la señal de las bandas fueron medidas por densitometría utilizando el software ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

La Figura 1A muestra la inmunorreactividad de la porción amino-terminal de PRL hacia el anticuerpo monoclonal anti-hPRL usado. Cuando fue usada una forma recombinante truncada de la hPRL ( $\Delta$ 1-9 hPRL), el anticuerpo fue incapaz de detectar



**Figura 1.** A, Análisis por Western blot de la PRL humana hipofisiaria (hPRL), hPRL recombinante (frhPRL), y  $\Delta 1-9$  hPRL recombinante. Los blots fueron probados con anticuerpos policlonales de conejo anti-hPRL (panel izquierdo) y con un anticuerpo monoclonal anti-hPRL que reacciona con la porción amino-terminal de la PRL (panel derecho). B y C, Western blots representativos de la PRL inmunorreactiva en orina (B) y suero (C). Las muestras fueron inmunoprecipitadas con antisuero específico anti-hPRL y sometidas a SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. Todos los blots fueron probados con un anticuerpo monoclonal anti-hPRL. Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular. La masa molecular relativa estimada ( $M_r$ ) de cada banda es mostrada a la derecha. HG, Hipertensión gestacional; PL, Preeclampsia leve; PS, Preeclampsia severa; ES Embarazada sana; CN, Control negativo; E, Estándar de PRL humana hipofisiaria (100 ng).

esta especie particular de PRL. En contraste, este anticuerpo reconoce tanto la hPRL hipofisiaria y la hPRL recombinante, lo que indica que reacciona con la porción amino-terminal de la PRL. El antisuero policlonal de conejo anti-hPRL detectó todas las formas de PRL por Western blot.

**Incubación de hPRL con orina o Catepsina D.** La hPRL hipofisiaria marcada con  $^{125}\text{I}$ -hPRL ( $1 \times 10^6$  cpm; actividad específica de 45-60  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  de proteína) fue adicionada a 0.6 ml de orina de pacientes con preeclampsia severa o en 100  $\mu\text{l}$  de 0.1 M de citratos-fosfatos, pH 3.5, conteniendo 0.15 M NaCl y 1  $\mu\text{g}$  de catepsina D (Sigma, St Louis, MO) (control positivo de incubación) e incubada durante 72 horas a 37 °C. Posteriormente, la  $^{125}\text{I}$ -hPRL fue inmunoprecipitada y los productos fragmentados de la PRL fueron investigados por Western blot.

**Análisis estadístico.** Las diferencias entre variables continuas fueron determinadas por la prueba de t de Student no pareada (o la prueba de U de Mann-Whitney para variables con distribución no normal). Las diferencias entre variables categóricas se determinaron mediante la prueba de chi cuadrada con corrección de continuidad de Yates o con la prueba exacta de Fisher para muestras pequeñas (o con la chi-cuadrada de Mantel-Haenszel de tendencia lineal para las variables con más de 2 categorías). Las diferencias entre  $\geq 3$  variables continuas se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA), seguido por el procedimiento post-hoc (prueba de Scheffé) o por la prueba de una vía de Kruskal-Wallis para variables sin distribución normal, seguido de comparaciones usando la prueba de U de Mann-Whitney. La relación entre las variables continuas fue evaluada por el coeficiente de correlación de Pearson. En adición, modelos de regresión múltiple logísticos se usaron para ajustar la relación entre cada variable estudiada y el diagnóstico de preeclampsia. El método logarítmico de verosimilitud (log-likelihood) fue usado para determinar el mejor modelo de regresión múltiple logístico. A p a dos colas  $<0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## Resultados

**Descripción general de la población estudiada.** Un total de 546 mujeres embarazadas con  $\geq 20$  semanas de edad gestacional fueron incluidas en el estudio. Doscientos siete mujeres no cumplieron con criterios de desordenes hipertensivos del embarazo en subsiguientes evaluaciones y fueron consideradas embarazadas sanas, el resto de las mujeres (339) fueron diagnosticadas con desordenes hipertensivos del embarazo (124 con hipertensión gestacional, 48 con preeclampsia leve, y 167 con preeclampsia severa). En comparación con las embarazadas sanas, las pacientes con desordenes hipertensivos del embarazo fueron mayores, tenían mayor frecuencia de preeclampsia previa, mayor índice de masa corporal, cifras mayores de presión arterial y una mayor proporción de partos pretérmino o con infantes con bajo peso al nacer. El grupo de preeclampsia severa tuvo mayor presión arterial (tanto sistólica como diastólica,  $p < 0.001$ ), menor edad gestacional al momento del parto ( $p < 0.001$ ), recién nacidos con bajo peso al nacer y tuvieron una mayor proporción de partos pretérmino, RCIU, oligohidramnios y mortinatos o con muerte neonatal temprana en comparación con las mujeres con hipertensión gestacional y preeclampsia leve. Otros resultados maternos adversos solo fueron encontrados en las pacientes con preeclampsia severa, tales como desprendimiento prematuro de placenta normoinserta ( $n=13$ , 7.8%), ruptura hepática ( $n=3$ , 1.8%), insuficiencia renal aguda ( $n=24$ , 14.4%), edema agudo de pulmón ( $n=9$ , 5.4%), y hubo una muerte materna (0.6%) debido a hemorragia cerebral (Tabla 1).

Los resultados de laboratorio se muestran en la Tabla 2. El diagnóstico clínico final fue apoyado por la determinación de la relación proteína:creatinina en muestras de orina al azar (22). Las mujeres con preeclampsia tuvieron un mayor grado de proteinuria en comparación con las embarazadas sanas y mujeres con hipertensión gestacional ( $p \leq 0.007$ ). Además, la relación proteína:creatinina fue significativamente mayor en las pacientes con preeclampsia severa que en las pacientes con preeclampsia leve ( $p < 0.001$ ). Estos hallazgos fueron confirmados en un subgrupo de mujeres que contaban con una recolección de orina de 24 horas (Tabla 2). En comparación a otros grupos, las mujeres con preeclampsia severa

tuvieron mayores concentraciones séricas de enzimas hepáticas, de deshidrogenada láctica, así como recuentos plaquetarios más bajos. Además, las mujeres con preeclampsia severa y preeclampsia leve tuvieron concentraciones séricas más elevadas de ácido úrico, en comparación con las mujeres con embarazo normal e hipertensión gestacional ( $p < 0.003$ ).

**Concentraciones de PRL sérica y urinaria.** La Tabla 3 muestra las concentraciones de PRL sérica y urinaria, así como la presencia de las isoformas de PRL de bajo peso molecular demostrada por inmunotransferencia. Las concentraciones séricas de PRL fueron significativamente más elevadas en las pacientes con preeclampsia que en las embarazadas sanas ( $p < 0.006$ ), y en las pacientes con preeclampsia severa que en aquellas con hipertensión gestacional ( $p < 0.001$ ). La PRL urinaria fue significativamente ( $p < 0.001$ ) mayor en pacientes con preeclampsia que en las mujeres con embarazo normal y las pacientes con hipertensión gestacional; y en la preeclampsia severa que en las pacientes con preeclampsia leve ( $p < 0.001$ ). Además, las concentraciones urinarias de PRL (normalizada a la excreción de creatinina) mostraron un alto poder de discriminación para identificar la presencia de preeclampsia; tanto en las embarazadas sanas como en las mujeres con hipertensión gestacional, el mayor valor de la concentración urinaria de PRL fue de 0.94 ng/mg de creatinina, mientras que en las pacientes con preeclampsia la concentración más baja de PRL urinaria fue 1.97 ng/mg creatinina.

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de las mujeres embarazadas con desordenes hipertensivos del embarazo y mujeres embarazadas sanas.

Variable	Embarazadas sanas (n=207)	Hipertensión gestacional (n=124)	Valor P*	Preeclampsia leve (n=48)	Valor P*	Preeclampsia severa (n=167)	Valor P*
Edad, años, media ± DE	26.4 ± 5.5	29.5 ± 6.2	<0.001	27.5 ± 6.8		28.7 ± 6.0	0.002
Embarazos, mediana (amplitude)	2 (1 – 5)	2 (1 – 5)		2 (1 – 5)		2 (1 – 7)	
Primigesta, n (%)	85 (41.7)	52 (41.9%)		23 (47.9%)		74 (44.3%)	
Abortos, mediana (amplitud)	0 (0 – 3)	0 (0 – 4)		0 (0 – 3)		0 (0 – 3)	
Preeclampsia previa, n (%)	5 (2.4%)	18 (14.5%)	<0.001	11 (22.9%)	<0.001	23 (13.8%)	<0.001
Peso materno, kg, media ± DE	70.3 ± 12.1	81.3 ± 15.0	0.004	76.6 ± 12.3	0.027	72.0 ± 12.4	
Índice de masa corporal, media ± DE	28.79 ± 4.41	33.00 ± 6.23	0.005	31.34 ± 5.23	0.015	29.97 ± 4.60	
Edad gestacional al ingreso (semanas), media ± DE	31.6 ± 3.2	34.1 ± 4.0	0.003	36.0 ± 3.8	0.021	32.2 ± 4.4	
Edad gestacional al nacimiento (semanas), media ± DE	38.8 ± 1.1	37.2 ± 2.0	<0.001	36.7 ± 2.4	<0.001	32.5 ± 4.3	<0.001
Peso al nacimiento, g, media ± DE	3,140 ± 337	2,783 ± 443	<0.001	2,704 ± 522	<0.001	1,629 ± 769	<0.001
Nacimiento <37 SDG, n (%)	2 (1.0%)	31 (25%)	<0.001	18 (37.5%)	<0.001	138 (82.6%)	<0.001
Nacimiento <34 SDG, n (%)	0 (0.0%)	8 (6.5%)	<0.001	5 (10.4%)	<0.001	96 (57.5%)	<0.001
Restricción del crecimiento intrauterino, n (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		102 (61.1%)	<0.001
Oligohidramnios, n (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		26 (15.6%)	<0.001
DPPNI, n (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		13 (7.8%)	<0.001
Ruptura hepática, n (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		3 (1.8%)	
Insuficiencia renal aguda, n (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		24 (14.4%)	<0.001
Edema agudo de pulmón, n (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		9 (5.4%)	0.014
Muerte materna, n (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		1 (0.6%)	
Óbitos o muerte neonatal, n (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		21 (12.6%)	0.002
Presión arterial sistólica, mmHg, media ± DE	106.6 ± 9.5	143.9 ± 12.1	<0.001	143.1 ± 8.5	<0.001	164.1 ± 20.5	<0.001
Presión arterial diastólica, mmHg, media ± DE	69.4 ± 6.4	97.7 ± 8.2	<0.001	96.8 ± 4.9	<0.001	109.3 ± 12.5	<0.001

DPPNI = Desprendimiento prematuro de placenta normoinsera

\* vs. embarazadas sanas, después de la pruebas estadísticas apropiadas.

