



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Instituto de Neurobiología

ANÁLISIS DE LA GENERACIÓN DE VASOINHIBINAS EN LA PREECLAMPSIA

Tesis que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias (Neurobiología)
presenta

la L.C.Q. María de Lourdes Lemini Arámburo

Directora de Tesis
Dra. María del Carmen Clapp Jiménez-Labora



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

La preeclampsia es causa de mortalidad en el 5% de todos los embarazos. Evidencias recientes indican que la inhibición de la proliferación de vasos sanguíneos (angiogénesis) y el aumento en el tono vascular son determinantes de dicho padecimiento. La prolactina (PRL) aumenta en la circulación durante el embarazo; es producida por la decidua uterina y es modificada proteolíticamente hacia vasoinhibinas, una familia de péptidos con acciones inhibitorias sobre la angiogénesis y la vasodilatación. Recientemente se reportó que las vasoinhibinas se incrementan en el líquido amniótico (LA) de pacientes con preeclampsia. Sin embargo, el LA no parece contener proteasas que generen vasoinhibinas a partir de PRL, por lo que las vasoinhibinas que se encuentran en el LA podrían derivar del procesamiento de la PRL decidual en la placenta. En este trabajo mostramos que la catepsina D, presente en los trofoblastos, genera a las vasoinhibinas a partir de la PRL y que tanto su actividad como su concentración son mayores en los trofoblastos de placentas de mujeres con preeclampsia que en los provenientes de placentas de mujeres con embarazos normales. Por otro lado, también mostramos que metaloproteasas de matriz (MMP) presentes en los trofoblastos de mujeres preeclámpicas generan una proporción mayor de vasoinhibinas que las de los trofoblastos de placentas normales. La MMP-9, que se sabe genera vasoinhibinas a partir de PRL, se encuentra presente en mayor concentración en los trofoblastos provenientes de placentas de mujeres con preeclampsia en comparación a los de mujeres con embarazos normales. Sin embargo, la MMP-13 y la MMP-2 que también generan vasoinhibinas a partir de PRL no mostraron cambios significativos. Finalmente, mostramos que la orina de pacientes preeclámpicas contiene una mayor proporción de vasoinhibinas que la orina de mujeres con embarazos normales. Estos resultados sugieren que la catepsina D y las MMP-9 participan en la generación de vasoinhibinas en la preeclampsia y que dichos péptidos pueden tener una distribución sistémica. En conclusión, nuestro trabajo apoya la posibilidad de que las vasoinhibinas pueden participar en la patofisiología de la preeclampsia.

ABSTRACT

Preeclampsia affects about 5% of all pregnancies and results in maternal and neonatal mortality. Recent evidence indicates that inhibition of the proliferation of blood vessels (angiogenesis) and increased vascular tone are determinants of preeclampsia. Prolactin (PRL) increases in circulation during pregnancy, is produced by the uterine decidua and is proteolytically modified to vaso-inhibins, a family of peptides with inhibitory actions on angiogenesis and vasodilation. It has been reported recently that vaso-inhibins increase in amniotic fluid (AF) of patients with preeclampsia but it does not seem to contain proteases that generate vaso-inhibins from PRL. Hence, the vaso-inhibins found in the AF could be derived from decidual PRL processing in the placenta. In this thesis we show that cathepsin D present in the trophoblast generate vaso-inhibins from PRL and that both its activity and its concentration are higher in trophoblasts of placentas from women with preeclampsia than in placentas from women with normal pregnancies. On the other hand, we also show that matrix metalloproteinases (MMP) present in the trophoblasts of preeclamptic women generate a higher proportion of vaso-inhibins than the trophoblasts of normal placentas. The MMP-9, known to generate vaso-inhibins from PRL, is present in greater concentration in the trophoblasts from placentas of women with preeclampsia compared to women with normal pregnancies. However, MMP-13 and MMP-2, which also generate vaso-inhibins from PRL, showed no significant change. Finally, we show that urine of preeclamptic patients contains a higher proportion of vaso-inhibins than urine of women with normal pregnancies. These results suggest that cathepsin D and MMP-9 are involved in generating vaso-inhibins in preeclampsia and that these peptides may have a systemic distribution. In conclusion, vaso-inhibins can participate in the pathophysiology of preeclampsia.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Becario número: 228328.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM. Número de cuenta: 508001460.

