



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Campus UNAM Juriquilla, Querétaro.

“EFECTO DE LAS VASOINHIBINAS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO  
ENDOTELIAL: MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN E IMPLICACIONES FUNCIONALES”

# TESIS

Que para obtener el Grado de

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Presenta

M en C. Celina García Meléndrez

Directora de Tesis

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez

Juriquilla, Querétaro.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
*CAMPUS UNAM JURIQUILLA, QUERÉTARO.*

“Efecto de las vasoinhibinas sobre la producción de  
óxido nítrico endotelial: mecanismos de  
transducción e implicaciones funcionales”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

M en C. Celina García Meléndrez

DIRECTORA DE TESIS

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez

Juriquilla, Querétaro.

2009

Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez, contando con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo el número de becario 176233.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi tutora, la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez por aceptarme en su laboratorio y por la asesoría y apoyo que me brindó durante el desarrollo de la tesis. Así como al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera.

A los integrantes del comité tutorial, el Dr. Luis Vaca y el Dr. Manuel Aguilar; y a los miembros del jurado: Dr. Alfredo Varela, Dra. Patricia Joseph, Dra. Norma Bobadilla y Dr. Julio Morán.

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

A Antonio Prado y Daniel Mondragón por su asistencia cotidiana en el trabajo experimental, además de su valiosa amistad.

A la Q. Leonor Casanova, por la coordinación profesional de las actividades y trámites administrativos del posgrado. También agradezco la ayuda administrativa de María del Carmen Vázquez, Yolanda Orduña y Magdalena Reyes.

Además agradezco el apoyo de los miembros de la biblioteca y de otros servicios y unidades de apoyo del Instituto de Neurobiología representadas por: el Dr. Francisco Valles, el MVZ. Martín García, la Lic. Lourdes Lara, el ISC. Omar González y el M. en C. Alberto Lara.

A todos mis compañeros ausentes y presentes de los laboratorios de la Dra. Clapp y del Dr. Martínez de la Escalera con quienes compartí momentos muy especiales dentro y fuera del laboratorio.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Raquel y Policarpot,  
a mis hermanos J. Guadalupe, Elvira, Ernesto, Irma y Rubén  
y a mis sobrinos Carlos, Dyana, Diego, Marlene y David.

## ÍNDICE

ABSTRACT .....	1
RESUMEN .....	2
ABREVIATURAS .....	4
INTRODUCCIÓN .....	5
<i>Angiogénesis</i> .....	6
<i>Vasoinhibinas</i> .....	8
<i>eNOS</i> .....	10
<i>Retinopatías vasoproliferativas</i> .....	15
<i>Retinopatía diabética</i> .....	16
<i>Vasoinhibinas y retinopatías vasoproliferativas</i> .....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	21
HIPÓTESIS .....	22
OBJETIVOS .....	22
MATERIAL Y MÉTODOS .....	24
<i>Reactivos</i> .....	24
<i>Muestras de pacientes</i> .....	24
<i>Cultivo celular</i> .....	25
<i>Animales</i> .....	25
<i>Inyecciones intravitreales</i> .....	26
<i>Ensayo de permeabilidad in vitro</i> .....	26
<i>Ensayo de azul de Evans para medir la permeabilidad in vivo</i> .....	27
<i>Cuantificación de VEGF por ELISA</i> .....	28
<i>Western-blot</i> .....	28
<i>Ensayo de la citrulina</i> .....	29
<i>Ensayo de fosfatasa de proteínas 2A</i> .....	29
<i>Análisis estadístico</i> .....	29
RESULTADOS .....	31
DISCUSIÓN .....	44
CONCLUSIONES .....	52
ANEXO (Tabla 1) .....	53
REFERENCIAS .....	54

## **ABSTRACT**

Increased retinal vasopermeability contributes to diabetic retinopathy, the leading cause of blindness in working-age adults around the world. Despite clinical progress, effective therapy remains a major need. Vasoinhibins, a family of peptides derived from the protein hormone prolactin, antagonize the proangiogenic effects of vascular endothelial growth factor (VEGF), a primary mediator of retinal vasopermeability. Here, we demonstrate a novel function of vasoinhibins as inhibitors of the increased retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy. Vasoinhibins inhibit VEGF-induced vasopermeability in bovine aortic and rat retinal capillary endothelial cells *in vitro*. *In vivo*, vasoinhibins block retinal vasopermeability in diabetic rats and in response to intravitreal injection of VEGF or of vitreous from patients with diabetic retinopathy. Inhibition by vasoinhibins is similar to that achieved following immunodepletion of VEGF from human diabetic retinopathy vitreous or blockage of NO synthesis with L-NAME, suggesting that vasoinhibins inhibit VEGF-induced NOS activation. We further show that vasoinhibins activate protein phosphatase 2A (PP2A), leading to eNOS dephosphorylation at serine<sup>1179</sup> and, thereby, eNOS inactivation. Moreover, intravitreal injection of okadaic acid, a PP2A inhibitor, blocks the vasoinhibin effect on endothelial cell permeability and retinal vasopermeability. These results suggest that vasoinhibins have the potential to be developed as new therapeutic agents to control the excessive retinal vasopermeability observed in diabetic retinopathy and other vasoproliferative retinopathies.



## RESUMEN

El desarrollo de la retinopatía diabética, que es la principal causa de ceguera en los adultos de todo el mundo, depende del incremento en la permeabilidad vascular de la retina. La fotocoagulación con láser de la retina es el tratamiento convencional de la retinopatía diabética, sin embargo esta terapia no es del todo efectiva y daña por si misma a la retina. Recientemente, el uso de anticuerpos contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), uno de los principales mediadores de la vasopermeabilidad retiniana, han ofrecido resultados alentadores. Dado que las vasoinhibinas, una familia de péptidos derivados de la hormona prolactina, antagonizan la actividad proangiogénica del VEGF en diversos lechos vasculares, en el presente trabajo se plantearon dos objetivos principales: a) determinar la eficacia de las vasoinhibinas para reducir el aumento en la vasopermeabilidad retiniana característica de la diabetes, y en su caso; b) determinar los posibles mecanismos de acción involucrados.

Para abordar estos objetivos se emplearon modelos experimentales in vitro consistentes en cultivos de células endoteliales de aorta bovina o de retina de rata. También se emplearon modelos in vivo donde se analizó la vasopermeabilidad retiniana de ratas sanas o diabéticas (después de 15 días de haber sido inyectadas con estreptozotocina). La tasa de vasopermeabilidad fue determinada in vitro, mediante el transporte de la peroxidada de rábano a través de monocapas de células endoteliales. In vivo, la vasopermeabilidad retiniana se evaluó mediante el método del colorante azul de Evans.

Las vasoinhibinas inhibieron la vasopermeabilidad inducida in vitro por el VEGF y también la vasopermeabilidad retiniana en respuesta a la inyección intravítrea de VEGF o de extractos de vítreos de pacientes con retinopatía diabética. Asimismo, las vasoinhibinas

bloquearon la vasopermeabilidad retiniana que tiene lugar en ratas diabéticas. La magnitud de la inhibición inducida por las vaso inhibinas fue similar a la obtenida por la inmunocaptura del VEGF de los vítreos de los pacientes con retinopatía diabética. Como el efecto de las vaso inhibinas también pudo ser mimetizado por el bloqueo de la producción de óxido nítrico con L-NAME, se planteó la hipótesis que las vaso inhibinas podrían inhibir a las sintetasas de óxido nítrico activadas en respuesta al VEGF y de esta forma reducir la vasopermeabilidad. Dado que el VEGF incrementa la vasopermeabilidad a través de fosforilar, y por ende activar a la sintetasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) en el residuo de serina<sup>1179</sup> vía la cinasa de serina/treonina A (Akt), se determinó la actividad de las vaso inhibinas sobre la vía de desfosforilación de la eNOS en dicho residuo. Las vaso inhibinas activaron a la fosfatasa de proteínas 2A (PP2A), induciendo la desfosforilación de la eNOS en el residuo de serina<sup>1179</sup>, lo que resultó en la inactivación de la enzima. Más aún, el ácido okadaico, que es un inhibidor selectivo de la PP2A, bloqueó el efecto de las vaso inhibinas sobre la inhibición de la permeabilidad en los cultivos celulares y en los modelos in vivo de vasopermeabilidad retiniana.

Estos resultados en conjunto demuestran que las vaso inhibinas inhiben el aumento en la vasopermeabilidad retiniana asociada con la retinopatía diabética antagonizando las acciones del VEGF, por lo que podrían tener un interés terapéutico para el desarrollo de agentes farmacológicos dirigidos a controlar el incremento en la vasopermeabilidad en la retina característico de la retinopatía diabética y de otras retinopatías vasoproliferativas.

## ABREVIATURAS

Akt:	Treonin cinasa A
AO:	Ácido okadaico
APEC:	Asociación para Evitar la Ceguera en México
ARN:	Ácido ribonucleico
ARVO:	Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología
BAEC:	Células endoteliales de la aorta de bovino
bFGF:	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
Ca-CaM:	Complejo de calcio-calmodulina
Ctl:	Control
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ELISA:	Ensayo inmunoabsorbente acoplado a enzimas
eNOS:	Sintetasa endotelial de óxido nítrico
GMP:	Guanosín monofosfato
i.p:	Inyección intraperitoneal
iNOS:	Sintetasa de óxido nítrico inducible
L-NAME:	N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester
MAPKs:	Cinasas de proteínas activadas por mitógenos
MMP:	Metaloproteasas de matriz
NFKB:	Factor nuclear kappa B
nNOS:	Sintetasa de óxido nítrico neuronal
NO:	Óxido nítrico
NOS:	Sintetasas de óxido nítrico
PBS:	Amortiguador de fosfatos salino pH 7.4
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3K:	Proteína fosfoinosítido 3 cinasa
PP2A:	Fosfatasa de proteínas 2A
PRL:	Prolactina
Rap:	Rapamicina
rpm:	Revoluciones por minuto
RRCEC:	Células endoteliales de capilares de la retina de rata
TGF- $\beta$ :	Factor de crecimiento transformante beta
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular

## INTRODUCCIÓN

La retinopatía diabética es la principal causa de ceguera en los adultos de todo el mundo. Aproximadamente el 80% de los pacientes con diabetes desarrollan retinopatía diabética al cabo de las primeras dos décadas del padecimiento y se estima que estos números van a la alza, lo cual hace que la diabetes en general, y la retinopatía diabética en particular, sean un problema mayor de salud pública a nivel mundial. Se cree que el factor desencadenante de la retinopatía diabética es la hiperglicemia crónica característica de la diabetes mellitus, la cual promueve la apoptosis de los pericitos y de las células endoteliales, así como el engrosamiento de la membrana basal vascular y un incremento de la vasopermeabilidad retiniana, evento que antecede y determina la formación de vasos sanguíneos. Por lo que resulta fundamental encontrar nuevos factores capaces de prevenir la angiogénesis retiniana, y en particular el incremento de la vasopermeabilidad ya que eso permitiría desarrollar estrategias alternativas para prevenir la ceguera a consecuencia de la retinopatía diabética.

En ese sentido, se demostró que las vaso-inhibinas, una familia de fragmentos derivados de la hormona prolactina (PRL), inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), la supervivencia vascular y la vasodilatación (Clapp et al., 2006). Las vaso-inhibinas actúan directamente sobre las células del endotelio vascular inhibiendo las acciones proangiogénicas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Clapp et al., 1993, González et al., 2004), así como el efecto vasodilatador de sustancias como la acetilcolina y la bradicinina (González et al., 2004). Estas acciones parecen involucrar el bloqueo la producción del óxido nítrico (NO) endotelial (González et al., 2004), un

importante mediador de la vasopermeabilidad (Ziche y Morbidelli 2000, Walford y Loscalzo 2003).

Estudios recientes muestran que la transformación de la PRL a vaso-inhibinas tiene lugar en la retina y que dichos péptidos participan en la inhibición natural de la angiogénesis en este órgano (Aranda et al., 2005). Estas observaciones tienen particular interés ya que apuntan hacia un posible valor terapéutico de las vaso-inhibinas para controlar las alteraciones vasculares de la retinopatía diabética. Además, dado que las propiedades antiangiogénicas y vasoconstrictoras de las vaso-inhibinas ocurren vía la inhibición del NO endotelial y que la producción de NO en el endotelio también resulta en un aumento en la vasopermeabilidad, es posible que las vaso-inhibinas inhiban el aumento en la vasopermeabilidad retiniana que tiene lugar en la retinopatía diabética.

A continuación se conforma el marco teórico del presente estudio a través de revisar aspectos generales de la angiogénesis, de las vaso-inhibinas y de la producción NO por las sintetasa de NO (NOS), particularmente por la sintetasa de NO endotelial (eNOS). Se aborda también el tema de la angiogénesis ocular y de los mecanismos que llevan a las alteraciones vasculares que caracterizan a la retinopatía diabética.

### ***Angiogénesis***

El proceso de formación de nuevos vasos capilares sanguíneos a partir de vasos pre-existentes se conoce con el nombre de angiogénesis. Este proceso ocurre muy activamente durante el desarrollo embrionario y fetal, donde es esencial para el crecimiento y diferenciación de los tejidos. En el adulto, la red capilar se renueva muy lentamente y la angiogénesis está confinada a eventos en el aparato reproductor femenino. Por ejemplo, en el desarrollo de los folículos ováricos, la formación del cuerpo lúteo, el establecimiento de la placenta y el crecimiento de la glándula mamaria (Carmeliet 2003). La angiogénesis

también es esencial en procesos de reparación y cicatrización tisular a consecuencia de lesiones o fracturas (Folkman y Shing 1992). Sin embargo, el enorme interés por entender los mecanismos que regulan la angiogénesis es consecuencia del reconocimiento de diversas patologías que dependen de la sobreproducción de neovasos. La angiogénesis determina el desarrollo de los tumores sólidos (Folkman 1992). Los nuevos vasos sanguíneos permiten al tumor alcanzar una tasa de crecimiento máxima al aportar oxígeno y nutrientes y extraer sustancias de desecho. Además, los nuevos capilares proveen una ruta para la migración de las células tumorales hacia la formación de tumores secundarios o metástasis (Folkman 1992). Otro padecimiento dependiente de la angiogénesis es la artritis reumatoide, en la que los nuevos vasos sanguíneos invaden y destruyen el cartílago de la articulación (Folkman 1995). Más aún, las principales patologías de la retina que incluyen a las retinopatías vasoproliferativas y que son las principales causas de ceguera en la infancia (retinopatía del prematuro), en pacientes diabéticos (retinopatía diabética) y en personas mayores de 65 años (degeneración macular asociada con la edad) dependen de la sobreproducción de vasos sanguíneos en la retina (Adamis et al., 1999, Dorrell et al., 2007). Dada la importancia de la angiogénesis, tanto en procesos fisiológicos como patológicos, se ha dedicado un importante esfuerzo a la identificación y caracterización de factores moleculares que intervienen en su regulación, con la esperanza de que aquellos agentes capaces de controlar el crecimiento vascular pudieran ser utilizados como una opción para el tratamiento de las patologías mencionadas.