Tabla 2. Resultados clínicos de laboratorio de las mujeres embarazadas sanas y mujeres con desordenes hipertensivos del embarazo.

Variable	Embarazadas sanas (n=207)	Hipertensión gestacional (n=124)	Valor P*	Preeclampsia leve (n=48)	Valor P*	Preeclampsia severa (n=167)	Valor P*
Relación proteína:creatinina, mg/mg, mediana (amplitud)	0.15 (0.05-0.28)	0.18 (0-0.29)		0.79 (0.30 - 2.78)	<0.001	1.48 (0.31-22.78)	<0.001
Proteinuria de 24 horas, mg/día, mediana (amplitud)	(n=57) 171.4 (91-217)	(n=59) 188.2 (66-255)		(n=34) 569.7 (341-2,522)	<0.001	(n=109) 1,509.7 (317-23,348)	<0.001
Plaquetas, células/ $\mu$ l x 10 <sup>3</sup> , media $\pm$ DE	194,223 $\pm$ 69,846	210,427 $\pm$ 57,382		186,234 $\pm$ 42,398		149,342 $\pm$ 70,458	<0.001
TGO, U/L, mediana (amplitud)	ND	30 (5-49)		32.5 (9-45)		38 (5-1,445)	<0.001
TGP, U/L, mediana (amplitud)	ND	18 (3-41)		17 (7-48)		23 (5-1,430)	<0.001
DHL, U/L, mediana (amplitud)	ND	221 (81-479)		249 (107-577)		274 (80-5,140)	<0.001
Acido úrico, mg/dL, media $\pm$ DE	5.1 $\pm$ 1.4	5.5 $\pm$ 1.6		6.1 $\pm$ 1.6	0.003	6.5 $\pm$ 1.9	<0.001

\* vs. embarazadas sanas, después de la prueba estadística apropiada.

El análisis de regresión logística fue utilizado para determinar si las concentraciones de PRL urinaria eran independientes a las variables que también mostraron significancia estadística en el análisis univariado (tablas 2 y 3). El primer análisis fue necesario porque el grado de proteinuria, la edad gestacional y las concentraciones de PRL sérica mostraron significancia estadística en el análisis univariado y además porque consideramos que estas variables pudieran afectar la excreción de PRL urinaria y por lo tanto explicar la mayor concentración de PRL urinaria en la preeclampsia. Los modelos se muestran en la Tabla 4. La chi-cuadrada de bondad puso de manifiesto que los datos se ajustaron a los modelos (para la preeclampsia [leve o grave] y para preeclampsia severa [ $p=0.32$  y  $p=0.23$ , respectivamente]). Independientemente de la gravedad, el modelo utilizado para la preeclampsia mostró que sólo la concentración de PRL urinaria se mantuvo estadísticamente significativa ( $p=0.016$ ) después de haber sido ajustada para el resto de variables incluidas en el modelo. Del mismo modo, en el modelo utilizado para la preeclampsia severa, la concentración de PRL urinaria mantuvo significancia estadística ( $p<0.001$ ). Además, las otras tres variables incluidas (edad gestacional, concentración sérica de PRL y el grado de proteinuria) también se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p\leq 0.032$ ).

**Tabla 3.** Concentraciones séricas de PRL, concentraciones de PRL urinaria (no normalizada y normalizada a creatinina), y presencia de las isoformas de la PRL urinaria de 14 y/o 16 kDa mediante el análisis de Western blot en muestras de mujeres embarazadas sanas y mujeres con desordenes hipertensivos del embarazo.

Variable	Embarazadas sanas (n=207)	Hipertensión gestacional (n=124)	Valor P *	Preeclampsia leve (n=48)	Valor P *	Preeclampsia severa (n=167)	Valor P *
PRL sérica, ng/ml, mediana (amplitud)	139.0 (44.2-472.9)	148.6 (47-449.3)	0.032	162.6 (64.8-697.1)	0.027	190.5 (75.5-522.9)	0.006
PRL urinaria, pg/ml, mediana (amplitud)	195.3 (0-2,419.5)	229.1 (0-1,416.2)		1,342.8 (329.0-7,222.0)	<0.001	9,830.0 (766.2-599, 880.0)	<0.001
PRL urinaria, ng/mg creatinina, mediana (amplitud)	0.20 (0.0-0.94)	0.19 (0.0-0.87)		2.77 (2.1-31.4)	<0.001	21.2 (1.97-596.0)	<0.001
Isoformas de la PRL de 14 y/o 16 kDa en orina (%)	ND	0/124 (0.0%)		0/48 (0%)		36/167 (21.6%)	ND

ND = No determinada

\* vs. Embarazadas sanas, después de la prueba estadística apropiada.

**Tabla 4.** Variables con significancia estadística en el análisis univariado y que teóricamente pueden ser asociadas al grado de PRL urinaria excretada en mujeres con preeclampsia (modelo de regresión logística)

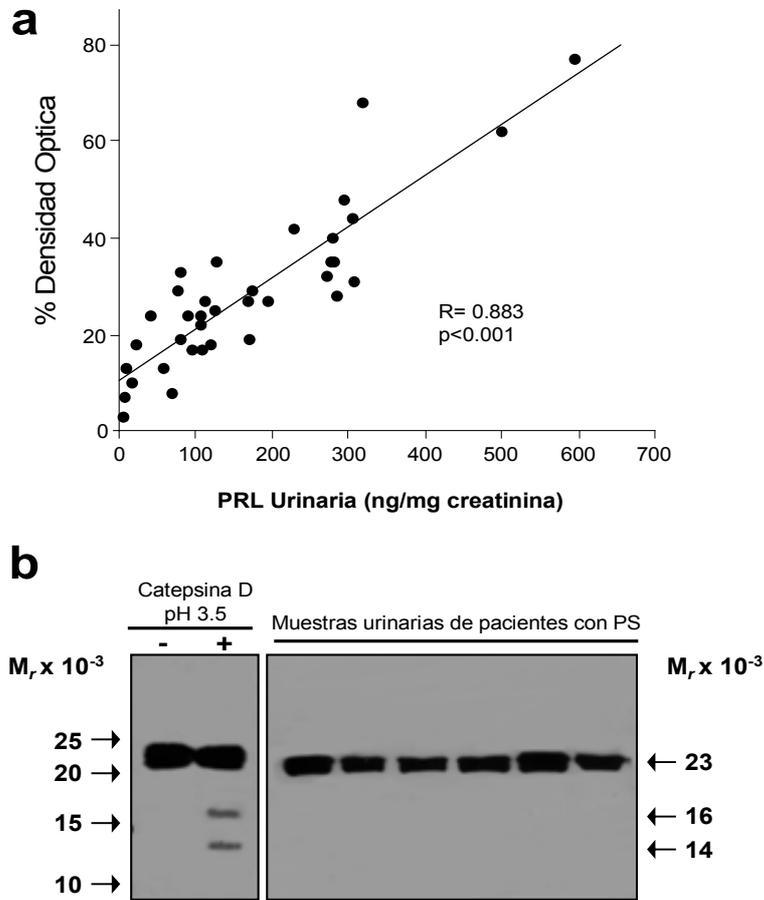
Variable	Preeclampsia (leve o severa)			Preeclampsia severa		
	Coefficiente de Regresión	Error estándar	Valor <i>P</i>	Coefficiente de Regresión	Error estándar	Valor <i>P</i>
Constante	14.6465			-0.1003		
Edad gestacional al ingreso, sdg	-0.8712	0.5097	0.087	-0.1630	0.0659	0.013
Niveles séricos de PRL, ng/ml	-0.0058	0.0169	0.731	0.0053	0.0024	0.032
Relación urinaria proteína:creatinina, mg de proteína/mg de creatinina	9.4874	9.8946	0.338	0.6403	0.2404	0.008
Concentración urinaria de PRL, ng/mg de creatinina	8.0751	3.3573	0.016	0.6916	0.0876	<0.001

Porcentaje de casos correctamente clasificados: Preeclampsia (leve o severa) 99.82% y preeclampsia severa 96.70%

**Western blot de PRL inmunorreactiva en orina y suero.** La PRL inmunorreactiva en muestras de orina de mujeres embarazadas sanas, en las pacientes con hipertensión gestacional y preeclampsia leve fue prácticamente ausente de acuerdo al Western blot. Por el contrario, en 87 de 167 muestras de pacientes con preeclampsia severa, al menos una banda fue detectada consistentemente. Una banda que corresponde a la PRL de 23 kDa estuvo presente en todas las muestras, mientras que otras (la PRL de 25, 16 y 14 kDa) fueron presentes inconstantemente. La banda 25 kDa (la que corresponde a PRL glicosilada) estuvo presente en 52/87 muestras de orina y las bandas de 16 y/o 14 kDa estaban presentes en 36/87 muestras (Tabla 3 y Figura 1b). La PRL hipofisiaria humana usada como estándar (NIDDK), la cual no fue inmunoprecipitada antes de la inmunotransferencia, también mostró las bandas de 23 y 25 kDa. La banda que corresponde a la PRL de 23 kDa estuvo presente en forma constante en el suero de las embarazadas sanas, en las pacientes con hipertensión gestacional y preeclampsia, mientras que una segunda banda fue inconstante (25 kDa) la cual fue detectada en el 18% de las muestras. En contraste a las muestras de orina, las muestras de suero no mostraron la presencia de las bandas de 14 o 16 kDa (Figura 1c). No se detectaron bandas en la muestra control cuando se probaron con suero normal de conejo en lugar de antisuero anti-hPRL (Figura 1b y 1c). Cuando las membranas fueron probadas usando el anticuerpo monoclonal anti-hPRL que reaccionan con la porción amino-terminal de la PRL mostraron datos similares a los obtenidos con el antisuero de conejo anti-hPRL. Por último, hubo una correlación significativa ( $r=0.883$ ,  $p<0.001$ ) entre los valores densitométricos de los fragmentos de 14 y 16 kDa y las concentraciones de PRL urinaria (Figura 2a). La incubación de  $^{125}\text{I}$ -hPRL con las muestras de orina por 72 h se realizó para investigar si su exposición a la orina provocaba proteólisis de la PRL de 23 kDa. En la incubación control (es decir, en presencia de catepsina D), la  $^{125}\text{I}$ -hPRL fue partida en fragmentos de 14 y 16 kDa, mientras que no hubo este procesamiento de la  $^{125}\text{I}$ -hPRL cuando fue incubada con muestras de orina de pacientes con preeclampsia severa (Figura 2b).