Al personal de la Biblioteca del campus UNAM Juriquilla, que era encabezado por la Lic. María del Pilar Galarza Barrios al comenzar este trabajo, y después por el Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela, como Coordinadores, y por la Lic. Teresa Soledad Medina Malagón, encargada del Desarrollo de Colecciones y Procesos.

Al personal de la Unidad de Enseñanza, de manera muy especial a la M. en C. Leonor Casanova Rico, Jefa de la Unidad de Enseñanza y a la secretaria Yolanda Orduña Cruz.

A la Dra. Carmen Clapp, con quien he tenido oportunidad, desde mi primera estancia en su laboratorio como alumna de un Programa de Verano, de conocer el interesante mundo de la investigación científica. Agradezco la confianza que me ha brindado al dejarme participar en algunos de sus proyectos en su laboratorio, así como por el apoyo y la guía para trabajar en ellos.

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

A los amigos que he encontrado en el Instituto, de manera especial a Francisco Carmona, Benjamín Velarde, Mayda Ramirez, Claudia Vega, Norma Adán e Isabel Méndez.

DEDICATORIA

Este escrito se lo dedico a mis padres, quienes con su apoyo, amor, educación, valores y ejemplo me han llevado a culminar con esta etapa de mi vida...

Mary Arámburo y Elfego Lemini.

ÍNDICE

Páginas

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Prolactina.....	2
1.2 Vasoinhibinas	4
1.3 Generación de Vasoinhibinas.....	6
1.3.1 Proteólisis de PRL por Catepsina D.....	6
1.3.2 Proteólisis de PRL por Metaloproteasas de Matriz	8
1.3.3 Vasoinhibinas endógenas	10
2. ANTECEDENTES	11
2.1 La Placenta.....	11
2.2 Preeclampsia.....	13
2.3 Papel de la PRL y las vasoinhibinas en la Preeclampsia	16
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1 Población de Estudio.....	21
6.2 Corte de PRL a partir de Trofoblastos.....	21
6.3 Western-blot.....	22
6.4 Determinación inmunológica de vasoinhibinas y de PRL en orina de mujeres embarazadas normales, preeclámpticas y con IUGR:.....	23
7. RESULTADOS.....	25
7.1 Análisis del procesamiento proteolítico de la PRL por catepsina D presente en trofoblastos de mujeres con preeclampsia.	25
7.2 Análisis del procesamiento proteolítico de la PRL por MMPs presentes en trofoblastos de mujeres con preeclampsia.	28
7.3 Análisis de la presencia de vasoinhibinas en la orina de mujeres con preeclampsia y con IUGR.....	34
8. DISCUSIÓN	37
9. CONCLUSIONES	41
10. REFERENCIAS.....	42
11. LISTA DE FIGURAS.....	51

1. INTRODUCCIÓN

La preeclampsia afecta al 5% de todos los embarazos y es causa de mortalidad y morbilidad maternal y neonatal (Sibai et al., 2005). Este padecimiento se diagnostica a través de la presencia de hipertensión, proteinuria y edema, generalmente a partir de la semana 20 de gestación (Roberts y Cooper, 2001; Sibai et al., 2005). Si bien se desconoce la etiología de la preeclampsia, se acepta que tiene su origen en la placenta, dado que este padecimiento se resuelve con la expulsión de la misma (Roberts y Cooper, 2001). Se ha propuesto que el síndrome es desencadenado por factores presentes en la placenta capaces de alterar el endotelio vascular de la interfase fetomaternal y de la circulación sistémica materna (Sibai et al., 2005, Lam et al., 2005). Así, la inhibición de la proliferación de vasos sanguíneos (angiogénesis) y el aumento en el tono vascular son algunas de las determinantes de dicho padecimiento. Por ejemplo, se ha mostrado que el bloqueo de las acciones angiogénicas y vasodilatadoras del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del óxido nítrico (NO) producen hipertensión, proteinuria, y bajo peso al nacer, que son las manifestaciones clínicas de la preeclampsia (Vatish et al., 2006).