La función endotelial está regulada por múltiples factores estimulatorios e inhibitorios que actúan sobre las diferentes fases del proceso angiogénico. A saber, la proliferación, migración, asociación, y diferenciación de células endoteliales en capilares (Folkman y Shing 1992). Muchos de estos factores son de origen endócrino y parácrino, pero también

autócrino, es decir, producidos por las propias células endoteliales (Folkman y Shing 1992). Entre los factores proangiogénicos sobresalen el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) (Collin-Osdoby et al., 2002), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (Roberts et al., 1986), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Smits et al., 1989) y el VEGF (Ferrara y Henzel 1989) entre otros. Por su parte, los factores antiangiogénicos mayoritariamente incluyen a productos que resultan del procesamiento proteolítico de proteínas de mayor tamaño frecuentemente inactivas en la angiogénesis como la angiostatina, un grupo de fragmentos internos del plasminógeno (Cao et al., 2002); la endostatina, un fragmento de la colágena tipo XVIII (O'Reilly et al., 1997); un fragmento de la antitrombina (O'Reilly et al., 1999) y las vasoinhibinas (Clapp et al., 2006).

### ***Vasoinhibinas***

Las vasoinhibinas representan a una familia de péptidos derivados de la proteólisis de la hormona PRL que poseen acciones antiangiogénicas y vasoconstrictoras (Clapp et al., 2006). Se producen por la acción de proteasas del tipo de la catepsina D (Baldochi et al., 1993), la proteína morfogénica de hueso tipo 1 (Ge et al., 2007) y por las metaloproteasas de matriz (MMP) (Macotela et al., 2006). La proteólisis enzimática de la PRL humana por catepsina D produce vasoinhibinas de 15 kDa, 16.8 kDa y 17.2 kDa (Piwnica et al., 2004), la proteína morfogénica de hueso tipo 1 genera vasoinhibinas de 18 kDa, mientras que las MMP (1, 2, 3, 8, 9 y 13) vasoinhibinas de 17 kDa, 16 kDa y 14 kDa (Macotela et al., 2006).

Si bien, la incubación in vitro de la PRL con diversas proteasas genera a las vasoinhibinas, es poco lo que se sabe acerca de su producción in vivo. Al respecto, se ha propuesto que la catepsina D presente en los gránulos de secreción de PRL de los lactotrofos hipofisarios procesa la PRL hacia vasoinhibinas (Cruz-Soto et al., Abstract

ENDO 2008) y que las MMP secretadas por el cartílago generan vasoinhibinas a partir de la PRL presente en el líquido sinovial (Macotella et al., 2006). En apoyo a la generación fisiológica de vasoinhibinas, se ha reportado la presencia de estos péptidos en la hipófisis (Clapp et al., 1994, Torner et al., 1995) y en varios tejidos extrahipofisarios incluyendo al tejido neural hipotalámico (Torner et al., 2004) y en tejidos ya sea avasculares como el del cartílago (Macotella et al., 2006) o donde la vasculatura se encuentra altamente restringida como el de la retina (Aranda et al., 2005).

Las vasoinhibinas actúan como potentes inhibidores de la angiogénesis *in vivo*, inhibiendo la angiogénesis en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (Clapp et al., 1993), la angiogénesis inducida por el bFGF en la córnea de la rata (Dueñas et al., 1999), y la vascularización y crecimiento de tumores en animales inmunosuprimidos (Bentzien et al., 2001, Kim et al., 2003). Las vasoinhibinas actúan directamente sobre las células endoteliales que conforman los vasos capilares sanguíneos inhibiendo su proliferación en respuesta al VEGF y al bFGF (Clapp et al., 1993, Tabruyn et al., 2005), la migración inducida por la interleucina 1- $\beta$  (Lee et al., 1998), y la supervivencia endotelial (Martini et al., 2000).

Ensayos de unión y entrecruzamiento utilizando vasoinhibinas marcadas isotópicamente muestran la presencia de sitios de unión específicos, saturables y de alta afinidad ( $K_d$  1 nM) en membranas de células endoteliales aisladas (Clapp y Weiner 1992). Estos sitios de unión se asocian a proteínas de 32 y 52 kDa que pueden representar los receptores responsables de mediar los efectos de las vasoinhibinas. La naturaleza química de estos posibles receptores no se ha dilucidado, si bien se conocen algunos de los mecanismos de su señalización (Clapp et al., 2006, Clapp et al., enviado para su publicación). Por ejemplo, las vasoinhibinas inhiben la activación de las cinasas de



proteínas activadas por mitógenos (MAPKs) a nivel de Ras (D'Angelo et al., 1995, D'Angelo et al., 1999), inhiben la actividad de la urokinasa activadora del plasminógeno vía la expresión del inhibidor del plasminógeno tipo 1 (Lee et al., 1998), y estimulan la apoptosis del endotelio vascular a través de la activación de las caspasas 1, 3, 8 y 9 vía el factor nuclear kappa B (NFkB) y la inhibición de la acción anti-apoptótica de miembros de la familia Bcl-2 (Martini et al., 2000, Tabruyn et al., 2003). Además, estudios recientes muestran que donadores de NO bloquean el efecto inhibitorio de las vaso-inhibinas sobre la proliferación endotelial inducida por el VEGF (González et al., 2004), lo que sugiere que el efecto antiproliferativo de las vaso-inhibinas puede deberse a su efecto sobre la inhibición de la sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y por consecuencia de la producción de NO. La inhibición de la eNOS resulta en otros efectos asociados a la homeostasis vascular como es la regulación del tono vascular. Las vaso-inhibinas bloquean la activación de la eNOS inducida por dos importantes vasodilatadores, la acetilcolina y la bradicidina, e interfieren con sus efectos sobre la dilatación de segmentos aislados de aorta de conejo y de vasos coronarios de rata y de cobayo (González et al., 2004).

### *eNOS*

El NO es un radical libre que posee una gran diversidad de efectos en el organismo, entre los que sobresalen acciones sobre la neurotransmisión, el sistema cardiovascular y la inflamación (Geller y Billar 1998). En células de mamíferos se produce por acción de tres enzimas llamadas en conjunto sintetasa de NO (NOS). Y aunque son codificadas por genes diferentes, comparten entre ellos un 50-60% de similitud en su secuencia (Geller y Billar 1998), en los casos en los que estas isoformas han sido clonadas en más de una especie el grado de similitud entre las diferentes especies para una misma isoforma es de alrededor de 90% (Geller y Billar 1998). Este grupo de enzimas catalizan la oxidación de cinco

electrones de uno de los nitrógenos del grupo guanidino de la L-arginina, formando NO y L-citrulina como subproducto en una relación equimolar.

Hasta el momento, se han descrito la NOS neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS). Dos de estas isoenzimas, la nNOS y la eNOS, están continuamente presentes y por lo tanto son llamadas constitutivas además de que dependen de calcio para su activación, mientras que la iNOS, como su nombre lo indica, requiere que su expresión sea inducida por ciertas citocinas y lipopolisácaridos y su actividad es independiente de calcio.

El NO producido por el endotelio vascular en respuesta a estímulos físicos y químicos por acción de la eNOS estimula la vasorelajación, la permeabilidad vascular y disminuye la adhesión de leucocitos y plaquetas a las células endoteliales (Ziche y Morbidelli 2000, Walford y Loscalzo 2003). El NO, producto de la eNOS, estimula también la angiogénesis a través de promover la proliferación, la permeabilidad y la migración de las células endoteliales y disminuir su apoptosis (Gao et al., 2002). Se ha mostrado que el NO induce la neovascularización de heridas (Schwentker et al., 2002) y tumores (Fukumura y Jain 1998), y que la angiogénesis disminuye en el ratón knockout para la eNOS (Murohara et al., 1998) y también después del tratamiento con inhibidores farmacológicos o naturales de la eNOS en respuesta al VEGF (Papapetropoulos et al., 1997, Jang et al., 2000).

El VEGF promueve la vasopermeabilidad favoreciendo el flujo de solutos tanto de manera paracelular como transcelular; altera a las proteínas que forman las uniones estrechas (Kevil et al., 1998) mediante la redistribución de las ocludinas (Antonetti et al., 1998), y favorece la formación de caveolas en las células endoteliales (Feng et al., 1999). Cabe señalar que el VEGF no estimula la permeabilidad en el ratón knockout de la eNOS

(Fukumura et al., 2001) y los inhibidores de las NOS previenen la hiperpermeabilidad inducida por el VEGF en ratas (Tilton et al., 1999).

Si bien la eNOS puede ser regulada por mecanismos que estimulan o inhiben su expresión, su activación depende fundamentalmente de mecanismos postraduccionales (Wu 2002). Dentro de dichos mecanismos resaltan por su importancia los cambios conformacionales de la eNOS asociados a su unión con el complejo de calcio-calmodulina (Ca-CaM). El aumento en la movilización de calcio intracelular y la consecuente formación/activación del complejo Ca-CaM es central para la activación de la eNOS (Dudzinski et al., 2005). Además, la fosforilación de ciertos de sus residuos de serina y treonina (Boo y Jo 2003) es necesaria para la activación de la eNOS. Ambos mecanismos están interrelacionados ya que se ha propuesto que la fosforilación del residuo de serina<sup>1179</sup> facilita la unión de la eNOS al complejo Ca-CaM (McCabe et al., 2000).

El NO media los efectos vasoproliferativos y vasopermeables del VEGF (Papapetropoulos et al., 1997, Parenti et al., 1998, Shizukuda et al., 1999, Tilton et al., 1999, Fukumura et al., 2001, Gelinas et al., 2002, Kimura y Esumi 2003) a través de inducir la fosforilación de la serina<sup>1179</sup> de la eNOS. Precisamente, el VEGF activa a la proteína fosfoinosítido 3 cinasa (PI3K), que a su vez fosforila/activa a la treonin cinasa A (Akt), enzima responsable de fosforilar la serina<sup>1179</sup> de la eNOS (Dimmeler et al., 1999, Fulton et al., 1999). Por otro lado, la fosforilación de la serina<sup>1179</sup> puede ser revertida por la acción de la fosfatasa de proteínas 2A (PP2A) (Michell et al., 2001, Greif et al., 2002), lo que resulta en la inactivación de la eNOS. Más aún, la PP2A puede interferir indirectamente con la fosforilación de la eNOS a través de desfosforilar/inactivar a Akt (Ugi et al., 2004).

La importancia de los procesos de fosforilación/desfosforilación para la actividad de eNOS es tal que inhibir la fosforilación de eNOS puede bloquear su activación a pesar de la presencia de calcio intracelular (Li et al., 2004) y su ocurrencia activa a la eNOS aún en ausencia de un aumento en el calcio citosólico (Fulton et al., 1999). Además, la transfección de células endoteliales con una construcción de eNOS en la que se ha intercambiado la serina<sup>1179</sup> por un aspartato (S1179D) para mimetizar la fosforilación en este residuo, estimula significativamente la producción de NO y la migración de las células endoteliales aún en ausencia de calcio citosólico (Dimmeler et al., 1999, Fulton et al., 1999, Dimmeler et al., 2000, McCabe et al., 2000). Por el contrario, la transfección con una mutante no fosforilable de la eNOS, donde se le ha intercambiado la serina<sup>1179</sup> por una alanina (S1179A) disminuye la producción de NO endotelial aún en presencia de calcio citosólico (Dimmeler et al., 1999, Fulton et al., 1999), e interfiere con los efectos proangiogénicos del VEGF (Dimmeler et al., 2000).

Dado que las vasoinhibinas bloquean la activación de la eNOS (González et al., 2004) es posible que dicho efecto implique la inhibición de la fosforilación de esta enzima. La fosforilación/activación de la eNOS se ha ligado con funciones vasculares dependientes del NO que incluyen la vasodilatación, la vasopermeabilidad y la angiogénesis (Ziche y Morbidelli 2000, Fukumura et al., 2001, Walford y Loscalzo 2003), y representa un importante sistema de regulación bajo condiciones fisiológicas y patológicas. En este mismo sentido, se ha reportado que ratones transgénicos que expresan solamente una forma constitutivamente fosforilada de la eNOS, debido a que presentan una mutación que intercambia la serina<sup>1179</sup> por un aspartato (S1179D) en la misma posición, responden mejor a factores vasorelajantes y muestran una incrementada reperusión durante la isquemia, reduciendo así la severidad de los infartos cerebrales (Atochin et al., 2007). Además del

VEGF, el estrés mecánico inducido por el flujo sanguíneo y factores vasoactivos, incluyendo a hormonas como la insulina (Montagnani et al., 2001) y los estrógenos (Hisamoto et al., 2001), inducen la fosforilación de la eNOS. La desfosforilación de la serina<sup>1179</sup> por la acción de las vasoinhibinas puede por lo tanto representar un mecanismo común por el cual las vasoinhibinas contrarrestan los efectos de varias sustancias vasoactivas.

El reconocimiento del papel de los vasos sanguíneos en el crecimiento y funcionamiento de diversos tejidos, así como en el establecimiento y la progresión de un amplio espectro de padecimientos ha despertado un interés considerable en la identificación de factores antiangiogénicos, proapoptóticos e inhibidores de la permeabilidad vascular que pudieran representar herramientas terapéuticas capaces de bloquear la formación de neovasos, la extravasación de fluidos o de promover la involución vascular. El ojo es uno de los órganos en los que se presenta un control estricto de la proliferación y función vascular (Gariano y Gardner 2005). El control de estos procesos es central para el funcionamiento ocular y su alteración conlleva a un grupo de enfermedades conocidas como retinopatías vasoproliferativas que son la principal causa de ceguera a nivel mundial (Adamis et al., 1999, Qaum et al., 2001, Keshet 2001, Cai y Boulton 2002, Wheatley et al., 2002, Gariano y Gardner 2005, Dorrell et al., 2007). En las siguientes secciones se describe la influencia de la angiogénesis en el desarrollo de estos padecimientos, en particular sobre la retinopatía diabética, así como evidencias de que las vasoinhibinas podrían representar factores reguladores de la angiogénesis ocular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

### ***Retinopatías vasoproliferativas***

En el adulto sano, el ojo contiene varios compartimentos avasculares, incluyendo a la córnea, el cristalino, el humor vítreo y la mitad externa de la retina (Adamis et al., 1999, Dorrell et al., 2007). Cuando estas estructuras se vascularizan y se promueve la vasopermeabilidad, la agudeza visual disminuye, se genera opacidad ocular, y se producen las retinopatías vasoproliferativas, que incluyen a la retinopatía diabética, la retinopatía del prematuro y a la degeneración macular asociada con la edad. La diabetes afecta aproximadamente al 10% de la población mundial y la retinopatía diabética es la principal causa de ceguera en personas entre los 20 y los 65 años de edad (Klein et al., 1994, Yam y Kwok 2007). Se considera que después de 20 años con diabetes, el 98% de los pacientes con diabetes tipo 1 y más del 60% de los pacientes con diabetes tipo 2 presenta algún tipo de retinopatía (Klein et al., 1994, Gariano y Gardner 2005, Yam y Kwok 2007). Asimismo, la retinopatía del prematuro es un problema de salud en países del tercer mundo como el nuestro. Se estima que el 66% de los infantes prematuros desarrolla retinopatía del prematuro si su peso al nacer es menor a 1.25 kg y que este porcentaje es mayor (82%) en prematuros con pesos menores a 1 kg (Reynolds 2001, Wheatley et al., 2002). Si bien, la retinopatía del prematuro puede ser controlada mediante la fotocoagulación de los neovasos durante las primeras semanas fuera de la incubadora (Reynolds 2001) esta práctica no es siempre factible en los centros nacionales de salud y muchos de estos niños pierden la vista. Finalmente, la degeneración macular asociada con la edad representa la principal causa de ceguera en personas mayores de 60 años (Antoniak et al., 2008). El común denominador de las retinopatías vasoproliferativas, al igual que de otros padecimientos que dependen de la angiogénesis, es la hipoxia tisular que es a su vez la consecuencia de una reducción severa

o completa en la perfusión sanguínea (isquemia) (Gariano y Gardner 2005). A continuación se detallan los mecanismos propuestos para el desarrollo de la retinopatía diabética.