Relación entre las concentraciones de PRL urinaria normalizada con la creatinina y la presencia de las isoformas de PRL de 14 y/o 16 kDa y la gravedad de la preeclampsia. Para este análisis, las mujeres se dividieron en tres grupos de acuerdo a la gravedad de la enfermedad. El grupo 1 estuvo conformado por 48 pacientes con preeclampsia leve, el grupo 2 incluyó 111 pacientes con preeclampsia severa, pero sin Síndrome HELLP o eclampsia, y el grupo 3 fue compuesto por 42 pacientes con Síndrome HELLP, 8 con eclampsia, y 6 con ambas condiciones. Las concentraciones urinarias de PRL difirieron significativamente ( $p < 0.001$ ) entre estos grupos. Las muestras del grupo 1 tuvieron la menor concentración de PRL [mediana de 2.8 ng/mg creatinina (amplitud, 2.1–31.4)], mientras que el grupo 3, fue el más alto [mediana de 72.1 ng/mg creatinina (amplitud 8.42–596.0)]. En el grupo 2, las concentraciones de PRL urinaria fueron intermedias entre los grupos 1 y 3 [mediana de 12.5 ng/mg creatinina (amplitud 1.97–319.0)]. Los Grupos 2 y 3 difirieron en la frecuencia de las isoformas de la PRL urinaria 14 y/o 16 kDa [4.5% vs. 55.4%, respectivamente ( $p < 0.001$ )]. Estos mismos parámetros fueron comparados entre las mujeres con preeclampsia severa, ya sea con Síndrome HELLP, eclampsia o ambas. La mediana de las concentraciones de PRL urinaria fue significativamente mayor en las pacientes con Síndrome HELLP y eclampsia que en las pacientes con Síndrome HELLP aislado [259.5 ng/mg creatinina (amplitud 51.1-395.0) vs. 57.1 ng/ mg creatinina (amplitud 8.4-596.0), respectivamente ( $p = 0.021$ )]. En las pacientes con eclampsia aislada, las concentraciones urinarias de PRL [85.1 ng/mg creatinina (amplitud 21.4-237.2)] no fueron significativamente diferentes de las que se encontraron en pacientes con Síndrome HELLP aislado o cuando ambas condiciones estaban presentes.

Aunque la frecuencia de las isoformas de la PRL urinaria de 14 y/o 16 kDa fue mayor en las pacientes con eclampsia aislada o en las pacientes con eclampsia y Síndrome HELLP (75.0% y 83.3%, respectivamente) que en las pacientes con Síndrome HELLP aislado (47.6%), las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0.05$ ).



**Figura 2.** A Correlación entre los valores densitométricos relativos combinados de los fragmentos de la PRL de 14 y/o 16 kDa [es decir, la relación combinada de los fragmentos de PRL (las bandas de 14 más 16 kD, en la Fig. 1B) a la intensidad total de la PRL en el mismo carril (determinada por análisis densitométrico)] en la orina y la concentraciones de PRL urinaria en mujeres con preeclampsia severa. B, Análisis por Western blot de los fragmentos proteolíticos generados de la  $^{125}\text{I}$ -hPRL a pH 3.5 por 72 horas a 37 °C en la ausencia o presencia de Catepsina D (panel izquierdo), y Western blots representativos obtenidos después de la incubación de  $^{125}\text{I}$ -hPRL con muestras de orina de pacientes con preeclampsia severa por 72 horas a 37 °C (panel derecho). Los números de la izquierda indican la posición de los marcadores de peso molecular. La estimación relativa del peso molecular ( $M_r$ ) de cada banda se muestra a la derecha.

Relación entre las concentraciones de PRL urinaria normalizada a creatinina y la presencia de las isoformas de la PRL de 14 y/o 16 kDa con los resultados adversos del embarazo en la preeclampsia severa. De 167 mujeres con preeclampsia severa, 13 tuvieron desprendimiento prematuro de placenta normoinsera, 24 desarrollaron insuficiencia renal aguda (niveles de creatinina sérica  $\geq 2.25$  mg/dL), y 9 tuvieron edema agudo de pulmón. En todos los casos, la mediana de la concentración de PRL urinaria fue significativamente mayor en las pacientes que desarrollaron cualquiera de estos resultados adversos que en las que no los presentaron: desprendimiento prematuro de placenta normoinsera [98.7 ng/mg creatinina (amplitud 40.94-528.99) vs. 17.55 ng/mg creatinina (amplitud 1.97-596.02),  $p=0.003$ ]; insuficiencia renal aguda [127.16 ng/mg creatinina (amplitud 6.00-596.02) vs. 17.23 ng/mg creatinina (amplitud 1.97-528.99),  $p<0.001$ ] y edema agudo de pulmón [225.9 ng/mg creatinina (amplitud 8.60-500.00) vs. 21.05 ng/mg creatinina (amplitud 1.97-596.02),  $p=0.028$ ]. Del mismo modo, hubo una diferencia significativa en la frecuencia de las isoformas de la PRL urinaria 14 y/o 16 kDa entre mujeres con y sin resultados adversos del embarazo: desprendimiento prematuro de placenta normoinsera 46.2% vs. 19.5% ( $p=0.036$ ), insuficiencia renal aguda 45.8% vs. 17.5% ( $p=0.004$ ) y edema agudo de pulmón 55.6% vs. 19.6% ( $p=0.023$ ). Interesantemente, todas las muestras fueron recolectadas antes de la sospecha clínica o de la confirmación diagnóstica de estas complicaciones.

## Discusión

Estudios previos han informado que la excreción urinaria de PRL en sujetos normales es prácticamente indetectable a menos que las muestras sean concentradas, e incluso en las muestras concentradas (~40 veces), las concentraciones medidas por fluoroinmunoensayo son relativamente bajas (0.17 a 0.61 ng/mg creatinina) (26,27). En el presente estudio, con la inclusión de un gran número de mujeres con embarazo normal y de pacientes con un amplio espectro de desordenes hipertensivos del embarazo, encontramos que la excreción urinaria de PRL fue similar en mujeres embarazadas sanas y las pacientes con hipertensión gestacional y que los niveles fueron significativamente mayores en las pacientes con preeclampsia. Encontramos que las diferencias en la excreción de la PRL fueron más pronunciadas conforme la gravedad de la preeclampsia se incrementó, independientemente del grado de proteinuria, edad gestacional, y los niveles séricos de PRL, lo que sugiere que los cambios en la concentración de PRL urinaria efectivamente reflejan la extensión y la intensidad del daño al endotelio glomerular y probablemente también, del endotelio vascular sistémico. Por otra parte, el aumento de la excreción de PRL se asoció a manifestaciones más graves o complicaciones de la preeclampsia, incluyendo el Síndrome HELLP y eclampsia, desprendimiento prematuro de placenta normoinserta, insuficiencia renal aguda y edema agudo de pulmón.

Durante el proceso del análisis de los datos presentados en el presente estudio, González y colaboradores (28) informaron que las concentraciones de PRL urinaria no mostraron diferencias significativas entre las mujeres con embarazo normal y preeclampsia severa. Sin embargo, sus resultados deben tomarse con cautela debido al escaso número de pacientes estudiadas (8 mujeres con embarazo normal y 13 pacientes con preeclampsia severa) y el hecho de que las concentraciones de PRL urinaria se calcularon a partir de muestras aleatorias sin que hallan sido normalizadas a la excreción de creatinina. A este respecto, se sabe que la medición de una proteína en muestras de orina al azar es probable que fluctúen debido a las variaciones fisiológicas normales en la excreción de agua y por lo tanto puede

diluirse o concentrarse la proteína urinaria y conducir a estimaciones inexactas de las concentraciones medidas.

La excreción de PRL en las muestras de mujeres embarazadas sanas y las pacientes con hipertensión gestacional y preeclampsia leve fue indetectable de acuerdo al análisis por Western blot. Estos hallazgos pueden deberse a la baja sensibilidad de esta técnica para la detección de PRL en pequeñas muestras de volumen. En este sentido, cabe mencionar que sólo en las muestras que contenían 10-15 ng/ml o más fue posible detectar esta proteína por Western blot y que las muestras de pacientes con preeclampsia severa exhibieron mayores concentraciones de PRL que en las mujeres con hipertensión gestacional y preeclampsia leve. La PRL monomérica puede ser proteolíticamente fragmentada para producir fragmentos de 14 o 16 kDa. De hecho, la modificación postraducciona l de PRL acontece entre los mecanismos implicados para la diversidad funcional de la PRL. Los fragmentos de la PRL de 14 y 16 kDa exhiben efectos anti-angiogénicos tanto in vitro como in vivo (14,19,20,29) y la catepsina D, una proteasa aspartil lisosomal, es la principal enzima implicada en la fragmentación de la PRL monomérica (28, 30-32).

El hallazgo de que las muestras urinarias de pacientes con preeclampsia severa fueron incapaces de procesar la <sup>125</sup>I-hPRL a fragmentos de 14 o 16 kDa, sugiere que la PRL no es partida en la orina y que probablemente el rompimiento se produce en el endotelio glomerular. A este respecto, se ha demostrado que la catepsina D endógena puede generar fragmentos anti-angiogénicos de la PRL por explantes renales mantenidos a un pH fisiológico (33). Además se ha demostrado que los fragmentos anti-angiogénicos de la PRL encontrados en el líquido amniótico de pacientes con preeclampsia severa no se procesan a nivel local, incluso a pesar de que la PRL está presente en altas concentraciones, sino que parecen derivar del tejido uteroplacentario a través de la acción endógena de la catepsina D del trofoblasto placentario, cuya actividad esta sobre-regulada en la preeclampsia (28). Que los fragmentos anti-angiogénicos de la PRL en la orina pueden potencialmente derivar del endotelio glomerular esta en consonancia con las observaciones anteriores. Además, el hallazgo de que los fragmentos anti-angiogénicos de la PRL fueron detectados en la orina,

pero no en el suero, adicionalmente sugiere que el rompimiento de la PRL intacta circulante es un proceso local, con mínima liberación de los fragmentos anti-angiogénicos de la PRL a la circulación, y que sus efectos anti-angiogénicos son ejercidos directamente en las células endoteliales, donde se generaron. La observación de que hPRL de 23 kDa se detectó tanto en suero como en orina, indica que esta isoforma de la PRL deriva de la PRL circulante.