La hormona prolactina aumenta en la circulación durante el embarazo (Ben-Jonathan et al., 1996), es producida por la decidua uterina (Soares et al., 1998) y es modificada proteolíticamente hacia vasoinhibinas, una familia de péptidos con acciones inhibitorias sobre la angiogénesis y la vasodilatación (Clapp et al., 2006). Además, recientemente se reportó que las vasoinhibinas se incrementan en el líquido amniótico de pacientes con preeclampsia (Gonzalez et al., 2007).

En esta tesis, revisamos información en torno a aspectos generales de la fisiología de la prolactina, las vasoinhibinas y de la etiología de la preeclampsia. El trabajo experimental investiga si las vasoinhibinas contribuyen a la patofisiología de la preeclampsia a través de analizar si dichos péptidos se generan diferencialmente en la placenta de pacientes preeclámpticas y se incrementan sistémicamente. Con dicho propósito, determinamos la generación de dichos péptidos por proteasas presentes en los

trofoblastos aislados de placentas provenientes de mujeres con embarazos normales y con preeclampsia y la presencia de vasoinhibinas en la orina de mujeres de ambos grupos y se compararon con mujeres que cursan con el síndrome de restricción del crecimiento intrauterino (IUGR).

1.1 Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica secretada por la glándula pituitaria anterior cuyo nombre se deriva de su acción sobre la producción de leche durante la lactancia. Sin embargo, además de este efecto, la prolactina ejerce más de 300 efectos diferentes que se incluyen dentro de la reproducción, la osmorregulación, el crecimiento, la respuesta inmune y la angiogénesis (Ben-Jonathan et al., 1996; Clapp et al 2007).

La prolactina se origina a partir de un solo gen que se encuentra presente en todos los vertebrados y que da origen a una proteína madura de 200 aminoácidos con una masa molecular de 23 kDa (Ben-Jonathan et al., 1996, Bole-Feysot et al., 1998). Debido a similitudes en la estructura de la hormona y de sus receptores, la PRL se ha integrado a la familia de las citocinas hematopoyéticas, que incluye al factor estimulador de colonias, a las interleucinas-2, 4 y 5, y a hormonas lactogénicas como la hormona de crecimiento, y el lactógeno placentario (Horseman y Yu-Lee 1994). Los ligandos de esta familia presentan como motivo estructural característico una organización en cuatro α -hélices antiparalelas (Goffin et al., 1996). Por otra parte, los receptores de esta familia de citocinas se caracterizan por tener dos puentes disulfuro y una secuencia Trp-Ser-X-Trp-Ser en el dominio extracelular conocida como motivos WB, que es importante para su interacción con el ligando (Horseman y Yu-Lee 1994).

Con respecto al receptor de PRL, se han identificado al menos tres isoformas que resultan del procesamiento alternativo del RNA mensajero (Boutin et al., 1988; Davis y Linzer 1989). El dominio de unión a ligando es idéntico en todas las isoformas y la diferencia entre los receptores reside en la extensión del dominio intracitoplasmático, y que por lo tanto los define como corto (42 kDa), intermedio (65 kDa) y largo (80 kDa). El receptor de PRL se

expresa prácticamente en todos los tipos celulares donde se ha analizado; sin embargo, su función es aún poco conocida en muchos tejidos. Además, en algunos de ellos su nivel de expresión es muy bajo y se desconoce si un aumento en su expresión puede ser factor determinante para su función (Nagano y Kelly 1994).