### ***Retinopatía Diabética***

La retinopatía diabética es la principal causa de ceguera en los adultos de todo el mundo (Klein et al., 1994, Mohamed et al., 2007, Yam y Kwok 2007). En México se estima que si bien el 10% de la población padece diabetes, sólo 7 de cada 10 diabéticos han sido debidamente diagnosticados, y por lo tanto han iniciado algún tratamiento para su control. Se acepta que el factor desencadenante de la retinopatía diabética es la hiperglicemia crónica, la cual promueve la apoptosis de las células asociadas al capilar llamadas pericitos y de las células endoteliales, así como el engrosamiento de la membrana basal capilar y un incremento de la vasopermeabilidad retiniana. Dicho incremento resulta en múltiples hemorragias y en la generación de exudados que interfieren con la visión cuando ocurren en la mácula (Knudsen et al., 2002, Hammes 2005). Con el tiempo estas hemorragias intraretinales y la oclusión de los capilares generan áreas de isquemia que provocan una hipoxia localizada. La hipoxia promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de estimular la producción en la retina de factores angiogénicos del tipo del VEGF. En estados avanzados de la enfermedad, estos neovasos invaden, y sangran al humor vítreo produciendo una membrana fibrovascular que puede ocasionar el desprendimiento de la retina y la consecuente ceguera. Diversos estudios muestran que un estricto control glicémico puede retrasar o incluso prevenir el establecimiento de la retinopatía diabética (Klein et al., 1994, Yam y Kwok 2007). Lamentablemente, las lesiones de la vasculatura retiniana persisten incluso cuando se ha vuelto a la normoglicemia (Klein et al., 1994, Adamis et al., 1999). A la fecha la fotocoagulación con láser es el tratamiento convencional para controlar la retinopatía diabética, ya que frena la

permeabilidad de los vasos sanguíneos en la retina y el efecto de los factores proangiogénicos al disminuir las zonas de isquemia en la misma (Yam y Kwok 2007). Aunque la fotocoagulación con láser es efectiva previniendo la pérdida visual en la mayoría de los casos, raramente mejora la agudeza visual (Bloomgarden 2007). Además, el tratamiento con láser puede dañar el tejido neural, por lo que la visión puede incluso empeorar (Bloomgarden 2007).

El VEGF, reconocido como el factor que incrementa la vasopermeabilidad e induce angiogénesis en la retinopatía diabética (Caldwell et al, 2003), se encuentra elevado en modelos animales de retinopatías vasoproliferativas (Miller et al., 1994), así como en fluidos oculares de pacientes con retinopatías (Aiello et al., 1994). El aumento del VEGF intraocular resulta en vasodilatación, hemorragias retinianas, incremento de la permeabilidad vascular y neovascularización en animales no diabéticos (Tolentino et al., 1996, Aiello et al., 1997, Clermont et al., 1997, Miyamoto et al., 2000). Mientras que terapias basadas en la inhibición de la expresión y/o de la acción del VEGF han probado ser parcialmente efectivas y seguras para tratar las retinopatías vasoproliferativas (Emerson y Lauer 2007, Yam y Kwok 2007, Simó y Hernández 2008), éstas parecen tener efectos transitorios y necesitan ser evaluadas en fase clínica III. Sin embargo, su uso ya ha sido autorizado para la degeneración macular asociada con la edad y están siendo utilizadas por oftalmólogos para tratar casos avanzados de retinopatía diabética y edema macular diabético (Simó y Hernández 2008).

Por razones que a continuación se describen, las vaso-inhibinas se presentan como posibles factores capaces de contribuir a la inhibición fisiológica de la angiogénesis y la vasopermeabilidad ocular y de sus alteraciones patológicas determinantes de las retinopatías vasoproliferativas como la diabética.



### ***Vasoinhibinas y retinopatías vasoproliferativas***

La prolactina (PRL) se ha detectado en el humor acuoso del ojo humano (Pleyer et al., 1991, Dueñas et al., 2004) y tanto la PRL como las vasoinhibinas están presentes en la retina de la rata (Aranda et al., 2005, Rivera et al., 2008). La PRL ocular puede derivar de la hormona circulante (O'Steen y Sundberg 1982) y también originarse a partir de su síntesis local. Estudios de hibridación in situ y de inmunohistoquímica muestran que el ARN mensajero de la PRL y la proteína se encuentran localizados en diferentes tipos celulares de la retina que incluyen los fotorreceptores, las células de Muller, las interneuronas, las células ganglionares y los astrocitos (Aranda et al., 2005, Rivera et al., 2008). Asimismo, células endoteliales de la retina en cultivo sintetizan y secretan PRL (Ochoa et al., 2001); y los vasos sanguíneos provenientes de membranas fibrovasculares de pacientes con retinopatía del prematuro expresan el RNA mensajero de la PRL y procesan a la proteína hacia vasoinhibinas por acción de proteasas presentes en la retina (Dueñas et al., 2004).

Estudios recientes muestran que las vasoinhibinas participan en la inhibición natural de la angiogénesis ocular (Aranda et al., 2005). Anticuerpos capaces de inmunosequestrar a las vasoinhibinas indujeron la formación de vasos sanguíneos en la córnea (Dueñas et al., 1999) y en la retina (Aranda et al., 2005) de la rata. Además, la inyección intraocular de pequeños ARNs de interferencia capaces de bloquear la expresión de PRL estimuló la angiogénesis y la vasodilatación en la retina (Aranda et al., 2005). Más aún, la inmunoinactivación de vasoinhibinas en el ojo de ratas recién nacidas revirtió la apoptosis de las células vasculares presentes en los vasos hialoideos, un sistema vascular intraocular que en la rata involuciona por apoptosis después del nacimiento (Taniguchi et al., 1999).

Esta última observación sugiere que las vasoinhibinas estimulan la regresión fisiológica de vasos intraoculares durante el desarrollo (Dueñas et al., 2004).

La consideración de que la PRL sistémica también puede funcionar como fuente de vasoinhibinas intraoculares sugiere como posible que niveles elevados de PRL en la circulación pueden tener un valor pronóstico favorable en las retinopatías vasoproliferativas. La relación entre las hormonas hipofisarias y la retinopatía diabética se exploró hace tiempo a consecuencia de la observación de que la hipofisectomía reviste efectos benéficos sobre la regresión vascular ocular (Wright et al., 1969). Actualmente estos efectos benéficos se atribuyen a la supresión de la hormona de crecimiento que es diabetogénica (Jeffcoate 2002) y puede estimular la neovascularización ocular a través de inducir la expresión del factor angiogénico IGF-1 (Frank 2004). Sin embargo, dado que la PRL también disminuye en los pacientes hipofisectomizados, se ha investigado la posible asociación entre los niveles circulantes de PRL y la retinopatía diabética. Al respecto, estudios iniciales reportaron niveles circulantes de PRL más altos en pacientes diabéticos sin retinopatía severa que en aquellos con retinopatía severa (Hunter et al., 1974, Harter et al., 1976). Cabe también mencionar que al final del embarazo y en el período postparto, cuando los niveles circulantes de PRL se encuentran elevados, ocurre una regresión de la retinopatía diabética (Srivatsa 1994, Sheth 2002), y esta correlación ha llevado a plantear el papel protector de la PRL en este padecimiento. A este respecto, es interesante comentar la observación de que la leche materna protege contra la retinopatía del prematuro (Hylander et al., 2001), y que este efecto pudiera deberse, entre otros factores, a la presencia de PRL en la leche, desde donde puede incorporarse a la circulación de las crías (Grosvenor y Whitworth 1983). La PRL puede tener efectos benéficos sobre la incidencia y progresión de la diabetes, ya que se ha reportado que esta hormona estimula la proliferación,

supervivencia y función de las células  $\beta$  del páncreas (Fujinaka et al., 2007, Weinhaus et al., 2007). Además, la conversión intraocular de PRL a vasoinhibinas favorecería la inhibición de la angiogénesis ocular. A este respecto se ha reportado que la inyección intravitreal de vectores adenovirales capaces de inducir la expresión de vasoinhibinas en la retina inhibe la angiogénesis retiniana en un modelo de isquemia en el ratón (Pan et al., 2004).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México se estima que el 10% de la población padece diabetes y que cerca del 80% de estos pacientes desarrollan retinopatía diabética al cabo de las primeras dos décadas del padecimiento, siendo la retinopatía diabética, la principal causa de ceguera en los adultos mayores. Dado que los tratamientos actuales para el control de la retinopatía diabética como la fotocoagulación con láser y las terapias basadas en el uso de anticuerpos anti-VEGF son aún parcialmente efectivas, la búsqueda de nuevos tratamientos para la retinopatía diabética es una necesidad apremiante.

Las vasoinhibinas se presentan como candidatos promisorios para bloquear la angiogénesis y, muy probablemente, la vasopermeabilidad ocular asociada a la retinopatía diabética. A pesar de que las vasoinhibinas inhiben la activación de la eNOS y la producción del NO endotelial, un importante mediador de la vasopermeabilidad, se desconoce si las vasoinhibinas inhiben la permeabilidad vascular y si este efecto puede antagonizar el aumento en la vasopermeabilidad retiniana asociado con la retinopatía diabética. Además, dada la importancia de la fosforilación de la serina<sup>1179</sup> de la eNOS para su activación, es de interés investigar si el mecanismo de una posible reducción de la vasopermeabilidad en respuesta a vasoinhibinas involucra la activación de la PP2A responsable de desfosforilar a la serina<sup>1179</sup> de la eNOS y por ende de inactivar a la enzima.

Para analizar las posibilidades arriba mencionadas, en este trabajo investigamos si las vasoinhibinas son capaces de inhibir la permeabilidad de células endoteliales en cultivo a través de interferir con la fosforilación/activación de la eNOS. Además, con el fin de evaluar la potencialidad terapéutica de las vasoinhibinas, analizamos el efecto de la administración intravitreal de vasoinhibinas en ratas sobre el aumento en la permeabilidad

de los vasos retinianos inducido mediante la inyección intravítrea de VEGF, de vítreos de pacientes con retinopatía diabética o en el modelo de ratas diabéticas inyectadas con estreptozotocina.

## **HIPÓTESIS**

Las vasoinhibinas inhiben la vasopermeabilidad retiniana asociada a la retinopatía diabética a través de la activación de la PP2A que defosforila/inactiva a la eNOS.

## **OBJETIVOS**

### **A. Sobre células endoteliales en cultivo:**

1. Analizar si las vasoinhibinas inhiben la permeabilidad inducida por el VEGF.
2. Analizar si las vasoinhibinas inhiben el efecto estimulador del VEGF sobre la fosforilación de la serina<sup>1179</sup> de la eNOS y sobre la actividad de esta enzima.
3. Determinar si las vasoinhibinas estimulan la actividad de la PP2A.
4. Determinar si un inhibidor de la PP2A (ácido okadaico) bloquea el efecto inhibitorio de las vasoinhibinas sobre la activación de la eNOS y la permeabilidad vascular inducida por el VEGF.

### **B. Sobre retinas in vivo:**

1. Evaluar si las vasoinhibinas inhiben el aumento en la permeabilidad de los vasos retinianos inducida por la inyección intravítrea de VEGF o de vítreos de pacientes con retinopatía diabética, así como en el modelo de retinopatía diabética de ratas inducido por estreptozotocina.
2. Dilucidar el mecanismo de la inhibición de la vasopermeabilidad retiniana por vasoinhibinas:

- (a) Evaluar si las vasoinhibinas inhiben la fosforilación de la serina<sup>1179</sup> de la eNOS en la retina.
- (b) Determinar si el ácido okadaico bloquea el efecto inhibitorio de las vasoinhibinas sobre la vasopermeabilidad de la retina inducida por la inyección intravitreal de VEGF.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### ***Reactivos***

Las vasoinhibinas de rata (fragmentos de PRL de 16 kDa) utilizada en los experimentos in vivo se generaron por proteólisis enzimática de la PRL de rata (Estándar biológico obtenido del Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis (NHPP) de los Institutos Nacionales de Salud de EUA) con una fracción subcelular de la glándula mamaria de rata seguida por filtración en gel y carbamidometilación de acuerdo al método descrito previamente (Clapp 1987). Las vasoinhibinas recombinantes humanas (fragmentos de PRL de 14 kDa) usadas en los cultivos celulares fueron generadas por mutagénesis dirigida como previamente se describió (Galfione et al., 2003). La dosis de 1  $\mu$ M de vasoinhibinas de rata fue usada in vivo para inhibir el incremento de la vasopermeabilidad en la retina debida a la inyección intravitreal de VEGF o de los vítreos de los pacientes diabéticos. El VEGF recombinante humano fue donado por Genentech (rhVEGF<sub>165</sub>, South San Francisco, CA). La dosis mas baja que mostró un efecto significativo in vitro e in vivo fue de 5 nM y 260 nM respectivamente. El ácido okadaico fue obtenido de Upstate Biotechnologies (Lake Placid, NY) y usado en una dosis de 50 nM como lo recomienda el proveedor; la rapamicina, el L-NAME y la estreptozotocina se obtuvieron de Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Las dosis de rapamicina y L-NAME en los experimentos in vitro fueron usadas como previamente se reportó (Hartley y Cooper 2002, González et al., 2004).

### ***Muestras de pacientes***

La obtención de los vítreos humanos se hizo en colaboración con el Dr. Hugo Quiroz, Jefe del Servicio de Retina en el Hospital “Dr. Luís Sánchez Bulnes” de la

Asociación para Evitar la Ceguera en México (APEC). Los vítreos humanos fueron obtenidos después de la vitrectomía a la que fueron sometidos seis pacientes con retinopatía diabética severa y congelados a -70 °C. Los vítreos de los pacientes controles fueron obtenidos de cinco cadáveres que no tenían diabetes (previo acuerdo con el Servicio Médico Forense (SEMEFO) de la Ciudad de México) y almacenados de la misma forma que los anteriores. Todos los vítreos fueron analizados de manera individual. La tabla 1 (ver anexo) resume las características de los pacientes. El protocolo de recolección de muestras fue previamente autorizado por los pacientes y aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital.

### ***Cultivo celular***

Las células endoteliales de la aorta de bovino (BAEC) fueron crecidas en medio DMEM suplementado con 1% de penicilina-streptomina, 1% de fungizona, 5% de suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY), 5% de suero fetal de becerro (Equitech-Bio Inc, Kerrville, TX) y 10 mM de timidina (Sigma). Las células endoteliales de capilares de la retina de rata (RRCEC) fueron aisladas y cultivadas como previamente se describió (Ochoa et al., 2001). Antes de cada tratamiento las células fueron cultivadas en medio DMEM con 0.5% de suero fetal bovino por 18 h.

### ***Animales***

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar que fueron mantenidas y manipuladas experimentalmente bajo las normas establecidas por la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) de acuerdo al código “Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research”. Las ratas (200-250g) fueron anestesiadas con 70% de ketamina y 30% de xilacina (1 µl/g de peso corporal i.p.) para las posteriores inyecciones intravitreales. La diabetes fue inducida por la inyección de 60 mg/kg de estreptozotocina en



un amortiguador de citratos 10 mM pH 4.5 por 2 semanas como previamente se reportó (Navaratna et al., 2007). Se usaron animales con niveles de glucosa >250 mg/dl después de 48 h de haber sido inyectados con estreptozotocina. La glucosa se determinó en una gota de sangre total extraída de la cola de la rata y con el uso de un estuche comercial (Accu-Chek Active Roche).