A pesar de que los fragmentos anti-angiogénicos de la PRL sólo se encontraron en el 21.6% de los casos con preeclampsia severa, fueron detectados con mayor frecuencia conforme la severidad de la preeclampsia aumentó y también se encuentra con mayor frecuencia en las mujeres que desarrollaron desprendimiento prematuro de placenta normoinserta, falla renal aguda, o edema agudo de pulmón. Estos resultados concuerdan con los resultados de que los fragmentos anti-angiogénicos de la PRL (14, 16 y 18 kDa) son más frecuentemente detectados en el suero, líquido amniótico y orina de pacientes con preeclampsia severa que en las mujeres con un embarazo normal (28). Todos estos datos acoplados al hallazgo de que el líquido amniótico de pacientes con preeclampsia, pero no de las mujeres embarazadas sanas, inhibe la proliferación celular endotelial y la actividad de la sintetasa del óxido nítrico inducida por el factor de crecimiento vascular en cultivo de células endoteliales (28) sugiere que la PRL puede contribuir a la fisiopatología de la preeclampsia.

Aunque nosotros y otros hemos encontrado que las concentraciones elevadas de PRL sérica están asociados con la preeclampsia severa independientemente de la edad gestacional, grado de proteinuria y la excreción de la PRL urinaria (34, y en el presente estudio), otros estudios han fallado en demostrar una asociación (35-37). Las posibles explicaciones para estas aparentes discrepancias son las diferencias en los criterios de selección (es decir, la inclusión de mujeres con preeclampsia leve) y el número relativamente pequeño (menos de 30) de pacientes con preeclampsia severa. La observación de un modesto, pero significativo incremento de la PRL circulante en mujeres con preeclampsia severa sugiere que el incremento de las concentraciones de PRL pueden permitir la generación local de los fragmentos anti-angiogénicos de la PRL en las células endoteliales. Sin embargo, el origen de

las altas concentración de PRL circulante en este subtipo de mujeres no puede determinarse debido a las limitaciones impuestas por el diseño de estudio transversal empleado.

En resumen, la excreción urinaria de PRL esta notablemente elevada en la preeclampsia al momento del diagnóstico y tanto las concentraciones de PRL urinaria como la presencia de los fragmentos anti-angiogénicos de la PRL en la orina están estrechamente asociadas con la severidad de la preeclampsia y la ocurrencia de los resultados adversos del embarazo. La medición de la excreción urinaria de PRL puede ser utilizada como un biomarcador para la preeclampsia, su gravedad y la aparición de complicaciones. Otros estudios longitudinales y prospectivos son aún necesarios para evaluar si la determinación de PRL urinaria y la excreción de las isoformas de la PRL en el embarazo temprano pueden predecir adecuadamente el desarrollo de preeclampsia en pacientes con alto riesgo, así como también dilucidar el origen de las isoformas de la PRL y su papel en la patogénesis de los desordenes hipertensivos del embarazo.

## Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por el financiamiento obtenido del Fondo de Investigación en Salud Instituto Mexicano del Seguro Social, México (FIS/IMSS/PROT/C2007/046 (a Alfredo Leños Miranda). Los autores agradecen al National Hormone and Pituitary Program y al Doctor A.F. Parlow, Harbor-UCLA, Torrance, CA, USA., por habernos proporcionado la PRL hipofisiaria y algunos de los antisueros.

## Referencias

1. Roberts JM 1998 Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 16:5–15.
2. Chesley LC 1985 Diagnosis of preeclampsia. *Obstet Gynecol* 65:423–425.
3. National High Blood Pressure Education Program: Working Group Report on High Blood Pressure in Pregnancy 2000. *Am J Obstet Gynecol* 183: S1–S22.
4. Hauth JC, Ewell MG, Levine RJ, Esterlitz JR, Sibai B, Curet LB, Catalano PM, Morris CD 2000 Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. Calcium for Preeclampsia Prevention Study Group. *Obstet Gynecol* 95: 24–28.
5. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA 2003 Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 111:649–658.
6. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF 2004 Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 350:672–683.
7. Kendall RL, Thomas KA 1993 Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10705–10709.
8. He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS 1999 Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol* 13:537–545.B
9. Ferrara N 2001 Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1358–C1366.
10. Koga K, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Ruimeng X, Hirata T, Takeda S, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y 2003 Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2348–2351.
11. Buhimschi CS, Norwitz ER, Funai E, Richman S, Guller S, Lockwood CJ, Buhimschi IA 2005 Urinary angiogenic factors clusters hypertensive disorders and identify women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 192:734–741.

12. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA; CPEP Study Group 2006 Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factor in preeclampsia. *N Engl J Med* 355:992–1005.
13. Levine RJ, Thadhani R, Qian C, Lam C, Lim KH, Yu KF, Blink AL, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA 2005 Urinary placental growth factor and risk of preeclampsia. *JAMA* 293:77–85.
14. Struman I, Bentzien F, Lee HY, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA 1999 Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1246–1251.
15. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G 2000 Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80:1253–1631.
16. Sinha YN 1995 Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 16:354–364.
17. Pascoe-Lira D, Duran-Reyes G, Contreras-Hernández I, Manuel-Apolinar L, Blanco-Favela F, Leaños-Miranda A 2001 Frequency of macroprolactinemia due to autoantibodies against prolactin in pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 86:924–929.
18. 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.
19. 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.
20. 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.

21. **Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia.** ACOG Practice Bulletin No. 33. American Collage of Obstetricians and Gynecologists 2002 *Obstet Gynecol* 99:159–1677.
22. **Leaños-Miranda A, Márquez-Acosta J, Romero-Arauz F, Cárdenas-Mondragón MG, Rivera-Leaños R, Isordia-Salas I, Ulloa-Aguirre A** 2007 Protein:creatinine ratio in random urine samples is a reliable marker of increased 24-hour protein excretion in hospitalized women with hypertensive disorders of pregnancy. *Clin Chem* 53:1623–1628.
23. **Zhang J, Bowes WA Jr** 1995 Birth-weight-for-gestational-age patterns by race, sex, and parity in the United States population. *Obstet Gynecol* 86:200–208.
24. **Leaños-Miranda A, Contreras-Hernandez I** 2002 Antiprolactin autoantibodies are associated with hyperprolactinemia status in men infected with human immunodeficiency virus. *Endocrine* 19:139–146.
25. **Leaños-Miranda A, Pascoe-Lira D, Chávez-Rueda K, Blanco-Favela F** 2001 Persistence of macroprolactinemia due to antiprolactin autoantibody before, during, and after pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2619–2624.
26. **Gala RR, Singhakowinta A, Brennan MJ** 1975 Studies on prolactin in human serum, urine and milk. *Horm Res* 6:310–320.
27. **Keely EJ, Faiman Ch** 1994 Measurement of human urinary prolactin as a noninvasive study tool. *Clin Chem* 40:2017–2021.
28. **González C, Parra A, Ramírez-Peredo J, García C, Rivera JC, Macotela Y, Aranda J, Lemini M, Arias J, Ibargüengoitia F, de la Escalera GM, Clapp C** 2007 Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest* 87:1009–1017.
29. **Ferrara N, Clapp C, Weiner R** 1991 The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129:896–900.
30. **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.

31. 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.
32. Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, Bonda T, Schaefer A, Sliwa K, Forster O, Quint A, Landmesser U, Doerries C, Luchtefeld M, Poli V, Schneider MD, Balligand JL, Desjardins F, Ansari A, Struman I, Nguyen NO, Zschemisch NH, Klein G, Heusch G, Schulz R, Hilfiker A, Drexler H 2007 A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128: 589–600.
33. Piwnika D, Fernandez I, Binart N, Touraine P, Kelly PA, Goffin V 2006 A new mechanisms for prolactin processing into 16K PRL by secreted cathepsin D. *Mol Endocrinol* 20:3263–3278.
34. Chen BL, Zhang ZH, Liu NB, Huang KS 2001 Prolactin in normal pregnancy and severe pregnancy-induced hypertension. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 26:67–69.
35. Luciano AA, Varner MW 1984 Decidual, amniotic fluid, maternal and fetal prolactin in normal and abnormal pregnancies. *Obstet Gynecol* 63:384–388.
36. Miyakawa I, Taniyama K, Sakata M, Yamaguchi M, Mori N 1986 Prolactin in severe toxemia of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 23:25–30.
37. Ranta T, Stenman UH, Unnérus HA, Rossi J, Sépala M 1980 Maternal plasma prolactin levels in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 55:428–430.

## Urinary Prolactin as a Reliable Marker for Preeclampsia, Its Severity, and the Occurrence of Adverse Pregnancy Outcomes

Alfredo Leños-Miranda, Janeth Márquez-Acosta, Guadalupe María Cárdenas-Mondragón, Zarela Lizbeth Chinolla-Arellano, Roxana Rivera-Leños, Sara Bermejo-Huerta, Juan Fernando Romero-Arauz, Guadalupe Alvarez-Jiménez, Julio César Ramos-León, and Alfredo Ulloa-Aguirre

Research Unit in Reproductive Medicine (A.L.-M., J.M.-A., G.M.C.-M., Z.L.C.-A., R.R.-L., S.B.-H., A.U.-A.) and Hypertensive Diseases of Pregnancy Clinic (J.F.R.-A., G.A.-J., J.C.R.-L.), Unidad Médica de Alta Especialidad-Hospital de Ginecología y Obstetricia "Luis Castelazo Ayala," Instituto Mexicano del Seguro Social, México 03500 D.F., Mexico

**Context:** It has been proposed that preeclampsia may result from of an imbalance in angiogenic factors. Although prolactin (PRL) is mainly related to lactation, it is also involved in other biological functions, including angiogenesis.

**Objective:** Our objective was to determine the relationship among preeclampsia, serum and urinary PRL (uPRL) levels, and excretion of antiangiogenic PRL fragments in urine.

**Study design:** Using a cross-sectional design, uPRL and serum PRL levels, and the presence of PRL isoforms were determined in 546 pregnant women: 207 healthy pregnant, 124 with gestational hypertension, 48 with mild preeclampsia, and 167 with severe preeclampsia (sPE).