El receptor de PRL es activado por PRL y lactógenos placentarios de las diferentes especies y por la hormona de crecimiento en la especie humana, exclusivamente. La activación de este receptor ocurre a través de la unión de una molécula de ligando a dos moléculas de receptor (dimerización), y por lo tanto esta interacción involucra dos regiones diferentes del ligando que interaccionan cada una con una molécula diferente de receptor. El proceso de dimerización inicia una cascada de eventos intracelulares. El receptor de PRL carece de actividad enzimática y la transducción de la señal ocurre mediante su asociación con diferentes cinasas, que a su vez activan a las moléculas efectoras. La vía de señalización más importante activada por el receptor de PRL es la vía JAK/STAT (“Janus kinases/ signal transducer and activation of transcription”). La dimerización del receptor de PRL induce la transfosforilación/activación de las cinasas de tirosina JAK2 que se encuentran normalmente asociadas a cada molécula del receptor. Las JAK2 así activadas fosforilan residuos de tirosina del receptor lo que origina sitios de anclaje para las proteínas STAT, las cuales al unirse al receptor son fosforiladas a su vez por las JAK2. Una vez fosforiladas, las STAT se disocian del receptor para formar dímeros que se translocan al núcleo, se unen a secuencias consenso en el DNA denominadas GAS (“interferon- γ activation sequence”) y activan la transcripción génica (Bole-Feysot et al., 1998). Las principales proteínas STAT activadas por PRL son tres: STAT-1 que en respuesta a PRL estimula la transcripción del gen de IRF-1 (“interferon regulatory factor-1”) en células hematopoiéticas; STAT-3 que es activada en respuesta a PRL pero aún se desconocen sus genes blanco; y STAT-5, que en el epitelio mamario induce la expresión de los genes de β -caseína, β -lactoglobulina, etc (Yu-Lee 1997).

Los receptores de PRL pueden activarse también en respuesta a otras variantes moleculares de la hormona (Sinha 1995). En su mayor parte, las isoformas de PRL son generadas por modificaciones postraduccionales del tipo de la fosforilación, glicosilación y proteólisis (Sinha 1995). Sin embargo, estas

modificaciones postraduccionales suelen reducir la afinidad por el receptor y la actividad biológica de las isoformas de prolactina. Así, la fosforilación puede generar antagonistas de la hormona (Wang y Walker 1993), mientras que la glicosilación (Hoffman et al., 1993) y la proteólisis (Anthony et al., 1993; Clapp et al., 1989) generan variantes de PRL con una menor actividad hormonal mitogénica y lactogénica. Si bien el procesamiento proteolítico de la PRL hacia vasoinhibinas resulta en una actividad reducida en los bioensayos clásicos para PRL, estas variantes moleculares han despertado gran interés debido a que poseen efectos distintos a los de la PRL íntegra, mediados por la activación de receptores diferentes (Clapp et al 2006).

1.2 Vasoinhibinas

Las vasoinhibinas, se descubrieron hace más de 15 años cuando se mostró que el fragmento de 16 kDa de la PRL que resulta del procesamiento proteolítico de la hormona por catepsina-D inhibe la proliferación de células endoteliales derivadas de capilares cerebrales bovinos en cultivo (Ferrara et al., 1991). Poco tiempo después se mostró que un fragmento de 14 kDa de la PRL producido por DNA recombinante inhibía tanto la proliferación endotelial como su organización en estructuras capilares que tiene lugar cuando el endotelio se cultiva en geles de colágena tipo-I (Clapp et al., 1993). Además, se observó que todas estas acciones parecen resultar en la inhibición del proceso integral de la angiogénesis que tiene lugar *in vivo*. Al respecto, se ha reportado que las vasoinhibinas bloquean la vascularización de la córnea inducida por factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) (Dueñas et al., 1999) y la proliferación de vasos capilares en el ensayo de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (Clapp et al., 1993; Struman et al., 1999). Además, la expresión de vasoinhibinas mediante transferencia génica en células de cáncer de próstata y de colon redujo significativamente la habilidad de ambos tipos celulares de formar tumores en ratones inmunosuprimidos (Bentzien et al., 2001; Kim et al., 2003), resultados que han permitido proponer a las vasoinhibinas como posibles factores terapéuticos para el tratamiento de patologías dependientes de la angiogénesis.