### ***Inyecciones intravitreales***

Las inyecciones intravitreales se hicieron en la rata siguiendo el procedimiento previamente descrito (Aranda et al., 2005). Uno de los ojos fue inyectado con VEGF (300 ng que corresponde a una concentración estimada de 260 nM ya que el volumen del vítreo de la rata es de aproximadamente 60  $\mu$ l (Guo et al., 2007) y el ojo contralateral fue inyectado con la combinación de VEGF (260 nM) y vasoinhibinas (1  $\mu$ g que corresponde a 1  $\mu$ M en el vítreo). En los grupos control se inyectó un ojo con amortiguador de fosfatos (PBS) y el ojo contralateral con vasoinhibinas (1  $\mu$ M). Los vítreos de pacientes con retinopatía diabética o de cadáveres no diabéticos (2  $\mu$ l) se inyectaron en uno de los ojos de ratas, mientras que en el ojo contralateral se inyectó la misma muestra humana en combinación con vasoinhibinas (1  $\mu$ M). Dos semanas después de la hiperglicemia, las ratas diabéticas fueron inyectadas intravitrealmente con PBS en uno de los ojos y en el ojo cotralateral con vasoinhibinas (1  $\mu$ M) (Navaratna et al., 2007). En todos los casos el volumen final de la inyección intravitreal fue ajustado a 4  $\mu$ l.

### ***Ensayo de permeabilidad in vitro***

El ensayo de permeabilidad fue realizado utilizando filtros de policarbonato (8.0  $\mu$ m de tamaño de poro y de 24 pozos por caja) (Corning Co., Washington, DC) de acuerdo al método previamente descrito (Wang et al., 2002). La peroxidasa de rábano tipo VI-A (peso molecular de 44 kDa de Sigma) se empleó como estándar y como marcador para medir la

permeabilidad a través de la monocapa de células endoteliales en cultivo. La peroxidasa de rábano (0.5 µg/ml) se adicionó al compartimento superior del filtro y después de 48 h de incubar las monocapas de BAEC o RRCEC en los filtros a 37°C, se colectaron 30 µl del medio de cultivo del compartimento inferior y se mezclaron con 860 µl del amortiguador de reacción (50 mM de fosfato de sodio monobásico y 5 mM de guaiacol). La presencia de la peroxidasa de rábano se reveló mediante la adición de 100 µl de peróxido de hidrógeno (25 mM) y la subsecuente incubación por 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de ELISA (Microplate Reader Benchmark Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

#### ***Ensayo de azul de Evans para medir la permeabilidad in vivo***

Un día después de la inyección intravitreal, se realizó el ensayo de azul de Evans de acuerdo al método reportado (Xu et al., 2001). Brevemente, este ensayo cuantitativo se basa en la unión irreversible del colorante azul de Evans a la albúmina plasmática. El aumento en la vasopermeabilidad eleva la difusión de proteínas séricas a través de las uniones estrechas del endotelio, permitiendo así la salida del complejo azul de Evans-albúmina y su difusión tisular. El azul de Evans fue aplicado en la vena yugular de ratas anestesiadas inyectadas intravitalmente o no y al cabo de 90 min, los animales se sacrificaron por inhalación de monóxido de carbono y se perfundieron con PBS a un pH de 3.5. Las retinas fueron extraídas, secadas mediante su exposición al vacío por 5 h (SPD 1010 SpeedVac System, ThermoSavant, EUA) y su peso seco determinado. Posteriormente, las retinas se disolvieron en formamida por 18 h a 70°C y se centrifugaron a 70,000 rpm por 1 h. Se recuperaron los sobrenadantes, donde se determinó la concentración de azul de Evans extravasado en la retina por espectrofotometría a 620 nm (NanoDrop® ND-1000 V3.5.2 Spectrophotometer).

### ***Cuantificación de VEGF por ELISA***

Los niveles de VEGF en los vítreos humanos se determinaron mediante ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Biosource, Camarillo, CA). El ELISA tiene una sensibilidad de 5 pg/ml. El VEGF se determinó antes y después de su inmunoprecipitación mediante la incubación de 100 µl de vítreo humano con 1 µl de anticuerpos anti-VEGF (AF564, R&D SYSTEMS, Minneapolis, MN) por toda la noche, adición de 10 µl de proteína G agarosa (Invitrogen, Carlsbad, CA) por 1 h y centrifugación (16,000 x g por 10 min a 4°C). Los sobrenadantes fueron colectados y evaluados por el ELISA.

### ***Western-blot***

Después de 18 h de privación de suero, las BAEC fueron tratadas con ácido okadaico (50 nM) por 10 min, vasoinhibinas (20 nM) por 1 h o VEGF (5 nM) por 1, 5 o 10 min como se indica en los pies de figura. Los extractos de células endoteliales fueron procesados por SDS-PAGE y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpos policlonales anti-eNOS fosforilado en la serina<sup>1179</sup> (9571, 1:1000, Cell Signalling, Beverly, MA) por toda la noche y el complejo antígeno-anticuerpo se detectó mediante el uso de anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (111-035-003, Jackson ImmunoResearch Laboratorios Inc., West Grove, PA) revelados por quimioluminiscencia (ELC, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Adicionalmente, las membranas fueron re-bloteadas con anticuerpos monoclonales anti-eNOS (1:1000, 33-4500, Zimed, San Francisco, CA) y el complejo antígeno-anticuerpo revelado mediante la reacción de la fosfatasa alcalina con un estuche comercial de anticuerpos secundarios (Bio-

Rad Laboratories, Hercules, CA). Los valores de densidad óptica se determinaron usando el procesador de imágenes v3.5 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY).

### ***Ensayo de la citrulina***

La actividad de la eNOS se midió en las BAEC y las RRCEC como previamente se reportó (González et al., 2004), utilizando columnas de 1 ml empacadas con Dowex AG50WX8 de donde la [<sup>3</sup>H]-L-citrulina es eluída con 1 ml de Hepes pH 5.5 y cuantificada por medio de un contador de centelleo (LS 6500, Beckman Instruments).

### ***Ensayo de fosfatasa de proteínas 2A***

La valoración de la fosfatasa de proteínas 2A (PP2A) fue llevada a cabo mediante un estuche comercial que evalúa la liberación de fosfato de un sustrato selectivo de la enzima (V2460, Promega, Madison, WI). Con este propósito, las células endoteliales tratadas o no con vasoinhibinas fueron lisadas en un amortiguador para la PP2A (25 mM Tris-HCl a pH 7.5, 10 mM β-mercaptoetanol, 2 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1mM pepstatina A y 10 µg/ml aprotinina). El fosfato endógeno es removido usando una columna de sephadex G-25 y los lisados son incubados con un fosfopéptido de Ser/Thr en el amortiguador para PP2A a 30°C por 15 min. La actividad de la PP2A se reporta como fosfato liberado y es calculado por la absorbancia de un molibdato acoplado a verde malaquita y unido al fosfato liberado a 595 nm e interpolados en una curva estándar elaborada con fosfato.

### ***Análisis estadístico***

Los datos se presentan como promedios ± error estándar de la media. La significancia estadística se determinó por el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de T de Student no pareada. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el

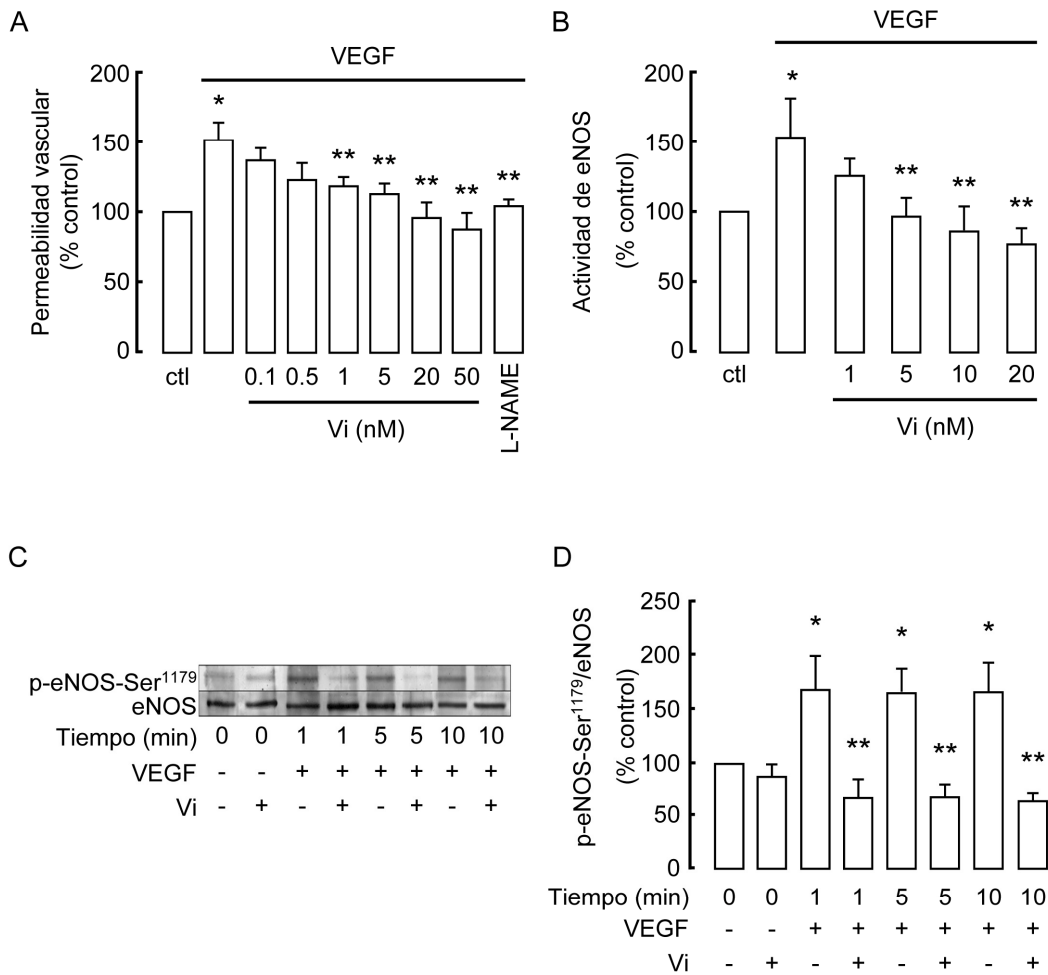
programa Sigma Stat 7.0 (Sigma Stat 7.0, Systat Software Inc., San José, CA). Valores de  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

### *Las vasoinhibinas inhiben la permeabilidad endotelial inducida por el VEGF y promueven la desfosforilación de la eNOS en la serina<sup>1179</sup>*

Iniciamos este estudio a través de determinar el efecto de las vasoinhibinas sobre la permeabilidad inducida por el VEGF (5 nM) en monocapas de BAEC cultivadas en un filtro de policarbonato por 48 h con VEGF en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de vasoinhibinas. Como se muestra en la **Figura 1A** el VEGF incrementó en un 50% la permeabilidad endotelial y las vasoinhibinas bloquearon dicho efecto de manera dependiente de la dosis. Dado que el NO es uno de los mediadores de la vasopermeabilidad inducida por el VEGF (Tilton et al., 1999, Fukumura et al., 2001) incubamos las BAEC en presencia de 1 mM de N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), un inhibidor general de las sintetasas de NO (Papapetropoulos et al., 1997). El L-NAME inhibió la permeabilidad de manera similar a las vasoinhibinas, por lo que nos abocamos a determinar el efecto inhibitorio de las vasoinhibinas sobre la producción de NO endotelial, encontrando que las vasoinhibinas inhiben la producción de NO inducida por VEGF de manera dependiente de la dosis (**Figura 1B**). El siguiente paso fue analizar el mecanismo por el cual las vasoinhibinas bloquean la actividad de la eNOS. Dado que la estimulación de eNOS por VEGF ocurre vía la activación de la fosfoinosítido 3 cinasa/treonin cinasa A (PI3K/Akt) que fosforila a la eNOS en el residuo de serina<sup>1179</sup> de la secuencia bovina y la serina<sup>1177</sup> de la secuencia humana (Six et al., 2002, Boo y Jo 2003) determinamos el efecto del VEGF sobre la fosforilación de la eNOS en la serina<sup>1179</sup>. Con este propósito, cultivos de BAEC fueron incubados por diferentes tiempos con VEGF (5 nM) en ausencia o presencia de un pre-tratamiento de 1 h y co-incubación con

vasoinhibinas (20 nM). Los lisados celulares fueron procesados por Western blot utilizando un anticuerpo dirigido contra la eNOS fosforilada en la serina<sup>1179</sup> (anti-p-eNOS-Ser<sup>1179</sup>) seguido de su re-evaluación con un anticuerpo anti-eNOS total. Como se muestra en la **Figura 1C**, encontramos que el tratamiento con VEGF estimula la fosforilación de la eNOS a los tres tiempos empleados (1, 5 y 10 min), y que el pre-tratamiento por 1 h con vasoinhibinas (20 nM) bloquea dicha fosforilación. La significancia estadística de estos efectos se demostró cuando se promediaron los valores densitométricos de las bandas correspondientes a la eNOS fosforilada corregidos por los de la proteína total provenientes de tres experimentos independientes (**Figura 1D**). Asimismo, resultó evidente que las vasoinhibinas no modificaron el nivel basal de fosforilación de la eNOS y que la fosforilación de la eNOS se mantiene elevada desde el primer minuto de tratamiento con VEGF y permanece así durante los siguientes 5 y 10 minutos.