**Results:** uPRL concentrations were significantly ( $P < 0.001$ ) higher in preeclampsia (11.99 ng/mg creatinine) than in healthy pregnancy (0.20 ng/mg creatinine) and gestational hypertension (0.19 ng/mg creatinine), and were even higher in sPE compared with mild preeclampsia (21.20 vs. 2.77 ng/mg creatinine, respectively;  $P < 0.001$ ). Antiangiogenic PRL fragments (14–16 kDa) were detected in 21.6% of urine samples from women with sPE but in none from other groups. Patients with hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count syndrome, and/or eclampsia, placental abruption, acute renal failure, and pulmonary edema exhibited highest uPRL concentrations ( $P \leq 0.028$ ) and frequency of antiangiogenic PRL fragments in urine ( $P \leq 0.036$ ). High-serum PRL levels were associated with sPE independently of gestational age, proteinuria, and prolactinuria ( $P = 0.032$ ).

**Conclusions:** Preeclampsia is characterized by increased uPRL excretion. uPRL concentrations and their isoforms appear to be suitable markers to assess the severity of preeclampsia and occurrence of adverse outcomes. PRL and and/or its isoforms might be involved in the pathophysiology of preeclampsia. (*J Clin Endocrinol Metab* 93: 2492–2499, 2008)

**P**reeclampsia is a multisystemic pregnancy specific disease characterized by endothelial dysfunction (1). Preeclampsia is present in 5–8% of all pregnant women, and remains as a major cause of maternal and perinatal morbidity and mortality worldwide (2–4). Although the etiology of this pregnancy spe-

cific syndrome is unclear, recent evidence suggests that preeclampsia may be the result of an imbalance in angiogenic factors (5, 6), which damage maternal vascular endothelium, leading to the clinical manifestations of this condition (7–9). Due to its prevalence and seriousness, several angiogenic and antiangio-

0021-972X/08/\$15.00/0

Printed in U.S.A.

Copyright © 2008 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2008-0305 Received February 7, 2008. Accepted April 30, 2008

First Published Online May 6, 2008

Abbreviations: HELLP, Hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count; HP, healthy pregnant; mPE, mild preeclampsia; PRL, prolactin; SGA, small for gestational age; sPE, severe preeclampsia; uPRL, urinary prolactin.

genic factors in both serum and urine have been assessed as diagnostic markers for this complication of pregnancy or to ascertain its severity (6, 10–13).

Preeclampsia is a complex disease; in some cases the diagnosis is not clear, and there is some difficulty to identify those women who are at risk for presenting adverse pregnancy outcomes. Thus, there is a critical need for the discovery of novel and reliable markers for the prediction, classification, and severity monitoring of the disease, as well as for identifying those patients who may be at risk for adverse maternal and fetal outcomes. In this regard, measurements of specific proteins excreted in urine may be clinically useful.

Prolactin (PRL) is a polypeptide hormone primarily secreted by the anterior pituitary. A substantial increment in serum PRL levels physiologically occurs during pregnancy. Although the best-known biological functions of PRL are linked to lactation and reproduction, this hormone has been also associated with other physiological processes, including angiogenesis (14, 15). The major circulating PRL isoform is a 23-kDa single-chain polypeptide (monomeric PRL), which comprises up to 90% of total PRL; lesser amounts of big PRL and big big PRL (45–50 and >100 kDa, respectively) may be also detected using gel filtration chromatography (16, 17). There are two additional PRL isoforms that result from proteolytic cleavage of monomeric PRL (16- and 14-kDa fragments) (18) and that exhibit antiangiogenic effects (19, 20). Because abnormal angiogenesis is an essential component of the pathogenesis of preeclampsia and considering that PRL has pro- and antiangiogenic effects, we thought that PRL might be a potential candidate as biomarker for this disease. To analyze the relationship between preeclampsia and PRL, we herein measured serum PRL levels and urinary PRL (uPRL) excretion, and assessed PRL molecular heterogeneity in a larger number of healthy pregnant (HP) women and patients with hypertensive disorders of pregnancy.

## Patients and Methods

The study protocol was approved by our institute's review board. Written informed consent was obtained from all participants. All women were patients admitted to the Clinic of Hypertensive Diseases of Pregnancy of our hospital. Study participants were at gestational age 20 wk or older and had new-onset hypertension. Hypertension was defined as systolic blood pressure more than or equal to 140 mm Hg and/or diastolic blood pressure more than or equal to 90 mm Hg, measured twice at least 6 h apart, and that returned to normal values within 3 months after delivery. Hypertensive disorder of pregnancy was defined according to The American College of Obstetricians and Gynecology criteria (21). Gestational hypertension was defined as isolated hypertension without significant proteinuria, and mild preeclampsia (mPE) as hypertension and significant proteinuria [ $\geq 300$  mg protein in a 24-h urine specimen or a protein to creatinine ratio  $\geq 0.30$  in a random urine sample (22)]. Severe preeclampsia (sPE) was considered when either hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count (HELLP) syndrome, eclampsia, or preeclampsia with severe hypertension (systolic blood pressure  $\geq 160$  mm Hg and/or diastolic blood pressure  $\geq 110$  mm Hg on at least two occasions 6 h apart) or massive proteinuria [ $\geq 5$  g/d or a protein to creatinine ratio  $\geq 3.87$  (22)] was present. Other parameters included were a small for gestational age (SGA) infant [defined as an infant whose birth weight was below the 10th percentile (23)], persistent headache or

visual disturbances, presence of hemolysis or abnormal liver enzymes levels with upper-right quadrant or epigastric pain, thrombocytopenia ( $<100,000/\mu\text{l}$  in at least two samples), serum creatinine above of 1.0 mg/dl, pulmonary edema, oliguria ( $<500$  ml/d), or oligohydramnios.

A random urine sample was collected under sterile conditions (using a Foley catheter or clean catch technique), and a venous blood sample was simultaneously drawn under basal conditions and without hormonal or drug stimulus. Samples were centrifuged, and the resulting sera and sediment-free urine specimens were aliquoted and stored at  $-80$  C until assayed. All samples were collected before either induction of labor or cesarean delivery.

## PRL immunoassay

Immunoreactive PRL in serum and urine was determined by an ultrasensitive enzyme immunoassay as described (24). The sensitivity of the assay was 0.018 ng/ml, and the within- and between-assay coefficients of variation were 4.7 and 6.1%, respectively. uPRL levels were normalized for urinary creatinine concentration and expressed as ng PRL/mg creatinine. Urinary protein and creatinine were measured as previously described (22).

## Western blot analysis

The procedure used was similar to that previously reported (25). Briefly, samples (600  $\mu\text{l}$  urine or 400  $\mu\text{l}$  serum) were immunoprecipitated with 5  $\mu\text{l}$  rabbit anti-human PRL (hPRL) antiserum (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases-anti-hPRL-IC-5, CYTO) for 72 h at 4 C and subsequently with 5  $\mu\text{l}$  goat antirabbit  $\gamma$ -globulin antiserum (Dako Corp., Carpinteria, CA) for 24 h at 4 C. Normal rabbit serum (without unknown samples added) was used as a control. The immunoprecipitates were electrophoresed on a 15% SDS-PAGE. After electrophoreses, proteins were electroblotted onto polyvinylidene fluoride membranes and incubated overnight at 4 C in a 1:1000 final dilution of the same rabbit anti-hPRL serum or with an anti-hPRL monoclonal antibody (American Qualex, San Clemente, CA), and thereafter with a 1:2000 dilution of peroxidase-conjugated goat antirabbit or antimouse serum (Dako). The ECL Western Blotting substrate SuperSignal West Pico substrate kit (Pierce, Rockford, IL) was used to localize the immunocomplexes. The signal intensity was measured by densitometry using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Figure 1A shows the immunoreactivity of the N terminus of PRL toward the anti-hPRL monoclonal antibody used. When a truncated form of recombinant hPRL ( $\Delta 1-9$  hPRL) was used, the antibody was unable to detect this particular PRL species. In contrast, this antibody recognized both pituitary hPRL and full-recombinant hPRL, indicating that it reacts with the N-terminal end of PRL. Rabbit anti-hPRL monoclonal antibodies detected all PRLs as disclosed by immunoblotting.

## Incubation of hPRL with urine or cathepsin-D

$^{125}\text{I}$ -hPRL pituitary ( $1 \times 10^6$  cpm; specific activity 45–60  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  protein) was added to 0.6 ml urine from patients with sPE or to 100  $\mu\text{l}$  0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 3.5), containing 0.15 M NaCl and 1  $\mu\text{g}$  cathepsin-D (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (control incubation), and incubated for 72 h at 37 C. Thereafter,  $^{125}\text{I}$ -hPRL was immunoprecipitated, and cleaved-PRL products were investigated by immunoblotting.

## Statistical analysis

Differences between continuous variables were determined by the nonpaired Student's *t* test (or Mann-Whitney *U* test for nonnormally distributed variables). Differences between categorical variables were determined by the  $\chi^2$  test with Yates' continuity correction or the Fisher's exact test for small samples (or Mantel-Haenszel  $\chi^2$  with linear tendency for variables with more than two categories). Differences among three or more continuous variables were compared by one-way ANOVA, followed by *post hoc* procedures (Scheffé's test) or by the Kruskal-Wallis one-way test, followed by the Mann-Whitney *U* test for nonnormally distributed variables. The relationship between continuous variables was

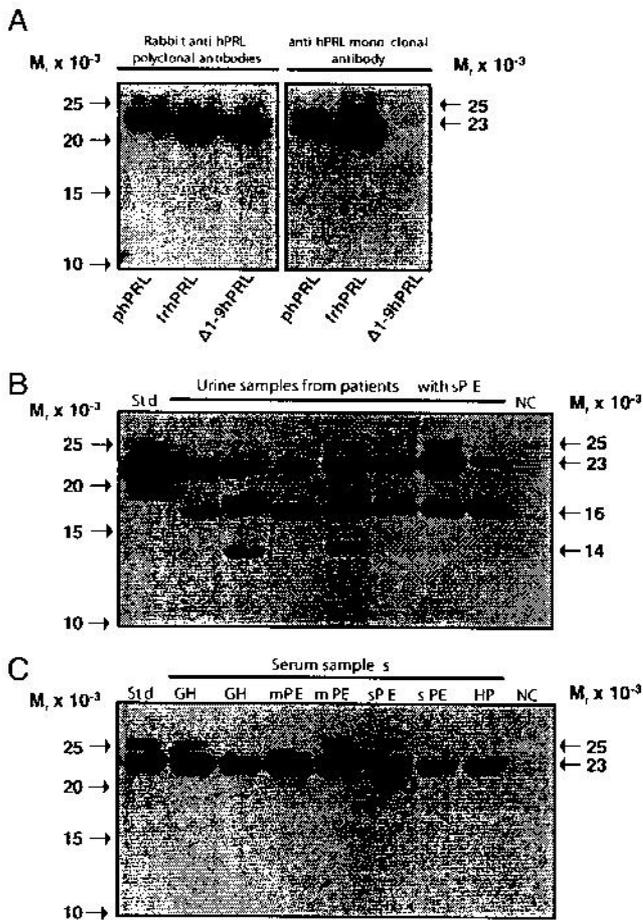


FIG. 1. A, Western blot analysis of pituitary hPRL (phPRL), full-recombinant hPRL (frhPRL), and recombinant  $\Delta 1-9$  hPRL. Blots were probed with rabbit anti-hPRL polyclonal antibodies (left panel) and with an anti-PRL monoclonal antibody that reacts with the N terminus of PRL (right panel). B and C, Representative Western blots of immunoreactive PRL in urine (B) and serum (C). Samples were immunoprecipitated with specific hPRL antisera and subjected to SDS-PAGE under reducing conditions. All blots were probed with an anti-hPRL monoclonal antibody. The numbers on the left indicate the position of the molecular mass markers. The estimated relative molecular mass ( $M_r$ ) of each band is shown on the right. GH, Gestational hypertension; NC, negative control; Std, human pituitary PRL standard (100 ng).