Dado que la PRL no inhibe la angiogénesis, se propuso que los efectos de las vasoinhibinas son mediados vía un receptor distinto al receptor de la PRL (Clapp et al., 2006). En apoyo a esta propuesta, se mostró que las células endoteliales de capilares del cerebro bovino contienen sitios de unión específicos, saturables y de alta afinidad para las vasoinhibinas ($K_d = 1\text{nM}$) pero que no unen a la PRL y que podrían representar los receptores específicos de esta familia de péptidos (Clapp y Weiner, 1992). Si bien los receptores a las vasoinhibinas no se han identificado, se tiene información acerca de algunos mecanismos que median su señalización. Por ejemplo, se sabe que las vasoinhibinas interfieren con el efecto mitogénico del VEGF y del bFGF a través de bloquear su acción promotora de la vía de las cinasas de serina activadas por mitógeno (MAPK) bloqueando la activación de Ras (D'Angelo et al., 1999) y Raf-1 (D'Angelo et al., 1995). Además, las vasoinhibinas también inducen la apoptosis del endotelio vascular a través de promover la activación de las caspasas 1 y 3 y la expresión del factor proapoptótico Bcl-X1,2 (Martini et al., 2000).

Todos estos hallazgos indican que las vasoinhibinas son antiangiogénicas, al actuar específicamente sobre las células endoteliales ya sea inhibiendo aquellos procesos indispensables para la angiogénesis, tales como la proliferación endotelial y la degradación de la matriz extracelular, o bien promoviendo eventos relacionados con la apoptosis del endotelio, tales como los procesos de remodelado y regresión vascular (Corbacho et al., 2006).

Más recientemente se demostró que las vasoinhibinas interfieren con la producción de óxido nítrico (NO) inducida en el endotelio vascular por efecto del VEGF y por sustancias vasodilatadoras, la bradicidina y la acetilcolina (Gonzalez et al., 2004). Este efecto se debe a la activación por vasoinhibinas de la fosfatasa de proteínas 2A (PP2A) que defosforila/inactiva a la sintetasa endotelial de NO o eNOS lo que resulta en la inhibición de los efectos vasodilatadores y estimuladores de la vasopermeabilidad del VEGF (Garcia et al., 2008). De manera que las vasoinhibinas no solamente inhiben la proliferación de los vasos sanguíneos, sino también la homeostasis vascular a través de bloquear la producción de NO responsable de la relajación del músculo liso vascular y de la vasopermeabilidad.