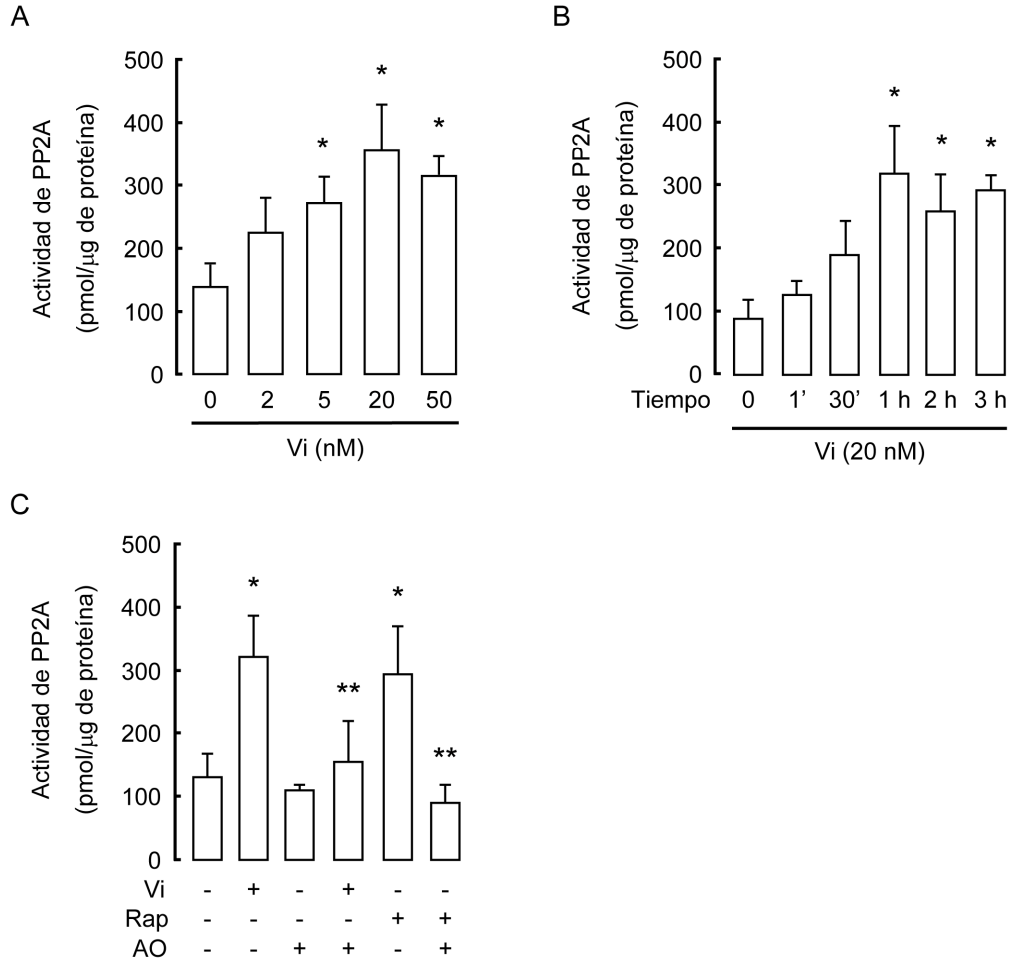


**Figura 1.** (A) La vasopermeabilidad fue evaluada por el paso de la peroxidasa de rábano en monocapas de BAEC no tratadas (ctl) o tratadas con 5 nM de VEGF en ausencia o presencia de 0.1, 0.5, 1, 5, 20 o 50 nM de vasoinhibinas (Vi) por 48 h. Las BAEC fueron incubadas con VEGF en combinación con L-NAME. Los valores muestran los promedios  $\pm$  error estándar de 5 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$  versus ctl y \*\*  $P < 0.05$  versus VEGF. (B) La actividad de la eNOS fue determinada usando el ensayo de la citrulina tritiada en las BAEC incubadas o no con 5 nM de VEGF solo o en combinación con concentraciones crecientes de Vi por 1 h. Los valores muestran los promedios  $\pm$  error estándar de 5 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$  versus ctl y \*\*  $P < 0.05$  versus VEGF. (C) Análisis de la fosforilación de la eNOS (Ser<sup>1179</sup>) mediante Western-blot en las BAEC pre-incubadas o no con 20 nM de Vi y después tratadas con 5 nM de VEGF por 1, 5 y 10 min. La densidad óptica de la eNOS total sirve como control de carga en el gel. (D) Cuantificación de la fosforilación de la eNOS por el análisis densitométrico, después de normalizar los valores por los de la eNOS total. Los valores son promedios  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$  versus ctl y \*\*  $P < 0.05$  versus VEGF.



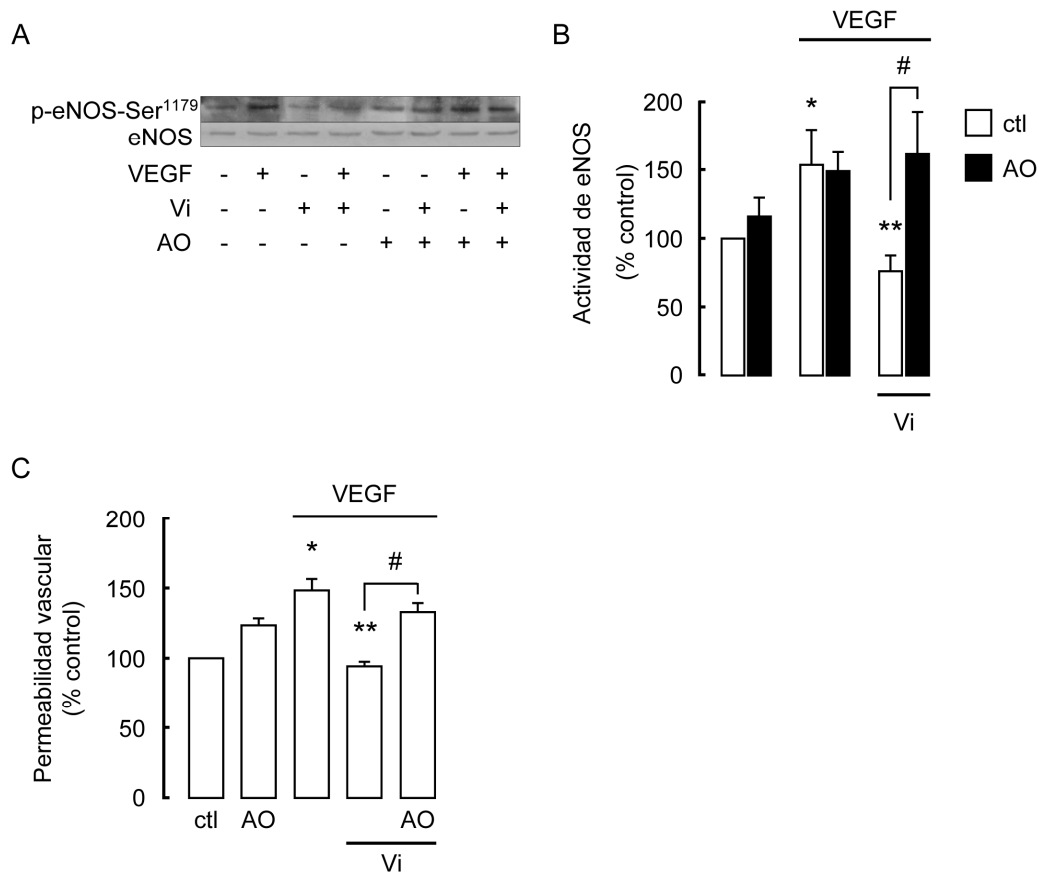
***Las vasoinhibinas inhiben la permeabilidad endotelial inducida por el VEGF vía la activación de la PP2A y la consecuente desfosforilación de la eNOS***

La siguiente aproximación para dilucidar el mecanismo por el cual las vasoinhibinas inhiben la vasopermeabilidad inducida por VEGF y dependiente de NO, fue analizar el efecto de las vasoinhibinas sobre la fosfatasa de proteínas 2A (PP2A), enzima que desfosforila a la eNOS en la serina<sup>1179</sup> (Michell et al., 2001, Greif et al., 2002) y que interfiere con la activación de la eNOS por VEGF (Mineo et al., 2005). Por tanto, investigamos si la activación de la PP2A podría mediar los efectos inhibitorios de las vasoinhibinas sobre la fosforilación/activación de la eNOS. Como se puede apreciar en la **Figura 2A y B**, el tratamiento de las BAEC con vasoinhibinas incrementó la actividad de la PP2A de forma dependiente de la dosis y del tiempo. La actividad de la PP2A fue evaluada utilizando un estuche comercial (Promega, Madison WI) que mide la cantidad de fosfato liberado de un péptido sintético sustrato de la enzima (RRA(pT)VA) cuantificado mediante su unión a un molibdato y a verde malaquita. El efecto máximo se observó después de 1 h de tratamiento y se mantuvo elevado hasta las 3 h con una dosis de 20 nM de vasoinhibinas. De esta manera el tiempo de 1 h y la dosis de 20 nM fueron los que se usaron en los experimentos subsecuentes. Posteriormente, encontramos que el incremento en la actividad de la PP2A por las vasoinhibinas se bloqueó mediante la adición a los cultivos de ácido okadaico (AO, 50 nM), un inhibidor selectivo de la PP2A (Boudreau y Hoskin 2005) (**Figura 2C**). Además, el efecto de las vasoinhibinas fue similar al de la rapamicina (Rap, 20 nM), un conocido activador de la PP2A (Hartley y Cooper 2002) y el AO también inhibió la activación de la PP2A por la rapamicina (**Figura 2C**). Por lo tanto, estos resultados sugieren fuertemente que las vasoinhibinas activan a la PP2A en las células endoteliales.



**Figura 2.** (A) La actividad de la PP2A fue evaluada en las BAEC después del tratamiento con dosis crecientes de vasoinhibinas (Vi) por 1 h (B) y después de la incubación con 20 nM de Vi por 1 o 30 min, 1, 2 y 3 h. (C) La actividad de la PP2A fue medida en las BAEC después de 1 h de incubación en presencia o ausencia de 20 nM de Vi, 50 nM de ácido okadaico (AO), la combinación de Vi y AO, 20 nM de rapamicina (Rap), o la combinación de Rap y AO. Los datos corresponden al promedio  $\pm$  error estándar de 4 experimentos independientes.\*  $P < 0.05$  versus ctl y \*\*  $P < 0.05$  versus Vi o Rap sola.

En apoyo a que la inhibición de la fosforilación de la eNOS es mediada por la activación de la PP2A, encontramos que el efecto inhibitorio de las vasoinhibinas sobre la fosforilación de la eNOS fue bloqueado por el AO, lo que sugiere la activación de la PP2A por las vasoinhibinas (**Figura 3A**). Así, utilizando el ensayo de la citrulina tritiada mostramos que las vasoinhibinas inhiben la actividad de la eNOS inducida por el VEGF y que este efecto es bloqueado con el AO, mientras que el AO por sí solo no tuvo efecto alguno sobre la actividad basal de la eNOS o sobre la actividad de la eNOS estimulada por el VEGF (**Figura 3B**). Finalmente, evaluamos si la inactivación de la PP2A con el AO podría inhibir el efecto de las vasoinhibinas sobre la permeabilidad endotelial. Encontramos que el tratamiento de las células BAEC con AO bloquea el efecto inhibitorio de las vasoinhibinas sobre la vasopermeabilidad inducida por el VEGF (**Figura 3C**), mientras que el AO por sí mismo no incrementa la vasopermeabilidad basal (**Figura 3C**). De acuerdo a todos estos resultados concluimos que las vasoinhibinas bloquean la vasopermeabilidad inducida por el VEGF a través de activar a la PP2A con la consecuente desfosforilación/inactivación de la eNOS.



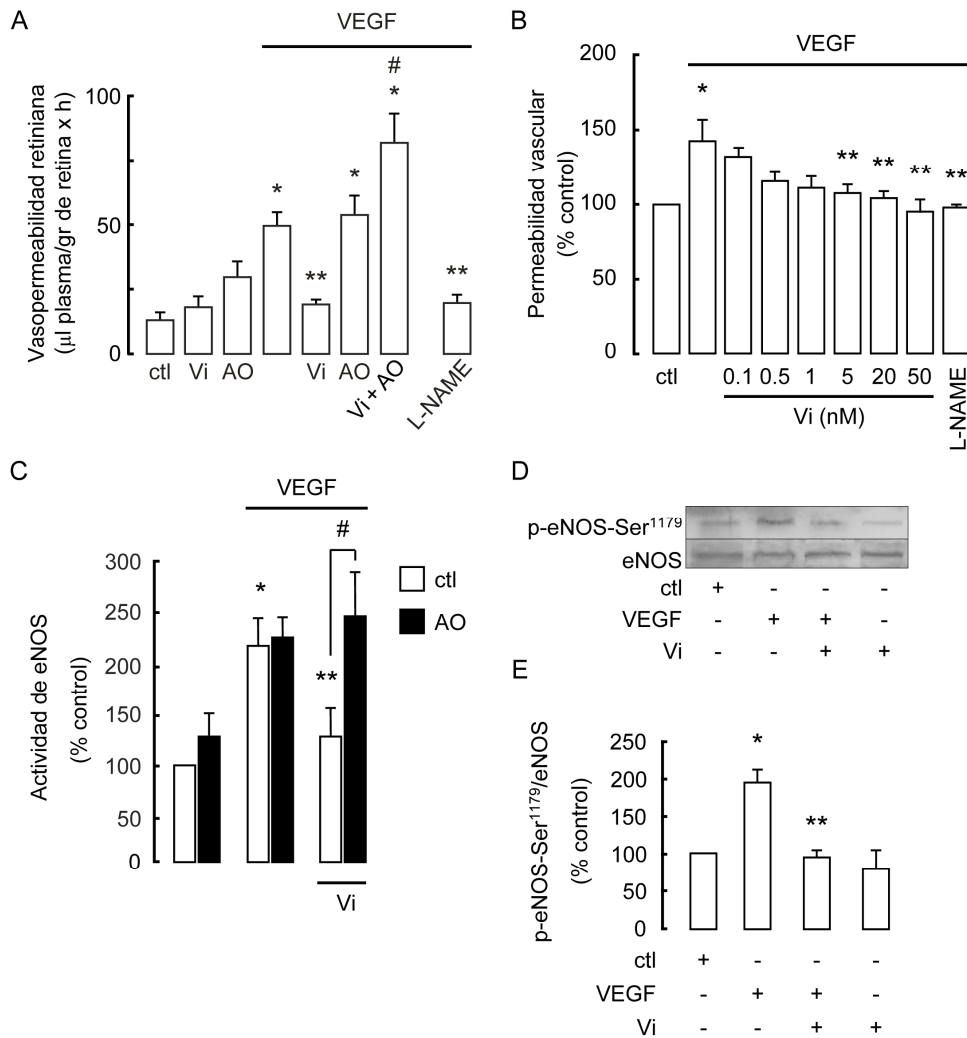
**Figura 3. (A)** Análisis por Western-blot de la fosforilación de la eNOS (Ser<sup>1179</sup>) en las BAEC preincubadas o no con 50 nM de ácido okadaico (AO) por 10 min y después tratadas o no con 20 nM de vasoinhibinas (Vi) por 1 h seguidas o no por el tratamiento con 5 nM de VEGF por 5 min como se indica. La eNOS total sirve como control de carga en el gel. **(B)** La actividad de la eNOS fue determinada usando el ensayo de la citrulina tritiada en las BAEC incubadas o no con 5 nM de VEGF solo o en combinación con 20 nM de Vi en ausencia o presencia de 50 nM de AO por 1 h. Los valores muestran los promedios  $\pm$  error estándar de 5 experimentos independientes.\*  $P < 0.05$  versus ctl y \*\*  $P < 0.05$  versus VEGF y #  $P < 0.05$  versus VEGF y Vi. **(C)** La vasopermeabilidad fue evaluada por el paso de la peroxidasa de rábano en monocapas de BAEC no tratadas (ctl) o tratadas por 48 h con 50 nM de AO, 5 nM de VEGF, o la combinación de VEGF y 20 nM de Vi, o VEGF o Vi y AO. Los valores muestran los promedios  $\pm$  error estándar de 3 experimentos independientes.\*  $P < 0.05$  versus ctl, \*\*  $P < 0.05$  versus VEGF y #  $P < 0.05$  versus VEGF y Vi.