assessed by the Pearson's correlation coefficient. Multiple logistical regression models were additionally used to adjust the relationship between each variable studied and the diagnosis of preeclampsia. The log likelihood method was used to determine the best multiple logistical regression model. A two-tailed  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### General description of the population studied

A total of 546 consecutive pregnant women at 20-wk gestational age or older was included in the study. There were 207 women that did not meet the criteria for hypertensive disorders of pregnancy in further evaluations and were considered as HP; the remaining women (339) were diagnosed as having hypertensive disorders of pregnancy: 124 with gestational hypertension, 48 with mPE, and 167 with sPE. Compared with HP

women, patients with hypertensive disorders of pregnancy were older, and had higher frequency of prior preeclampsia, greater body mass index, higher blood pressures, and greater proportion of preterm delivery or delivered infants with significantly lower birth weights. The sPE group had higher blood pressures (both systolic and diastolic;  $P < 0.001$ ), lower gestational age at delivery ( $P < 0.001$ ), delivered infants with lower birth weights, and had a greater proportion of preterm delivery, SGA infants, oligohydramnios, and stillbirths or early neonatal death compared with women with gestational hypertension and mPE. Other adverse maternal outcomes that occurred only in patients with sPE were placental abruption ( $n = 13$ , 7.8%), liver rupture ( $n = 3$ , 1.8%), acute renal failure ( $n = 24$ , 14.4%), pulmonary edema ( $n = 9$ , 5.4%), and one maternal death (0.6%) due to cerebral hemorrhage (0.6%) (Table 1).

Clinical laboratory results are shown in Table 2. The final clinical diagnosis was supported by determining the protein to creatinine ratio in random urine samples (22). Women with preeclampsia had greater degrees of proteinuria compared with HP and gestational hypertension women ( $P \leq 0.007$ ). In addition, protein to creatinine ratios were significantly higher in sPE than in mPE ( $P < 0.001$ ). These findings were confirmed in a subset of women in whom 24-h urine collections were available (Table 2). Compared with other groups, women with sPE had higher serum levels of liver enzymes and lactate dehydrogenase, as well as lower platelet counts. In addition, women with mPE and sPE had higher serum uric acid levels, compared with HP and gestational hypertension women ( $P \leq 0.003$ ).

### Serum and uPRL concentrations

Table 3 shows serum and uPRL levels, as well as the presence of low molecular mass PRL isoforms as disclosed by immunoblotting. Serum PRL levels were significantly higher in patients with preeclampsia than in HP ( $P \leq 0.006$ ) and in patients with sPE than in those with gestational hypertension ( $P < 0.001$ ). uPRL was significantly ( $P < 0.001$ ) higher in patients with preeclampsia than in HP women and patients with gestational hypertension, and in sPE than in mPE ( $P < 0.001$ ). In addition, uPRL concentrations (normalized for creatinine excretion) showed a high discrimination power to identify the presence of preeclampsia; in HP and gestational hypertension women, the highest value of uPRL concentration was 0.94 ng/mg creatinine, whereas in patients with preeclampsia, the lowest uPRL concentration was 1.97 ng/mg creatinine (Table 3).

Logistical regression analysis was used to determine whether uPRL concentrations were independent of those variables with statistical significance in the univariate analyses shown in Tables 2 and 3. The former analysis was necessary considering that the degree of proteinuria, gestational age, and serum PRL levels showed statistical significance in the latter, and that these variables may distinctly affect uPRL excretion and thereby explain the higher uPRL concentrations in preeclampsia. The models are shown in Table 4. The  $\chi^2$  goodness-of-fit showed that the data were adjusted to the models [for preeclampsia (mild or severe) and for sPE:  $P = 0.32$  and  $P = 0.23$ , respectively]. Regardless of its severity, the model used for preeclampsia showed that only the uPRL concentration remained statistically significant ( $P =$

**TABLE 1.** Clinical and demographical characteristics of pregnant women with hypertensive disorders of pregnancy and HP women

Variable	HP (n = 207)	Gestational hypertension (n = 124)	P value <sup>a</sup>	mPE (n = 48)	P value <sup>a</sup>	sPE (n = 167)	P value <sup>a</sup>
Mean age ± sd (yr)	26.4 ± 5.5	29.5 ± 6.2	<0.001	27.5 ± 6.8		28.7 ± 6.0	0.002
Median gravidities (range)	2 (1–5)	2 (1–5)		2 (1–5)		2 (1–7)	
No. of primigravidae (%)	85 (41.7)	52 (41.9%)		23 (47.9%)		74 (44.3%)	
Median miscarriages (range)	0 (0–3)	0 (0–4)		0 (0–3)		0 (0–3)	
No. of prior preeclampsia (%)	5 (2.4%)	18 (14.5%)	<0.001	11 (22.9%)	<0.001	23 (13.8%)	<0.001
Mean maternal weight ± sd (kg)	70.3 ± 12.1	81.3 ± 15.0	0.004	76.6 ± 12.3	0.027	72.0 ± 12.4	
Mean body mass index ± sd	28.79 ± 4.41	33.00 ± 6.23	0.005	31.34 ± 5.23	0.015	29.97 ± 4.60	
Mean gestational age at enrollment ± sd (wk)	31.6 ± 3.2	34.1 ± 4.0	0.003	36.0 ± 3.8	0.021	32.2 ± 4.4	
Mean gestational age at delivery ± sd (wk)	38.8 ± 1.1	37.2 ± 2.0	<0.001	36.7 ± 2.4	<0.001	32.5 ± 4.3	<0.001
Mean infant birth weight ± sd (g)	3,140 ± 337	2783 ± 443	<0.001	2704 ± 522	<0.001	1629 ± 769	<0.001
No. of deliveries at <37 (wk) (%)	2 (1.0%)	31 (25%)	<0.001	18 (37.5%)	<0.001	138 (82.6%)	<0.001
No. of deliveries at <34 wk n (%)	0 (0.0%)	8 (6.5%)	<0.001	5 (10.4%)	<0.001	96 (57.5%)	<0.001
No. of SGA infants (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		102 (61.1%)	<0.001
No. of oligohydramnios (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		26 (15.6%)	<0.001
No. of placental abruptions (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		13 (7.8%)	<0.001
No. of livers ruptured (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		3 (1.8%)	
No. of acute renal failures (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		24 (14.4%)	<0.001
No. of pulmonary edemas (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		9 (5.4%)	0.014
No. of maternal deaths (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		1 (0.6%)	
No. of stillbirths or neonatal deaths (%)	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)		21 (12.6%)	0.002
Mean systolic blood pressure ± sd (mm Hg)	106.6 ± 9.5	143.9 ± 12.1	<0.001	143.1 ± 8.5	<0.001	164.1 ± 20.5	<0.001
Mean diastolic blood pressure ± sd (mm Hg)	69.4 ± 6.4	97.7 ± 8.2	<0.001	96.8 ± 4.9	<0.001	109.3 ± 12.5	<0.001

<sup>a</sup> vs. HP women after appropriate test statistics.

0.016) after being adjusted for the remaining variables included in the model. Similarly, in the model used for sPE, uPRL concentration remained with statistical significance ( $P < 0.001$ ). In addition, the other three variables included (gestational age, serum PRL levels, and degree of proteinuria) also remained statistically significant ( $P \leq 0.032$ ).

#### Western blot analysis of immunoreactive PRL in urine and serum

Immunoreactive PRL in urine specimens from HP, gestational hypertension, and mPE patients was virtually absent, as disclosed by Western blotting. In contrast, in 87 of 167 specimens from sPE women, at least one band was consistently detected. One band corresponding to 23-kDa PRL was present in all samples, whereas others (25, 16, and 14 kDa) were inconsistently displayed. The 25-kDa band, which corresponds to glycosylated PRL, was present in 52 of 87 urine samples, and the 16- and/or 14-kDa bands were present in 36 of 87 samples (Table 3 and Fig. 1B). A human pituitary PRL standard (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases), which was not immunoprecipitated before immunoblotting, also showed the 23- and 25-kDa bands. A band corresponding to 23-kDa PRL was consistently present in whole serum from HP, gestational hypertension, and preeclampsia, whereas a second, inconsistent band (25 kDa) was displayed by 18% of the samples. In contrast to urine specimens, immunoblotting of serum samples did not show the presence of the 14- or 16-kDa bands (Fig. 1C). No bands were observed when control samples were probed with normal rabbit serum instead of PRL antiserum (Fig. 1, B and C). Membranes probed with anti-hPRL monoclonal antibodies that

react with the N terminus of PRL yielded similar data than those obtained using rabbit anti-hPRL antiserum. Finally, there was a significant correlation ( $r = 0.883$ ;  $P < 0.001$ ) between the densitometric values of the 14- and 16-kDa fragments and uPRL concentrations (Fig. 2A).

Incubation of <sup>125</sup>I-hPRL 23 kDa with urine samples for 72 h was performed to investigate whether exposure to urine provokes PRL proteolysis. In control incubations (*i.e.* in the presence of cathepsin-D), <sup>125</sup>I-hPRL was clipped into 14- and 16-kDa PRL fragments, whereas no processing of <sup>125</sup>I-hPRL was detected after exposure of the radiolabeled hormone to urine samples from women with sPE (Fig. 2B).