1.3 Generación de Vasoinhibinas

1.3.1 Proteólisis de PRL por Catepsina D

La catepsina D es una proteasa intracelular de aspártico que es activa a pH ácido y que pertenece a la superfamilia de las pepsinas. La catepsina D está involucrada en muchas funciones fisiológicas como la degradación proteolítica, la apoptosis y la autofagia (Benes et al., 2008). Además, esta enzima ha sido asociada con algunas patologías como el cáncer (Vetvicka et al., 1994). La catepsina D se localiza en los lisosomas de casi todas las células de tejidos de mamíferos (Zaidi et al., 2008). La catepsina D humana es sintetizada como un único polipéptido que es procesado proteolíticamente a la forma madura de dos cadenas; una cadena ligera amino terminal de 14 kDa y otra cadena pesada carboxilo terminal de 34 kDa, las cuales se mantienen asociadas entre sí por interacciones hidrofóbicas. Antes de la generación de la forma madura de dos cadenas, la catepsina D pasa por diferentes estados proteolíticos, en el lisosoma se encuentra como un péptido precursor inactivo conocido como procatepsina D. La procatepsina D se puede convertir por sí misma, por medio de una vía autoproteolítica, a un intermediario activo, la pseudocatepsina D, mientras otras proteasas están involucradas en el procesamiento y formación de la catepsina D madura (Hurley et al., 2000). Por lo tanto, los aislamientos tempranos de catepsina D muestran diferentes formas que difieren en tamaño, en el número de polipéptidos asociados y en el punto iso-eléctrico, pero tienen actividades similares (Fig. 1) (Zaidi et al., 2008). Posteriormente, las modificaciones covalentes sitio-dirigidas demostraron que la catepsina D tiene un sitio activo similar a las pepsinas, confirmando su identidad como una proteasa de aspártico (Hurley et al., 2000). Las proteasas de aspártico, anteriormente conocidas como proteasas ácidas, comprenden un gran grupo de enzimas que presentan un alto grado de similitud en la secuencia de aminoácidos y en su estructura tridimensional. Los miembros de esta familia incluye a la pepsina, la quimosina y la proteasa HIV (Hurley et al., 2000).