***La desfosforilación de las NOS por vasoinhibinas previene la vasopermeabilidad inducida por el VEGF en la retina***

Para corroborar la relevancia fisiológica de los resultados anteriores, llevamos a cabo experimentos in vivo, inyectando intravitrealmente 300 ng de VEGF (lo que corresponde a una dosis de 260 nM), en ratas adultas de la cepa Wistar. Los cambios en la vasopermeabilidad retiniana fueron evaluados usando el método del azul de Evans. El VEGF inyectado de manera intravitreal indujo un incremento en la vasopermeabilidad que fue 4 veces mayor de la observada por la inyección intravitreal del vehículo (PBS), y dicha elevación fue bloqueada por la co-inyección de vasoinhibinas (**Figura 4A**), que por sí mismas no modificaron la vasopermeabilidad de la retina (**Figura 4A**). La contribución de las NOS en la vasopermeabilidad de la retina inducida por el VEGF se puso de manifiesto mediante la administración durante 15 días de L-NAME (1.8 mM) en el agua de beber de las ratas, lo que revirtió la acción del VEGF, mimetizando el efecto de las vasoinhibinas (**Figura 4A**). Además, la inyección intravitreal del AO (2  $\mu$ M) previno el efecto inhibitor de las vasoinhibinas sobre el efecto del VEGF e incluso aumentó el efecto que por sí solo mostró el VEGF (**Figura 4A**). La inyección del AO por sí solo o en combinación con el VEGF no tuvo un efecto significativo en comparación con el control o con el VEGF solo. Para analizar si la inhibición de las NOS por vasoinhibinas puede ocurrir en las células endoteliales de la retina, la actividad de la eNOS se determinó en las células endoteliales de capilares de la retina de rata (RRCEC). Una dosis de 5 nM de VEGF incrementó en un 35% la permeabilidad vascular después de 48 h de tratamiento (**Figura 4B**), y este efecto fue bloqueado por la co-administración de L-NAME (1 mM) o por la administración de vasoinhibinas en forma dependiente de la dosis (**Figura 4B**), mientras que el AO (50 nM) no modificó la actividad basal de la eNOS o la inducida por el VEGF (**Figura 4C**). Como

se muestra en la **Figura 4D**, la inyección intravitreal del VEGF incrementó la fosforilación de la eNOS en la serina<sup>1179</sup> en las retinas, mientras que las vasoinhibinas inhibieron este efecto. La **Figura 4E** muestra la cuantificación de la eNOS fosforilada después de normalizar la medición tomando en cuenta la cantidad total de la eNOS en cada muestra.

Todo estos resultados muestran que las vasoinhibinas inhiben la vasopermeabilidad de la retina in vivo por un mecanismo que involucra la activación de la PP2A, la cual desfosforila/inactiva a la eNOS.



**Figura 4.** (A) La vasopermeabilidad de la retina fue determinada usando el ensayo de azul de Evans en los extractos de las retinas de ratas que fueron inyectadas por 24 h con PBS (ctl), 1 µM de vasoinhibinas (Vi), 2 µM de ácido okadaico (AO), 260 nM de VEGF, VEGF y Vi, VEGF y AO o VEGF, Vi y AO solos como se indica en la figura, mientras que el L-NAME (1.8 mM) fue administrado en el agua de beber de las ratas por 15 días. Los valores muestran los promedios ± error estándar de 10 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$  versus ctl, \*\*  $P < 0.05$  versus VEGF y #  $P < 0.05$  versus VEGF y Vi. Las concentraciones del VEGF y las Vi se refieren a las concentraciones finales en los vítreos. (B) La vasopermeabilidad fue evaluada por el paso de la peroxidasa de rábano en monocapas de RRCEC no tratadas (ctl) o tratadas con 5 nM de VEGF o VEGF en combinación con 1 mM de L-NAME o en presencia de 0.1, 0.5, 1, 5, 20 o 50 nM de vasoinhibinas por 48 h. Los valores muestran los promedios ± error estándar de 6 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$  versus ctl y \*\*  $P < 0.05$  versus VEGF. (C) La actividad de la eNOS fue determinada usando el ensayo de la citrulina tritiada en las RRCEC incubadas o no con 5 nM de VEGF solo o en combinación con 20 nM de Vi en ausencia o presencia de 50 nM de AO por 1 h. Los valores muestran los promedios ± error estándar de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$  versus ctl, \*\*  $P < 0.05$  versus VEGF y #  $P < 0.05$  versus VEGF y Vi. (D) Análisis de la fosforilación de la eNOS (Ser<sup>1179</sup>) mediante Western-blot en las retinas de las ratas después de 3 h de la inyección con PBS (ctl), VEGF (260 nM), VEGF más Vi (1 µM) o Vi solas. La eNOS total sirve como control de carga en el gel. (E) Cuantificación de la fosforilación de la eNOS por el análisis densitométrico, después de normalizar los valores por los de la eNOS total. Los valores son promedios ± error estándar de 3 experimentos independientes. \*  $P < 0.05$  versus ctl y \*\*  $P < 0.05$  versus VEGF.

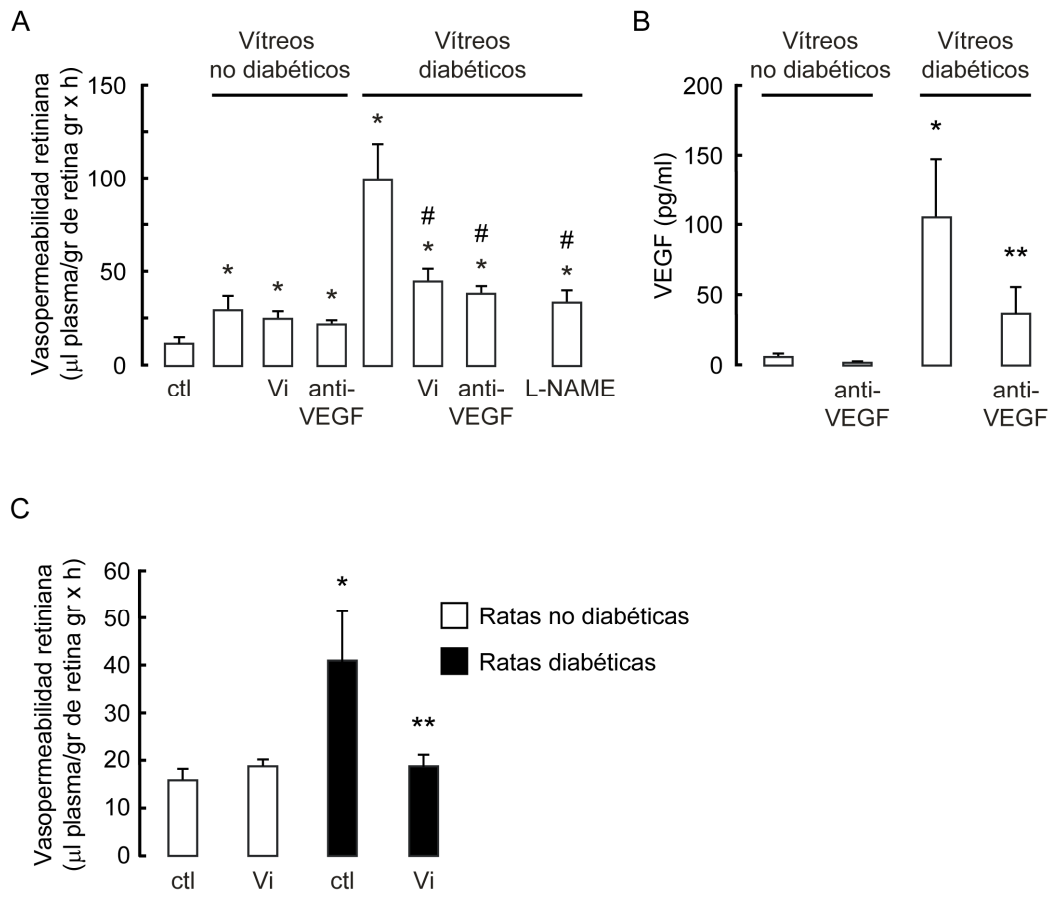
### ***Las vasoinhibinas bloquean la vasopermeabilidad de la retina asociada a la diabetes***

Utilizando el ensayo de azul de Evans analizamos el efecto de las vasoinhibinas sobre la permeabilidad de la retina que ocurre asociada a la retinopatía diabética. Mostramos que la inyección de extractos de vítreos humanos de pacientes con retinopatía diabética incrementó 8 veces la vasopermeabilidad. Este incremento fue significativamente mayor (2 veces) al observado después de la inyección de extractos de vítreos de humanos no diabéticos (**Figura 5A**). De manera importante, la co-inyección con vasoinhibinas redujo el efecto de los extractos de vítreos de los pacientes con retinopatía diabética a niveles comparables a los inyectados con los extractos de vítreos de humanos no diabéticos (**Figura 5A**). El efecto de las vasoinhibinas sobre la vasopermeabilidad de la retina inducida por los vítreos de pacientes diabéticos fue similar al obtenido después de inmunoprecipitar el VEGF de los vítreos provenientes de los mismos pacientes (**Figura 5A**). La cuantificación del VEGF por el ELISA mostró una disminución del VEGF del 60% en los vítreos humanos de pacientes diabéticos o no diabéticos después de la inmunoprecipitación (**Figura 5B**). Además, cuando el L-NAME fue administrado en el agua de beber de las ratas por 15 días, el efecto de los vítreos de pacientes diabéticos se redujo significativamente a niveles comparables a aquellos obtenidos después de la co-inyección con vasoinhibinas (**Figura 5A**).

Finalmente la vasopermeabilidad retiniana se determinó en las retinas de ratas después de 2 semanas de inducir diabetes con estreptozotocina (60 mg/kg) y de su inyección intravítrea con vasoinhibinas 48 h antes de la valoración de la vasopermeabilidad. Como se muestra en la **Figura 5C**, la vasopermeabilidad disminuyó significativamente en las retinas de las ratas diabéticas inyectadas con vasoinhibinas en comparación con las inyectadas con el PBS (control).



En su conjunto, estos resultados sugieren que el VEGF juega un papel muy importante en la vasopermeabilidad de la retina inducida por los vítreos humanos procedentes de pacientes diabéticos y que las vasoinhibinas bloquean la vasopermeabilidad de la retina asociada con la diabetes, interfiriendo con la producción de NO inducida por el VEGF.



**Figura 5.** (A) Evaluación de la vasopermeabilidad mediante el ensayo de azul de Evans en las retinas de las ratas que fueron inyectadas con PBS (ctl, n=5), vítreos de pacientes no diabéticos (2 µl, n=5), vítreos de pacientes no diabéticos más Vi (1 µM, n=5), vítreos de pacientes no diabéticos inmunoprecipitados de VEGF (anti-VEGF, 2 µl, n=3), vítreos de pacientes diabéticos, vítreos de pacientes diabéticos más Vi (1 µM, n=5), vítreos de pacientes diabéticos inmunoprecipitados de VEGF (anti-VEGF, 2 µl, n=3). Los mismos vítreos inmunoprecipitados para VEGF fueron usados en (A y B). El L-NAME fue administrado en el agua de beber por 15 días y las retinas fueron igualmente procesadas para analizar la vasopermeabilidad por el ensayo de azul de Evans. Los valores muestran los promedios ± error estándar de las diferentes n de experimentos independientes.\*  $P < 0.05$  versus ctl y #  $P < 0.05$  versus los vítreos diabéticos. (B) Análisis de la concentración de VEGF (pg/ml) por ELISA en los vítreos de pacientes no diabéticos, no diabéticos inmunoprecipitados de VEGF (anti-VEGF), vítreos de pacientes diabéticos y de diabéticos inmunoprecipitados de VEGF (anti-VEGF). El contenido de VEGF de los vítreos fue removido por inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-VEGF. Los valores muestran los promedios ± error estándar de 3 diferentes vítreos.\*  $P < 0.05$  versus vítreos no diabéticos y \*\*  $P < 0.05$  versus vítreos diabéticos. (C) Análisis de la vasopermeabilidad con el ensayo de azul de Evans en extractos de retinas de ratas no diabéticas y diabéticas (inducida por estreptozotocina), inyectadas con PBS (ctl) o con vasoinhibinas (Vi) (1 µM). Los valores muestran los promedios ± error estándar de 6 diferentes extractos de retinas.\*  $P < 0.05$  versus las ratas no diabéticas inyectadas con PBS y \*\*  $P < 0.05$  versus ratas diabéticas inyectadas con PBS. La concentración de Vi se refieren a las concentraciones finales en los vítreos.

## DISCUSIÓN

Varios de los signos de la retinopatía diabética son aparentes mucho tiempo antes de que se presente la pérdida de la visión. Éstos incluyen microaneurismas, dilatación de los vasos sanguíneos y hemorragias en la retina. Este estado refleja una alta vasopermeabilidad retiniana que se traduce en la extravasación de proteínas y fluidos, que al depositarse, resultan en el engrosamiento de la retina y en la formación de exudados capaces de interferir con la visión cuando ocurren en la mácula (Knudsen et al., 2002, Williams et al., 2004). Por ende, los inhibidores de la vasopermeabilidad retiniana tienen un importante potencial terapéutico para el control del edema macular diabético y de la retinopatía diabética en general. En este estudio se muestra por primera vez que las vaso inhibinas previenen el incremento en la vasopermeabilidad de la retina asociado con la retinopatía diabética y que este efecto involucra la inhibición de la activación de la eNOS en respuesta al VEGF como resultado de que las vaso inhibinas activan a la PP2A y consecuentemente ocasionan la desfosforilación/inactivación de la eNOS. De acuerdo a estos resultados proponemos que las vaso inhibinas pueden tener relevancia terapéutica para el control del edema macular diabético, de la retinopatía diabética y de otras retinopatías vasoproliferativas.

### ***Vasopermeabilidad retiniana: VEGF y vaso inhibinas.***

El VEGF es uno de los factores responsables de la elevada vasopermeabilidad de la retina que se observa en la diabetes. La extravasación sanguínea está asociada con una regulación a la alta del VEGF en los fluidos oculares de pacientes con retinopatía diabética (Aiello et al., 1994, Simó et al., 2002, Funatsu et al., 2006). Los tratamientos con anticuerpos anti-VEGF reducen la vasopermeabilidad retiniana en modelos experimentales (Qaum et al., 2001) y han comenzado a emplearse como terapias efectivas para el

tratamiento del edema macular diabético (Arevalo et al., 2007, Emerson y Lauer 2007). En este sentido, el presente trabajo muestra una nueva acción de las vasoinhibinas que las coloca como importantes inhibidores de la vasopermeabilidad retiniana inducida por el VEGF así como de la asociada con la diabetes. Demostramos que la inyección intravítrea de vasoinhibinas previene la excesiva vasopermeabilidad de la retina en el modelo de diabetes inducido por la inyección de estreptozotocina, en el cual el VEGF juega un papel importante como promotor de la vasopermeabilidad (Amrite et al., 2006). Además, las vasoinhibinas bloquean el incremento en la vasopermeabilidad retiniana inducida por la inyección intravítrea de VEGF. Sin embargo, las concentraciones efectivas del VEGF que se observaron en este (260 nM) y otros estudios (30 nM) (Ojima et al., 2006) para incrementar la vasopermeabilidad, son mayores a las que se han detectado en los vítreos de pacientes diabéticos (5.8 pM) o en las ratas diabéticas a las que se les ha inducido la diabetes con estreptozotocina (225 pM) (Amrite et al., 2006). Es posible que la vía de administración intravítrea pudiera limitar el acceso y distribución del VEGF en la retina y que eso explique la discrepancia de las concentraciones. Además, se sabe que la composición proteica del vítreo se altera con la diabetes (Gao et al., 2007) y por ende, que alteraciones en la concentración de factores o co-factores capaces de regular la vasopermeabilidad pudieran potenciar el efecto del VEGF endógeno y de esta manera permitir que pueda ser activo a concentraciones mucho menores. De cualquier manera, también mostramos que las vasoinhibinas revierten el efecto de los vítreos de pacientes con retinopatía diabética reduciendo los niveles de vasopermeabilidad a aquellos comparables a los que se observan después de inmunoprecipitar el VEGF de los vítreos humanos de los pacientes diabéticos. Estos datos indican que las vasoinhibinas protegen contra la vasopermeabilidad de la retina asociada con la diabetes contrarrestando los efectos del

VEGF endógeno. De manera consistente con esta interpretación encontramos un efecto pequeño pero significativo de los vítreos de los humanos no diabéticos sobre la vasopermeabilidad retiniana que es independiente del VEGF, y que no es afectado por las vasoinhibinas. Estos datos sugieren la participación de otros factores, como por ejemplo de la anhidrasa carbónica (Gao et al., 2007), que también puede contribuir a la vasopermeabilidad retiniana de manera basal. Dado que los vítreos controles fueron obtenidos de cadáveres, la regulación a la alza de estos factores puede ocurrir después de la muerte, si bien esos posibles cambios post-mortem no parecen afectar los niveles del VEGF.