#### Relationship between uPRL concentrations normalized for creatinine and the presence of 14- and/or 16-kDa PRL isoforms and severity of preeclampsia

For this analysis women were divided into three groups according to the severity of the disease. Group 1 was conformed by 48 patients with mPE. Group 2 included 111 patients with sPE but not HELLP syndrome or eclampsia, and group 3 comprised 42 patients with HELLP syndrome, including eight with eclampsia and six with both conditions. uPRL concentrations differed significantly ( $P < 0.001$ ) among these groups. Samples from group 1 contained the lowest amount of PRL [median 2.8 ng/mg creatinine (range 2.1–31.4)], whereas those from group 3 the highest [median 72.1 ng/mg creatinine (range 8.42–596.0)]. In group 2, uPRL concentrations were intermediate between groups 1 and 3 [median 12.5 ng/mg creatinine (range 1.97–319.0)]. Groups 2 and 3 differed in frequency of 14- and/or 16-kDa PRL isoforms in urine [4.5 vs. 55.4%, respectively;  $P <$

**TABLE 2.** Clinical laboratory results of HP women and women with hypertensive disorders of pregnancy

Variable	HP (n = 207)	Gestational hypertension (n = 124)	P value <sup>a</sup>	mPE (n = 48)	P value <sup>a</sup>	sPE (n = 167)	P value <sup>a</sup>
Median protein to creatinine ratio (range)	0.15 mg/mg (0.05–0.28)	0.18 mg/mg (0–0.29)		0.79 mg/mg (0.30–2.78)	<0.001	1.48 mg/mg (0.31–22.78)	<0.001
Median 24-h proteinuria (range)	(n = 57) 171.4 mg/d (91–217)	(n = 59) 188.2 mg/d (66–255)		(n = 34) 569.7 mg/d (341–2,522)	<0.001	(n = 109) 1,509.7 mg/d (317–23,348)	<0.001
Mean platelets ± sd (cells per $\mu$ l $\times$ 10 <sup>3</sup> )	194,223 ± 69,846	210,427 ± 57,382		186,234 ± 42,398		149,342 ± 70,458	<0.001
Median AST (range)	ND	30 U/liter (5–49)		32.5 U/liter (9–45)		38 U/liter (5–1,445)	<0.001
Median ALT (range)	ND	18 U/liter (3–41)		17 U/liter (7–48)		23 U/liter (5–1,430)	<0.001
Median LDH (range)	ND	221 U/liter (81–479)		249 U/liter (107–577)		274 U/liter (80–5,140)	<0.001
Mean uric acid ± sd (mg/dl)	5.1 ± 1.4	5.5 ± 1.6		6.1 ± 1.6	0.003	6.5 ± 1.9	<0.001

ND, Not done; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase.

<sup>a</sup> vs. HP women after appropriate test statistics.

**TABLE 3.** Serum PRL concentrations, uPRL levels (nonnormalized and nonnormalized for creatinine), and the presence of 14- and/or 16-kDa PRL isoforms in urine as disclosed by Western blot analysis of samples from HP women and women with hypertensive disorders of pregnancy

Variable	HP (n = 207)	Gestational hypertension (n = 124)	P value	mPE (n = 48)	P value	sPE (n = 167)	P value
Median serum PRL (range)	139.0 ng/ml (44.2–472.9)	148.6 ng/ml (47–449.3)	0.032	162.6 ng/ml (64.8–697.1)	0.027	190.5 ng/ml (75.5–522.9)	0.006
Median uPRL (range)	195.3 pg/ml (0–2,419.5)	229.1 pg/ml (0–1,416.2)		1,342.8 pg/ml (329.0–7,222.0)	<0.001	9,830.0 pg/ml (766.2–599,880.0)	<0.001
Median uPRL of creatinine (range)	0.20 ng/mg (0.0–0.94)	0.19 ng/mg (0.0–0.87)		2.77 ng/mg (2.1–31.4)	<0.001	21.2 ng/mg (1.97–596.0)	<0.001
PRL isoforms of 14 and/or 16 kDa in urine (%)	ND	0/124 (0.0%)		0/48 (0%)		36/167 (21.6%)	ND

ND = Not done.

<sup>a</sup> vs. HP women after appropriate test statistics.

**TABLE 4.** Variables with statistical significance in univariate analysis and that theoretically may be associated to the degree of uPRL excretion in women with preeclampsia (logistical regression models)

Variable	Preeclampsia (mild or severe)			sPE		
	Regression coefficient	SE	P Value	Regression coefficient	SE	P Value
Constant	14.6465			-0.1003		
Gestational age at enrollment (wk)	-0.8712	0.5097	0.087	-0.1630	0.0659	0.013
Serum PRL levels (ng/ml)	-0.0058	0.0169	0.731	0.0053	0.0024	0.032
Urine protein to creatinine ratio (mg protein/mg creatinine)	9.4874	9.8946	0.338	0.6403	0.2404	0.008
uPRL concentration (ng/mg creatinine)	8.0751	3.3573	0.016	0.6916	0.0876	<0.001

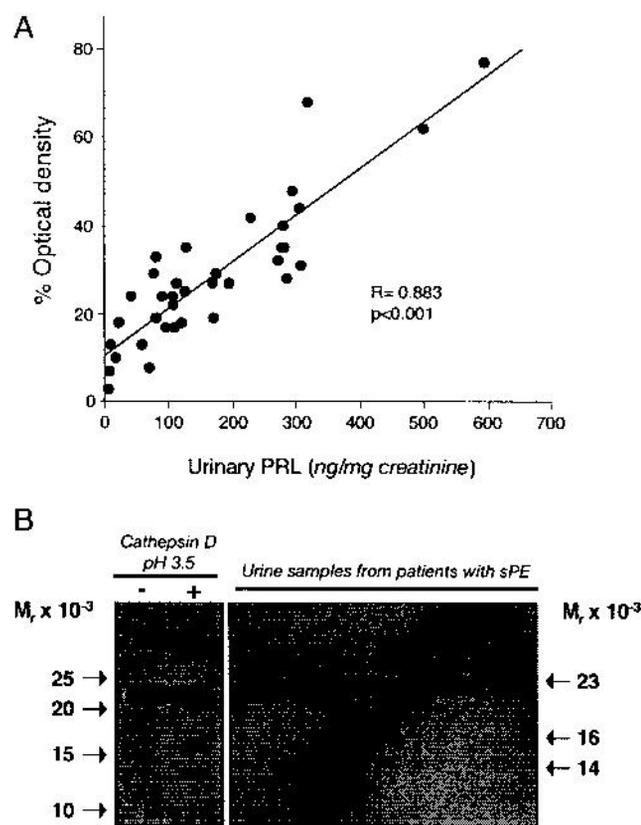
Percentage of the cases correctly classified: preeclampsia (mild or severe) 99.82% and sPE 96.70%.

0.001]. The same parameters were further compared among women with sPE with either HELLP syndrome, eclampsia, or both. The median of uPRL concentrations was significantly higher in patients with HELLP syndrome and eclampsia than in patients with isolated HELLP syndrome [259.5 ng/mg creatinine (range 51.1–395.0) *vs.* 57.1 ng/mg creatinine (range 8.4–596.0), respectively;  $P = 0.021$ ]. In patients with isolated eclampsia,

uPRL concentrations [85.1 ng/mg creatinine (range 21.4–237.2)] were not significantly different from those found in patients with isolated HELLP syndrome or when both conditions were present. Although the frequency of urinary 14- and/or 16-kDa PRL fragments was higher in patients with isolated eclampsia or patients with eclampsia and HELLP syndrome (75.0 and 83.3%, respectively) than in patients with only HELLP syndrome (47.6%), the differences were not statistically significant ( $P = 0.05$ ).

#### Relationship between uPRL concentrations normalized for creatinine and the presence of 14- and/or 16-kDa PRL isoforms with adverse pregnancy outcomes in sPE

Of 167 women with sPE, 13 had placental abruption, 24 developed acute renal failure (serum creatinine levels > 2.25 mg/dl), and nine had pulmonary edema. In all cases, medians of uPRL concentrations were significantly higher in patients who developed any of these adverse outcomes than in those who did not: placental abruption [98.7 ng/mg creatinine (range 40.94–528.99) *vs.* 17.55 ng/mg creatinine (range 1.97–596.02);  $P = 0.003$ ]; acute renal failure [127.16 ng/mg creatinine (range 6.00–596.02) *vs.* 17.23 ng/mg creatinine (range 1.97–528.99);  $P < 0.001$ ]; and pulmonary edema [225.9 ng/mg creatinine (range 8.60–500.00) *vs.* 21.05 ng/mg creatinine (range 1.97–596.02);  $P = 0.028$ ]. Likewise, there was a significant difference in frequency of 14- and/or 16-kDa PRL isoforms in urine between women with and without adverse pregnancy outcomes: placental abruption 46.2 *vs.* 19.5% ( $P = 0.036$ ); acute renal failure 45.8 *vs.* 17.5% ( $P = 0.004$ ); and pulmonary edema 55.6 *vs.* 19.6% ( $P = 0.023$ ). Interestingly, all samples were collected before clinical suspicion or diagnosis confirmation of these complications.



**FIG. 2.** A, Relationship between combined relative densitometric values of the 14- and/or 16-kDa PRL fragments [*i.e.* ratio of combined PRL fragments (14- plus 16-kDa bands in Fig. 1B) relative to total PRL signal in the same lane (determined by densitometric analysis)] in urine and uPRL concentrations in women with sPE. B, Western blot analysis of the proteolytic fragments generated from  $^{125}\text{I}$ -hPRL obtained at pH 3.5 for 72 h at 37 C in the absence or presence of cathepsin-D (*left panel*), and representative Western blots obtained after incubation of  $^{125}\text{I}$ -hPRL with urine samples from patients with sPE for 72 h at 37 C (*right panel*). The numbers on the left indicate the position of the molecular mass markers. The estimated relative molecular mass ( $M_r$ ) of each band is shown on the right.

## Discussion

Previous studies have reported that uPRL excretion in normal subjects is virtually undetectable unless samples are concentrated; even in concentrated specimens (~40-fold), levels measured by fluoroimmunoassay are relatively low (0.17–0.61 ng/mg creatinine) (26, 27). In the present study, involving a large number of HP women and patients with a wide spectrum of hypertensive disorder of pregnancy, we found that uPRL excretion was similar in HP women and patients with gestational hypertension, and

that levels were significantly higher in patients with preeclampsia. Furthermore, we were able to find that differences in PRL excretion were more pronounced as the severity of preeclampsia increased, regardless of the degree of proteinuria, gestational age, and serum PRL levels, suggesting that changes in uPRL concentration effectively reflect the extent and intensity of damage to the glomerular endothelium and, probably as well, to the systemic vascular endothelium. Moreover, higher PRL excretion was associated with more severe manifestations or complications of preeclampsia, including HELLP syndrome and eclampsia, placental abruption, acute renal failure, and pulmonary edema.