La observación de que las vasoinhibinas bloquean la vasopermeabilidad en respuesta al VEGF es novedosa y potencialmente importante, dado que se ha demostrado previamente que las vasoinhibinas inhiben los efectos del factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y del VEGF, así como los efectos de la interleucina 1- $\beta$  sobre la migración (Lee et al., 1998, Lee et al., 2007) y la proliferación de las células endoteliales (Clapp et al., 1993), además de promover su apoptosis (Martini et al., 2000). Los resultados actuales amplían el espectro de efectos de las vasoinhibinas sobre la inhibición de la permeabilidad vascular que acompaña a casi todas las etapas de la angiogénesis (Bates et al., 2002), incluyendo aquellas enfermedades donde la angiogénesis juega un papel preponderante, como la retinopatía diabética. El papel de las vasoinhibinas como reguladores pato-fisiológicos de la vasculatura retiniana es reforzado por la presencia de estos péptidos en la retina normal (Aranda et al., 2005), en el líquido subretineano y en las membranas fibrovasculares de pacientes con retinopatía del prematuro (Dueñas et al., 2004). El bloqueo de las vasoinhibinas por la inyección intravitreal de pequeños ARNs de interferencia o de anticuerpos que neutralizan a las vasoinhibinas, estimula el crecimiento y

la dilatación de los vasos de la retina (Aranda et al., 2005), además de inhibir la apoptosis que media la regresión de los vasos sanguíneos intraoculares durante el desarrollo (Dueñas et al., 2004). De manera importante la transferencia génica de las vasoinhibinas vía la utilización de un vector adenoviral reduce la angiogénesis en un modelo de retinopatía inducido por isquemia (Pan et al., 2004). Estas observaciones indican que las vasoinhibinas son inhibidores endógenos de la angiogénesis así como potentes factores inhibidores de la vasopermeabilidad en la retina. Por todo lo anterior, las vasoinhibinas podrían ser usadas para disminuir los múltiples síntomas presentes en la retinopatía diabética. En este sentido, se ha observado que la PRL se incrementa en la circulación y en los fluidos oculares de pacientes con retinopatía del prematuro avanzada, incremento que podría resultar en niveles altos de vasoinhibinas intraoculares capaces de contrarrestar la progresión de la enfermedad (Dueñas et al., 2004).

#### ***Mecanismo de acción de las vasoinhibinas.***

Las acciones de las vasoinhibinas que aquí se describen son consistentes con su efecto sobre la inhibición de la síntesis del NO (González et al., 2004), que es uno de los mediadores por los cuales el VEGF induce angiogénesis, vasodilatación y vasopermeabilidad (Tilton et al., 1999, Ziche y Morbidelli 2000, Fukumura et al., 2001). Se muestra que el L-NAME, un inhibidor de las NOS, mimetiza el efecto de las vasoinhibinas sobre la vasopermeabilidad inducida por el VEGF tanto in vitro como in vivo. Además, el L-NAME previene la elevada vasopermeabilidad retiniana que ocurre en la rata en respuesta a la inyección intravitreal de los extractos de vítreos de los pacientes con retinopatía diabética, y dicha inhibición es similar a la obtenida después de la inmunoprecipitación del VEGF o de la inyección con vasoinhibinas.

De hecho, el efecto de las vaso-inhibinas involucra la actividad de las NOS en la retina, y dado que las vaso-inhibinas inhiben la actividad de la eNOS en las RRCEC, esta acción puede ocurrir directamente sobre los vasos sanguíneos de la retina. Hasta ahora hay dos mecanismos por los cuales las vaso-inhibinas pueden inhibir la activación de la eNOS. Previamente se demostró que las vaso-inhibinas interfieren con la movilización de calcio intracelular, lo que puede a su vez interferir con la activación de la eNOS para promover la angiogénesis y la vasodilatación (González et al., 2004). En este trabajo mostramos además que las vaso-inhibinas bloquean la actividad de la eNOS a través de inducir su desfosforilación en la serina<sup>1179</sup> vía la activación de la PP2A.

El VEGF es un conocido estimulador de la actividad de la eNOS vía la activación de la PI3K/Akt que fosforila a la eNOS en la serina<sup>1179</sup> de la secuencia bovina y en la serina<sup>1177</sup> de la secuencia de la eNOS humana (Six et al., 2002). Mecánicamente la fosforilación de la eNOS en la serina<sup>1179</sup> activa a la eNOS al incrementar el flujo de electrones a través del dominio de reductasa que aumenta su sensibilidad al calcio (McCabe et al., 2000). Por ello, la fosforilación de la eNOS es un importante mecanismo para promover las funciones vasculares dependientes del NO, incluyendo a la vasodilatación, la vasopermeabilidad y la angiogénesis (Ziche y Morbidelli 2000, Fukumura et al., 2001, Walford y Loscalzo 2003), y representa un importante sistema de regulación bajo condiciones fisiológicas y patológicas. En este mismo sentido, se ha reportado que ratones transgénicos que expresan solamente una forma constitutivamente fosforilada de la eNOS, debido a que presentan una mutación que intercambia la serina<sup>1179</sup> por un aspartato en la misma posición, responden mejor a factores vasorelajantes y muestran una incrementada reperusión durante la isquemia, reduciendo así la severidad de los infartos cerebrales (Atochin et al., 2007). Además del VEGF, el estrés mecánico inducido por el flujo

sanguíneo y factores vasoactivos, incluyendo a hormonas como la insulina (Montagnani et al., 2001) y los estrógenos (Hisamoto et al., 2001), inducen la fosforilación de la eNOS. La desfosforilación de este residuo por la acción de las vasoinhibinas representa, por tanto, un mecanismo común por el cual las vasoinhibinas pudieran contrarrestar los efectos de varias sustancias vasoactivas.

Este trabajo demuestra además el importante papel que juega la proteína PP2A en las acciones inhibitoras de la vasopermeabilidad de las vasoinhibinas tanto in vitro como in vivo. La observación de que el ácido okadaico (AO) en presencia de vasoinhibinas permite la vasopermeabilidad retiniana en respuesta al VEGF y en los cultivos de células endoteliales, sugiere la activación por las vasoinhibinas de una fosfatasa sensible al AO (Boudreau y Hoskin 2005). El AO no tuvo un efecto bajo condiciones basales o en combinación con el VEGF, lo que implica que la PP2A no se activa en ausencia de estímulo o por la acción del VEGF. El hecho de que el AO tenga un efecto estimulador cuando se combina con el VEGF y las vasoinhibinas sugiere que la activación de la PP2A por las vasoinhibinas puede reducir la vasopermeabilidad por medio de vías de señalización adicionales a la inactivación de la eNOS tales como la desfosforilación de las ocludinas (Seth et al., 2007). Por ejemplo, la fosforilación de ocludinas aumenta la permeabilidad vascular (Seth et al., 2007) y tanto la endostatina como la angiostatina reducen la permeabilidad vascular a través de estimular la expresión de ocludinas (Campell et al., 2006, Shyong et al., 2007).

El receptor mediante el cual actúan las vasoinhibinas no se ha identificado (Clapp y Weiner 1992) y el mecanismo por el que las vasoinhibinas activan a la PP2A aún es desconocido. La enzima PP2A activa consiste en un heterotrímero que se forma por la subunidad catalítica, y una subunidad adaptadora que se asocia con una variedad de



subunidades reguladoras. Varios mecanismos han sido propuestos para regular la actividad de la PP2A, incluyendo la regulación de la expresión y de la distribución subcelular de las subunidades reguladoras de la enzima, así como la metilación y la fosforilación de su subunidad catalítica (Ruvolo 2003, Junttila et al., 2008). Sin embargo, no se conocen los detalles de cómo los activadores de la PP2A lo hacen. Los efectos inhibitorios de las vasoinhibinas sobre la proliferación endotelial inducida por el VEGF pueden ser independientes de la activación de la PP2A ya que la estimulación de la PP2A bloquea la activación de Ras río arriba, mientras que las vasoinhibinas lo hacen río abajo, de la formación del complejo de proteínas adaptadoras Shc/Grb2/Sos (D'Angelo et al., 1999, Ugi et al., 2002). Por otro lado, la desfosforilación de la eNOS inducida por la activación de la PP2A en respuesta a las vasoinhibinas podría ayudar a contrarrestar la activación de la vía de las MAPKs en respuesta al VEGF. El NO revierte la inhibición de las vasoinhibinas sobre la proliferación endotelial inducida por el VEGF (González et al., 2004) y promueve la activación de la vía de las MAPKs a través de la estimulación de la producción de GMP cíclico que activa a la cinasa dependiente del GMP cíclico que a su vez fosforila y activa a Raf (Walford y Loscalzo 2003). Por otra parte, en relación con la apoptosis, la PP2A interfiere con las vías de supervivencia desfosforilando Akt y Bcl-2 (Millward et al., 1999, Ruvolo 2003), por lo que resultará importante determinar si las vasoinhibinas modifican la fosforilación de Akt y/o Bcl-2.

### ***Implicaciones clínicas.***

El tratamiento actual de la retinopatía diabética y del edema macular asociado a la diabetes es la fotocoagulación con láser, la cual protege de la pérdida progresiva de la visión pero no mejora la agudeza visual (Bloomgarden 2007). Dado que el exceso del VEGF en la retina juega un papel preponderante en el incremento de la vasopermeabilidad

retiniana, que es una de las primeras complicaciones que ocurren en el ojo de los pacientes con diabetes (Kristinsson et al., 1997), se han desarrollado terapias basadas en el uso de anticuerpos anti-VEGF dirigidas a inhibir los efectos del VEGF así como a inhibir las vías de señalización que éste desencadena (Emerson y Lauer 2007). A pesar de los beneficios clínicos alcanzados (Arevalo et al., 2007) este procedimiento requiere ser mejorado para que pueda ser considerado un tratamiento de rutina (Mohamed et al., 2007). Por lo tanto, es de gran interés la identificación y caracterización de nuevas moléculas capaces de inhibir las acciones del VEGF. Los resultados del presente estudio muestran claramente el potencial que tienen las vasoinhibinas a este respecto.

En su conjunto, los hallazgos de este estudio resaltan la relevancia de la desfosforilación de la eNOS para prevenir la vasopermeabilidad retiniana asociada con la retinopatía diabética y la identificación de la importante relación que guardan los efectos de la eNOS en respuesta al VEGF y las vasoinhibinas. De todo ello surge la idea de favorecer la actividad de las vasoinhibinas para reducir el incremento en la vasopermeabilidad que ocurre en la retinopatía diabética, como una aproximación para el tratamiento del edema macular diabético, de la retinopatía diabética y de otras retinopatías vasoproliferativas.

## CONCLUSIONES

1. Las vasoinhibinas bloquean la permeabilidad de las células endoteliales de la aorta de bovino y de capilares de la retina de rata inducida por el VEGF al inhibir la fosforilación de eNOS vía la activación de la PP2A.
2. Las vasoinhibinas inhiben la permeabilidad de la retina en ratas que fueron inyectadas intravítrealmente con VEGF, con vítreos de pacientes diabéticos así como en ratas diabéticas a las que se les indujo la diabetes con estreptozotocina.
3. Las vasoinhibinas prometen ser una opción terapéutica para el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos para el control de la vasopermeabilidad del edema macular diabético, de la retinopatía diabética y de otras retinopatías vasoproliferativas

## ANEXO

**Tabla 1. Características de los pacientes estudiados.**

Grupo	Paciente	Edad (años)	Tipo de Diabetes	Duración de la Diabetes (años)	HbA1c (%) <sup>A</sup>	Presión Arterial Sistólica (mmHg)	Observaciones
Pacientes	1	71	2	27	8	100	Hemorragias vitreales
Masculinos	2	61	2	15	7	100	Desprendimiento de retina
con	3	65	2	15	7	86.6	Hemorragias vitreales y
Retinopatía							edema macular
Diabética	4	28	1	18	10.9	146.7	Hemorragias vitreales
Severa <sup>B</sup>	5	47	2	10	9	100	Desprendimiento de retina
	6	47	2	5	8	100	Hemorragias vitreales y
							edema macular
Cadáveres	1	32	NA	NA	NA	NA	NA
Donadores	2	21	NA	NA	NA	NA	NA
Masculinos	3	58	NA	NA	NA	NA	NA
No	4	33	NA	NA	NA	NA	NA
Diabéticos <sup>C</sup>	5	76	NA	NA	NA	NA	NA

HbA1c (%) <sup>A</sup> Resultado de la hemoglobina A1c. <sup>B</sup> Referencia (Wilkinson et al., 2003). <sup>C</sup>

Cadáveres donadores que tuvieron muerte accidental y las muestras fueron obtenidas 12.5

±0.5 h post-mortem. NA: No aplica.

## REFERENCIAS

Adamis AP, Aiello LP, D'Amato RA. 1999. Angiogenesis and ophthalmic disease. *Angiogenesis* 3: 9-14

Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE. 1994. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.* 331:1480-1487

Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, Duh E, Ishii H, Takagi C, Mori F, Ciulla TA, Ways K, Jirousek M, Smith LE, King GL. 1997. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor *Diabetes.* 46:1473-1480

Amrite AC, Ayalasomayajula SP, Cheruvu NP, Kompella UB. 2006. Single periocular injection of celecoxib-PLGA microparticles inhibits diabetes-induced elevations in retinal PGE2, VEGF, and vascular leakage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 47:1149-1160

Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, Lieth E, Tarbell JM, Gardner TW. 1998. Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. *Penn State Retina Research Group Diabetes.* 47:1953-1959

Antoniak K, Bienias W, Nowak JZ. 2008. Age-related macular degeneration--a complex genetic disease. *Klin Oczna.* 110:211-218

Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo-Escovar J, Nava G, López-Barrera F, Quiróz-Mercado H, Berger P, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2005. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:2947-2953

Arevalo JF, Fromow-Guerra J, Quiroz-Mercado H, Sanchez JG, Wu L, Maia M, Berrocal MH, Solis-Vivanco A, Farah ME; Pan-American Collaborative Retina Study Group. 2007. Primary intravitreal bevacizumab (Avastin) for diabetic macular edema: results from the Pan-American Collaborative Retina Study Group at 6-month follow-up. *Ophthalmology.* 114:743-750

Atochin DN, Wang A, Liu VW, Critchlow JD, Dantas AP, Looft-Wilson R, Murata T, Salomone S, Shin HK, Ayata C, Moskowitz MA, Michel T, Sessa WC, Huang PL. 2007. The phosphorylation state of eNOS modulates vascular reactivity and outcome of cerebral ischemia in vivo. *J Clin Invest.* 117:1961-1967

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

Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. 2002. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat.* 200:581-597

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

Bloomgarden ZT. 2007. Screening for and managing diabetic retinopathy: current approaches. *Am J Health Syst Pharm.* 64:S8-S14

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

Boudreau RT, Hoskin DW. 2005. The use of okadaic acid to elucidate the intracellular role(s) of protein phosphatase 2A: lessons from the mast cell model system. *Int Immunopharmacol.* 5:1507-1518

Cai J, Boulton M. 2002. The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye* 16:242-260

Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, El-Remessy AE, Al-Shabrawey M, Platt DH, Caldwell RW. 2003. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev.* 19:442-455

Campbell M, Collery R, McEvoy A, Gardiner TA, Stitt AW, Brankin B. 2006. Involvement of MAPKs in endostatin-mediated regulation of blood-retinal barrier function. *Curr Eye Res.* 31:1033-1045

Cao Y, Cao R, Veitonmaki N. 2002. Kringle structures and antiangiogenesis. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2:667-681

Carmeliet P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 9:653-660

Clapp C. 1987. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology*. 121:2055-2064

Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jeziorski MC, Martinez de la Escalera. 2006. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* 17:301-307

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure 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, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez de la Escalera G Hormonal Regulation of Angiogenesis. *Physiological Reviews*. En Prensa

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 activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:10384-10388

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

Clermont AC, Aiello LP, Mori F, Aiello LM, Bursell SE. 1997. Vascular endothelial growth factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo: a potential role for vascular endothelial growth factor in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy *Am J Ophthalmol*. 124:433-446



Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Huang Y, Osdoby P. 2002. Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis in vivo on the chick chorioallantoic membrane and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro. *J Bone Miner Res.* 17:1859-1871

Cruz-Soto ME, Cosío G, Carabez A, Adán N, Berger P, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2008. Detection cleaved PRL, vasoinhibins, and cathepsin D in primary cultures of anterior pituitary cells. 90 th Annual Meeting of the Endocrine Society. San Francisco, CA., USA

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

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

Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM. 2000. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett.* 477:258-262

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399:601-605

Dorrell M, Uusitalo-Jarvinen H, Aguilar E, Friedlander M. 2007. Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol.* 52:S3-S19

Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel TM. 2005. The Regulation and Pharmacology of Endothelial Nitric Oxide Synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 46:235-276

Dueñas Z, Rivera JC, Quiróz-Mercado H, Aranda J, Macotela Y, Montes de Oca P, López-Barrera F, Nava G, Guerrero JL, Suarez A, De Regil M, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2004. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:2049-2055

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

Emerson MV, Lauer AK. 2007. Emerging therapies for the treatment of neovascular age-related macular degeneration and diabetic macular edema. *BioDrugs.* 21:245-257

Feng Y, Venema VJ, Venema RC, Tsai N, Behzadian MA, Caldwell RB. 1999. VEGF-induced permeability increase is mediated by caveolae. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:157-167

Ferrara N, Henzel WJ. 1989. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 161:851-858

Folkman J. 1992. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol.* 3:65-71

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

Folkman J, Shing Y. 1992. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 267:10931-10934

Frank RN. 2004. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 350:48-58

Fujinaka Y, Takane K, Yamashita H, Vasavada RC. 2007. Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *J Biol Chem.* 282:30707-30717

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

Fukumura D, Jain RK. 1998. Role of nitric oxide in angiogenesis and microcirculation in tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 17:77-89

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 399:597-601

Funatsu H, Yamashita H, Nakamura S, Mimura T, Eguchi S, Noma H, Hori S. 2006. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology.* 113:294-301

Galfione M, Luo W, Kim J, Hawke D, Kobayashi R, Clapp C, Yu-Lee LY, Lin SH. 2003. Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expr Purif.* 28:252-258

Gao BB, Clermont A, Rook S, Fonda SJ, Srinivasan VJ, Wojtkowski M, Fujimoto JG, Avery RL, Arrigg PG, Bursell SE, Aiello LP, Feener EP. 2007. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med.* 13:181-188

Gao F, Gao E, Yue TL, Ohlstein EH, Lopez BL, Christopher TA, Ma XL. 2002. Nitric oxide mediates the antiapoptotic effect of insulin in myocardial ischemia-reperfusion: the roles of PI3-kinase, Akt, and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Circulation* 105:1497-1502

Gariano RF, Gardner TW. 2005. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 438:960-966

Ge G, Fernández CA, Moses MA, Greenspan DS. 2007. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:10010-10015

Gelinas DS, Bernatchez PN, Rollin S, Bazan NG, Sirois MG. 2002. Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways. *Br J Pharmacol* 137:1021-1030

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

González C, Corbacho AM, Eiserich JP, Garcia C, Lopez-Barrera F, Morales Tlalpan V, Barajas-Espinosa A, Diaz-Muñoz M, Rubio R, Lin SH, Martinez de la Escalera, Clapp C. 2004. 16K-Prolactin Inhibits Activation of Endothelial Nitric Oxide synthase, Intracellular Calcium Mobilization, and Endothelium-Dependent Vasorelaxation. *Endocrinology* 145:5714-5722

Greif DM, Kou R, Michel T. 2002. Site-specific dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by protein phosphatase 2A: evidence for crosstalk between phosphorylation sites. *Biochemistry*. 41:15845-15853

Grosvenor CE, Whitworth NS. 1983. Accumulation of prolactin by maternal milk and its transfer to circulation of neonatal rat--a review. *Endocrinol Exp*. 17:271-282

Guo L, Salt TE, Luong V, Wood N, Cheung W, Maass A, Ferrari G, Russo-Marie F, Sillito AM, Cheetham ME, Moss SE, Fitzke FW, Cordeiro MF. 2007. Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:13444-13449

Hammes HP. 2005. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Horm Metab Res*. 37:39-43

Harter M, Balarac N, Pourcher P, Koslowski JM, Krebs B, Ramaioli A. 1976. Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet*. 2:961-962

Hartley D, Cooper GM. 2002. Role of mTOR in the degradation of IRS-1: regulation of PP2A activity. *J Cell Biochem*. 85:304-314

Hisamoto K, Ohmichi M, Kurachi H, Hayakawa J, Kanda Y, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Miyoshi E, Fujiwara N, Taniguchi N, Murata Y. 2001. Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 276:3459-3467

Hunter PR, Anderson J, Lunn TA, Horrobin DF, Boyns AR, Cole EN. 1974. Letter: Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet.* 1:1237

Hylander MA, Strobino DM, Pezzullo JC, Dhanireddy R. 2001. Association of human milk feedings with a reduction in retinopathy of prematurity among very low birthweight infants. *J Perinatol.* 21:356-362

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

Jeffcoate W. 2002. Growth hormone therapy and its relationship to insulin resistance, glucose intolerance and diabetes mellitus: a review of recent evidence. *Drug Saf.* 25:199-212

Junttila MR, Li SP, Westermarck J. 2008. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.* 22:954-965

Keshet E. 2001. More weapons in the arsenal against ischemic retinopathy. *J Clin Invest* 107:945-946

Kevil CG, Payne DK, Mire E, Alexander JS. 1998. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem.* 273:15099-15103

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

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

Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. 1994. The Wisconsin Epidemiologic Study of diabetic retinopathy. XIV. Ten-year incidence and progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 112:1217-1228

Knudsen ST, Bek T, Poulsen PL, Hove MN, Rehling M, Mogensen CE. 2002. Macular edema reflects generalized vascular hyperpermeability in type 2 diabetic patients with retinopathy. *Diabetes Care.* 25:2328-2334

Kristinsson JK, Gottfredsdóttir MS, Stefánsson E. 1997. Retinal vessel dilatation and elongation precedes diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol.* 81:274-278

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

Lee SH, Kunz J, Lin SH, Yu-Lee LY. 2007. 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Res.* 67:11045-11053

Li Z, Carter JD, Dailey LA, Huang YC. 2004. Vanadyl sulfate inhibits NO production via threonine phosphorylation of eNOS. *Environ Health Perspect* 112:201-206

Macotella Y, Aguilar MB, Guzman-Morales J, Rivera JC, Zermeno C, Lopez-Barrera F, Nava G, Lavallo C, Martinez de la Escalera G, Clapp C. 2006. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci* 119:1790-1800

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

McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC. 2000. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 275:6123-6128

Michell BJ, Chen Zp, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT. 2001. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 276:17625-17628



Miller JW, Adamis AP, Shima DT, D'Amore PA, Moulton RS, O'Reilly MS, Folkman J, Dvorak HF, Brown LF, Berse B. 1994. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol.* 145:574-584

Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA. 1999. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem Sci.* 24:186-191

Mineo C, Gormley AK, Yuhanna IS, Osborne-Lawrence S, Gibson LL, Hahner L, Shohet RV, Black S, Salmon JE, Samols D, Karp DR, Thomas GD, Shaul PW. 2005. FcγRIIB mediates C-reactive protein inhibition of endothelial NO synthase. *Circ Res* 97:1124-1131

Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Moromizato Y, Aiello LP, Ogura Y, Adamis AP. 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol.* 156:1733-1739

Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. 2007. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA.* 298:902-916

Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. 2001. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca<sup>2+</sup> but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem.* 276:30392-30398

Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. 1998. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101:2567-2578

Navaratna D, McGuire PG, Menicucci G, Das A. 2007. Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes*. 56:2380-2387

Ochoa A, Montes de Oca P, Rivera JC, Dueñas Z, Nava G, de La Escalera GM, Clapp C. 2001. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42:1639-1645

Ojima T, Takagi H, Suzuma K, Oh H, Suzuma I, Ohashi H, Watanabe D, Suganami E, Murakami T, Kurimoto M, Honda Y, Yoshimura N. 2006. EphrinA1 inhibits vascular endothelial growth factor-induced intracellular signaling and suppresses retinal neovascularization and blood-retinal barrier breakdown. *Am J Pathol*. 168:331-339

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88:277-285

O'Reilly MS, Pirie-Shepherd S, Lane WS, Folkman J. 1999. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science*. 285:1926-1928

O'Steen WK, Sundberg DK. 1982. Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin *Ophthalmic Res*. 14:54-62

Pan H, Nguyen NQ, Yoshida H, Bentzien F, Shaw LC, Rentier-Delrue F, Martial JA, Weiner R, Struman I, Grant MB. 2004. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45:2413-2419

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

Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. 1998. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem* 273:4220-4226

Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial JA, Kelly PA, Goffin V. 2004. Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol.* 18:2522-2542

Pleyer U, Gupta D, Weidle EG, Lisch W, Zierhut M, Thiel HJ. 1991. Elevated prolactin levels in human aqueous humor of patients with anterior uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 229:447-451

Qaum T, Xu Q, Jousseaume AM, Clemens MW, Qin W, Miyamoto K, Hasselmann H, Wiegand SJ, Rudge J, Yancopoulos GD, Adamis AP. 2001. VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:2408-2413

Reynolds JD. 2001. The management of retinopathy of prematurity. *Paediatr Drugs.* 3:263-272

Rivera JC, Aranda J, Riesgo J, Nava G, Thebault S, López-Barrera F, Ramírez M, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 2008. Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Exp Eye Res.* 86:314-321

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH. 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4167-4171

Ruvolo PP. 2003. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res.* 47:383-392

Schwentker A, Vodovotz Y, Weller R, Billiar TR. 2002. Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide.* 7:1-10

Seth A, Sheth P, Elias BC, Rao R. 2007. Protein phosphatases 2A and 1 interact with occludin and negatively regulate the assembly of tight junctions in the CACO-2 cell monolayer. *J Biol Chem.* 282:11487-11498

Sheth BP. 2002. Does pregnancy accelerate the rate of progression of diabetic retinopathy? *Curr Diab Rep.* 2:327-30

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

Shyong MP, Lee FL, Kuo PC, Wu AC, Cheng HC, Chen SL, Tung TH, Tsao YP. 2007. Reduction of experimental diabetic vascular leakage by delivery of angiostatin with a recombinant adeno-associated virus vector. *Mol Vis.* 13:133-141

Simó R, Hernández C. 2008. Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia.* 51(9):1574-80

Simó R, Lecube A, Segura RM, García Arumí J, Hernández C. 2002. Free insulin growth factor-I and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol.* 134:376-382

Six I, Kureishi Y, Luo Z, Walsh K. 2002. Akt signaling mediates VEGF/VPF vascular permeability in vivo. *FEBS Lett.* 532:67-69

Smits A, Hermansson M, Nistér M, Karnushina I, Heldin CH, Westermark B, Funa K. 1989. Rat brain capillary endothelial cells express functional PDGF B-type receptors. *Growth Factors.* 2:1-8

Srivatsa LP. 1994. Evolution and natural history of diabetic retinopathy during pregnancy. *Metab Pediatr Syst Ophthalmol.* 17:19-28

Tabruyn SP, Nguyen NQ, Cornet AM, Martial JA, Struman I. 2005. The antiangiogenic factor, 16-kDa human prolactin, induces endothelial cell cycle arrest by acting at both the G0-G1 and the G2-M phases. *Mol Endocrinol.* 19:1932-1942

Tabruyn SP, Sorlet CM, Rentier-Delrue F, Bours V, Weiner RI, Martial JA, Struman I. 2003. The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol* 17:1815-1823

Taniguchi H, Kitaoka T, Gong H, Amemiya T. 1999. Apoptosis of the hyaloid artery in the rat eye. *Ann Anat.* 181:555-560

Tilton RG, Chang KC, LeJeune WS, Stephan CC, Brock TA, Williamson JR. 1999. Role for nitric oxide in the hyperpermeability and hemodynamic changes induced by intravenous VEGF. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 40:689-696

Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Jakobiec FA, Flynn E, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP. 1996. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology.* 103:1820-1828

Torner L, Maloumy R, Nava G, Aranda J, Clapp C, Neumann ID. 2004. In vivo release and gene upregulation of brain prolactin in response to physiological stimuli. *Eur J Neurosci.* 19:1601-1608

Torner L, Mejía S, López-Gómez FJ, Quintanar A, Martínez de la Escalera G, Clapp C. 1995. A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology.* 136:5454-5460

Ugi S, Imamura T, Maegawa H, Egawa K, Yoshizaki T, Shi K, Obata T, Ebina Y, Kashiwagi A, Olefsky JM. 2004. Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 24:8778-8789

Ugi S, Imamura T, Ricketts W, Olefsky JM. 2002. Protein phosphatase 2A forms a molecular complex with Shc and regulates Shc tyrosine phosphorylation and downstream mitogenic signaling. *Mol Cell Biol.* 22:2375-2387

Walford G, Loscalzo J. 2003. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost* 1:2112-2118

Wang Y, Gu Y, Granger DN, Roberts JM, Alexander JS. 2002. Endothelial junctional protein redistribution and increased monolayer permeability in human umbilical vein endothelial cells isolated during preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 186:214-220

Weinhaus AJ, Stout LE, Bhagroo NV, Brelje TC, Sorenson RL. 2007. Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy. *J Endocrinol.* 193:367-381

Wheatley CM, Dickinson JL, Mackey DA, Craig JE, Sale MM. 2002. Retinopathy of prematurity: recent advances in our understanding. *Br J Ophthalmol.* 86:696-700

Wilkinson CP, Ferris FL 3rd, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, Dills D, Kampik A, Pararajasegaram R, Verdaguer JT; Global Diabetic Retinopathy Project Group. 2003. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology.* 110:1677-1682

Williams R, Airey M, Baxter H, Forrester J, Kennedy-Martin T, Girach A. 2004. Epidemiology of diabetic retinopathy and macular oedema: a systematic review. *Eye.* 18:963-983

Wright AD, Kohner EM, Oakley NW, Hartog M, Joplin GF, Fraser TR. 1969. Serum growth hormone levels and the response of diabetic retinopathy to pituitary ablation. *Br Med J.* 2:346-348

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

Xu Q, Qaum T, Adamis AP. 2001. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:789-794

Yam JC, Kwok AK. 2007. Update on the treatment of diabetic retinopathy. *Hong Kong Med J.* 13:46-60

Ziche M, Morbidelli L. 2000. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* 50:139-148