During the process of analysis of the data presented herein, González *et al.* (28) reported that uPRL concentrations did not differ in women with HP and sPE. However, their results should be considered with caution because of the small number of samples studied (eight from HP women and 13 from patients with sPE) and the fact that uPRL concentrations were calculated from random samples without normalization for creatinine excretion. In this regard, it is known that the measurement of a particular protein in random urine samples is likely to fluctuate because normal physiological variations in water excretion can dilute or concentrate urinary proteins, leading to inaccurate estimates of concentration values.

PRL excretion in samples from HP women and patients with gestational hypertension and mPE was undetectable as revealed by immunoblotting. This finding may be due to the low sensitivity of this technique for detecting PRL in small volume samples. In this regard, it is worth mentioning that only in those samples that contained 10–15 ng/ml or more was it possible to detect this protein by immunoblotting, and that samples from patients with sPE exhibited higher PRL concentrations than those from women with gestational hypertension and mPE.

Monomeric PRL can be proteolytically cleaved to yield 14- or 16-kDa fragments. In fact, the posttranslational modifications of PRL are among the mechanisms implicated in the functional diversity of PRL. The 14- and 16-kDa PRL fragments exhibit antiangiogenic effects both *in vitro* and *in vivo* (14, 19, 20, 29), and cathepsin-D, a lysosomal aspartyl protease, is the main enzyme involved in monomeric PRL cleavage (28, 30–32).

The finding that urine samples from patients with sPE were unable to process <sup>125</sup>I-hPRL into 14- or 16-kDa fragments suggests that PRL is not clipped in urine and that cleavage probably occurred in the glomerular endothelium. In this regard, it has been shown that endogenous cathepsin-D may generate antiangiogenic PRL fragments in kidney explants maintained at physiological pH (33). Furthermore, it has been demonstrated that antiangiogenic PRL fragments in amniotic fluid from patients with sPE are not processed locally, even when PRL is present at high concentrations; rather, they appear to derive from uteroplacental tissue through the action of endogenous cathepsin-D from placental trophoblasts, whose activity is up-regulated in PE (28). That antiangiogenic PRL fragments in urine may potentially derive from the glomerular endothelium is in consonance with the latter observation. Moreover, the finding that antiangiogenic PRL fragments were detected in urine, but not in serum, additionally suggests that cleavage of circulating intact PRL is a

local process, with minimal release of antiangiogenic PRL fragments into the circulation, and that their antiangiogenic effects are exerted directly on the endothelial cells, where they were generated. The observation that hPRL 23 kDa was detected in both serum and urine indicates that this particular PRL isoform derives from circulating PRL.

Although the antiangiogenic PRL fragments were found only in 21.6% of cases with sPE, they were more frequently detected as the severity of preeclampsia increased and were also frequently found in women who developed placental abruption, acute renal failure, or pulmonary edema. These findings agree with recent data showing that antiangiogenic PRL fragments (14, 16, and 18 kDa) are more frequently detected in serum, amniotic fluid, or urine from patients with sPE than from HP women (28). The overall data coupled with the finding that amniotic fluid from patients with preeclampsia, but not from HP women, inhibited vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation and nitric oxide synthase activity in cultured endothelial cells (28) suggest that PRL might contribute to the pathophysiology of preeclampsia.

Although we and others have found that high-serum PRL levels are associated with sPE independently of gestational age, degree of proteinuria, and uPRL excretion (34; present study), other studies have failed to demonstrate such an association (35–37). Possible explanations for these apparent discrepancies include differences in selection criteria (*i.e.* inclusion of women with mPE) and the relatively small number (<30) of sPE patients. The observation of a modest, albeit significant, increase of circulating PRL in women with sPE suggests that higher PRL concentrations may allow for local generation of antiangiogenic PRL fragments in the endothelial cells. Nevertheless, the source of the higher circulating PRL concentrations in this subset of women cannot be ascertained due to the limitations imposed by the cross-sectional design used.

In summary, uPRL excretion is markedly elevated in preeclampsia at diagnosis, and both uPRL concentrations and the presence of antiangiogenic PRL fragments in urine are closely associated with the severity of preeclampsia and the occurrence of adverse pregnancy outcomes. The measurement of uPRL excretion can be used as a reliable biomarker for preeclampsia, its severity, and the occurrence of complications. Further prospective longitudinal studies are still needed to assess whether determining uPRL and PRL isoform excretion in early pregnancy may accurately predict the development of preeclampsia in patients with increased risk, as well as to elucidate the origin of PRL isoforms and their ultimate role in the pathogenesis of hypertensive disorders of pregnancy.

## Acknowledgments

We thank the National Hormone and Pituitary Program, and Dr. A. F. Parlow, Harbor-University of California Los Angeles, Torrance, California, for providing the purified hormones and antisera.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Alfredo Leañós-Miranda, Research Unit in Reproductive Medicine, Don Luis no.

131. Col. Nativitas, México 03500, D.F., México. E-mail: alfredolm@yahoo.com.

This study was supported by Grant FIS/IMSS/PROT/C2007/046 (to A.L.-M.) from the Fondo de Investigación en Salud-Instituto Mexicano del Seguro Social, México. A.U.-A was the recipient of a Research Career Development Award from the Fundación-Instituto Mexicano del Seguro Social (México).

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

## References

- Roberts JM 1998 Endothelial dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 16:5–15
- Cheesley IC 1985 Diagnosis of preeclampsia. *Obstet Gynecol* 65:423–425
- Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. 2000 *Am J Obstet Gynecol* 183:S1–S22
- Hauth JC, Ewell MG, Levine RJ, Esterlitz JR, Sibai B, Curet LB, Catalano PM, Morris CD 2000 Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. Calcium for Preeclampsia Prevention Study Group. *Obstet Gynecol* 95:24–28
- Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman RE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA 2003 Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlr1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 111:649–658
- Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF 2004 Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 350:672–683
- Kendall RL, Thomas KA 1993 Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10705–10709
- He Y, Smith SK, Day KA, Clark DE, Licence DR, Charnock-Jones DS 1999 Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity. *Mol Endocrinol* 13:537–545
- Ferrara N 2001 Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C1358–C1366
- Koga K, Osuga Y, Yoshino O, Hirota Y, Ruimeng X, Hirata T, Takeda S, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y 2003 Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2348–2351
- Buhimschi CS, Norwitz ER, Funai E, Richman S, Guller S, Lockwood CJ, Buhimschi IA 2005 Urinary angiogenic factors cluster hypertensive disorders and identify women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 192:734–741
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA; CPEP Study Group 2006 Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factor in preeclampsia. *N Engl J Med* 355:992–1005
- Levine RJ, Thadhani R, Qian C, Lam C, Lim KH, Yu KF, Blink AL, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA 2005 Urinary placental growth factor and risk of preeclampsia. *JAMA* 293:77–85
- Struman I, Bentzien F, Lee HY, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA 1999 Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1246–1251
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G 2000 Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80:1253–1631
- Sinha YN 1995 Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 16:354–364
- Pascoe-Lira D, Duran-Reyes G, Contreras-Hernández I, Manuel-Apolinar L, Blanco-Favela F, Leañós-Miranda A 2001 Frequency of macroprolactinemia due to autoantibodies against prolactin in pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab* 86:924–929
- 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
- Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Debruc 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, Naggano M, Kelly PA, Mejía S, Morales MA, Martínez de la Escalera G 1994 The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophysial system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10384–10388
- ACOG Committee on Practice Bulletins—Obstetrics 2002 ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. *Obstet Gynecol* 99:159–167
- Leañós-Miranda A, Márquez-Acosta J, Romero-Arauz F, Cárdenas-Mondragón MG, Rivera-Leaños R, Isordia-Salas I, Ulloa-Aguirre A 2007 Protein: creatinine ratio in random urine samples is a reliable marker of increased 24-hour protein excretion in hospitalized women with hypertensive disorders of pregnancy. *Clin Chem* 53:1623–1628
- Zhang J, Bowes Jr WA 1995 Birth-weight-for-gestational-age patterns by race, sex, and parity in the United States population. *Obstet Gynecol* 86:200–208
- Leañós-Miranda A, Contreras-Hernández I 2002 Antiprolactin autoantibodies are associated with hyperprolactinemia status in men infected with human immunodeficiency virus. *Endocrine* 19:139–146
- Leañós-Miranda A, Pascoe-Lira D, Chávez-Rueda K, Blanco-Favela F 2001 Persistence of macroprolactinemia due to antiprolactin autoantibody before, during, and after pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2619–2624
- Gala RR, Singhakowinta A, Brennan MJ 1975 Studies on prolactin in human serum, urine and milk. *Horm Res* 6:310–320
- Keely EJ, Faiman C 1994 Measurement of human urinary prolactin as a non-invasive study tool. *Clin Chem* 40(11 Pt 1):2017–2021
- González C, Parra A, Ramírez-Peredo J, García C, Rivera JC, Macotela Y, Aranda J, Lemini M, Arias J, Ibarra-Guioita F, de la Escalera GM, Clapp C 2007 Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest* 87:1009–1017
- Ferrara N, Clapp C, Weiner R 1991 The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129:896–900
- 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
- Baldocchi RA, Tan I, 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
- Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, Bonda T, Schaefer A, Sliwa K, Forster O, Quint A, Landmesser U, Doerries C, Luchtefeld M, Poli V, Schneider MD, Balligand JL, Desjardins F, Ansari A, Struman I, Nguyen NQ, Zschmisch NH, Klein G, Heusch G, Schulz R, Hilfiker A, Drexler H 2007 A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128:589–600
- Piwonka D, Fernandez I, Binart N, Touraine P, Kelly PA, Goffin V 2006 A new mechanism for prolactin processing into 16K PRL by secreted cathepsin D. *Mol Endocrinol* 20:3263–3278
- Chen BL, Zhang ZH, Liu NB, Huang KS 2001 [Prolactin in normal pregnancy and severe pregnancy-induced hypertension]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 26:67–69 (Chinese)
- Luciano AA, Varner MW 1984 Decidual, amniotic fluid, maternal and fetal prolactin in normal and abnormal pregnancies. *Obstet Gynecol* 63:384–388
- Miyakawa I, Taniyama K, Sakata M, Yamaguchi M, Mori N 1986 Prolactin in severe toxemia of pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 23:25–30
- Ranta T, Stenman UH, Unnérus HA, Rossi J, Sécplá M 1980 Maternal plasma prolactin levels in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 55:428–430