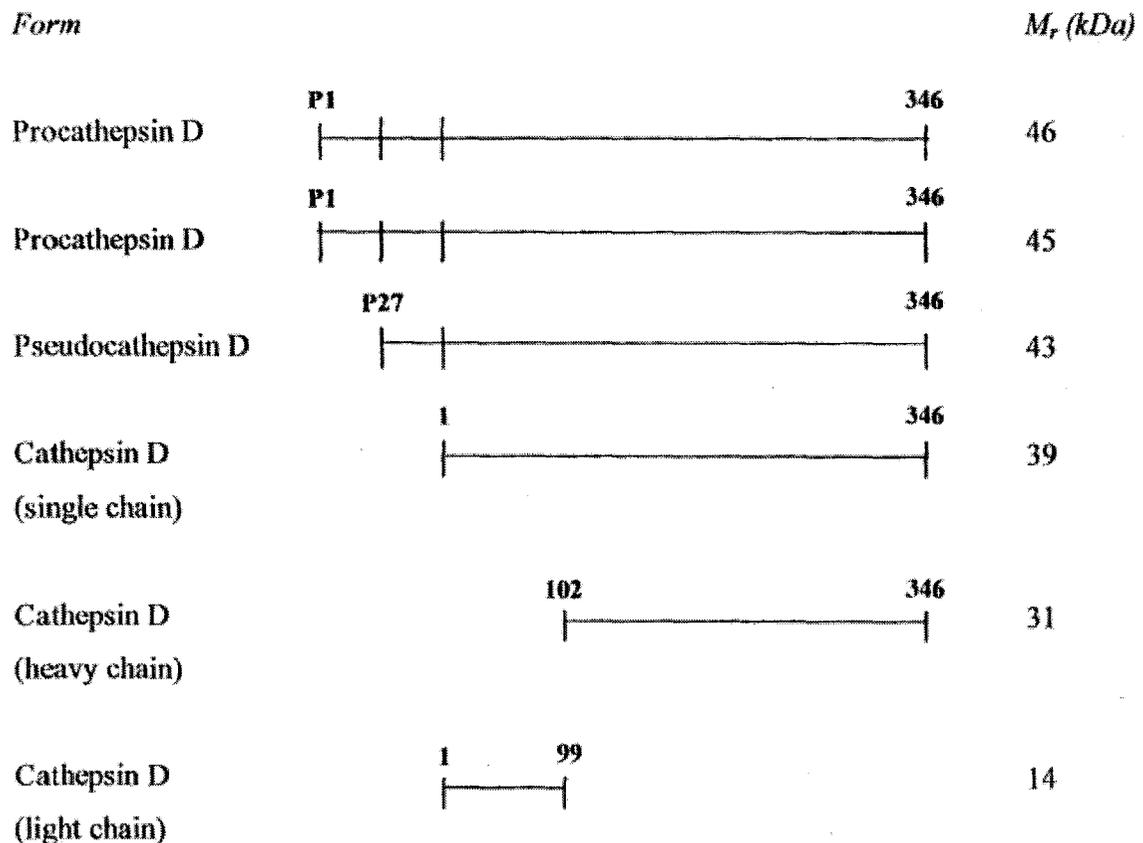


Figura 1. Formas moleculares de la catepsina D que se han identificado en la leche bovina. Las formas de Procathepsina D se encuentran inactivas, mientras que las otras formas son proteolíticamente activas. Tomado de la referencia (Hurley et al., 2000).

La ubicación y el pH ácido de la catepsina D sugieren que la digestión intracelular de proteínas se da en un ambiente ácido proporcionado por el sistema lisosomal (Barrett, 1977).

Estudios en rata han demostrado que las vaso-inhibinas pueden generarse mediante la proteólisis de PRL por catepsina D a través de dos cortes entre la Tyr145 y la Leu146 y entre el Trp148 y la Ser149. La eliminación del tripéptido (Leu-Val-Trp) y la reducción del puente disulfuro intermedio separan a la molécula en dos fragmentos, uno N-terminal con una masa de 16 kDa y el otro C-terminal con una masa de 6 kDa (Fig.2) (Andries et al., 1992; Baldocchi et al., 1993).

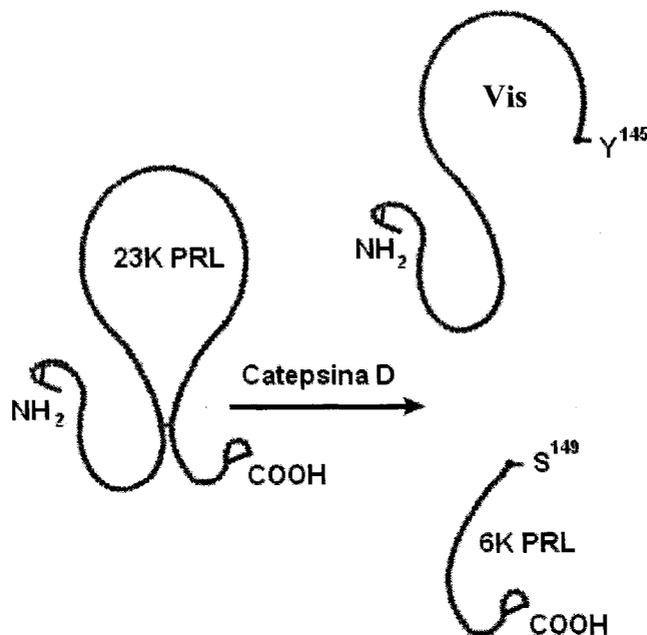


Figura 2. Proteólisis de la PRL a Vasoinhibinas (Vis) por catepsina D. Editado de la referencia (Corbacho et al., 2002).

En el caso específico de la PRL humana, Piwnica y colaboradores (2004) demostraron que la proteólisis por catepsina D genera tres fragmentos N-terminales con pesos de 17, 15 y 11 kDa respectivamente, los cuales presentan actividad antiangiogénica. Como ya se mencionó la actividad de la catepsina D depende de un pH ácido (pH 3.4-5.5), por lo que el procesamiento de la PRL por esta enzima estaría limitado a compartimentos ácidos, como los gránulos de secreción de las células hipofisarias durante el almacenamiento y liberación de la hormona (Clapp et al., 2006) o el medio extracelular que caracteriza a los procesos inflamatorios o al microambiente tumoral (Cosío et al., 2003). Más recientemente, se demostró que las vasoinhibinas también podían generarse bajo condiciones neutras por acción de metaloproteasas de matriz (MMPs) (Macotella et al., 2006).

1.3.2 Proteólisis de PRL por Metaloproteasas de Matriz

Las MMPs son enzimas proteolíticas que requieren de zinc y calcio para su actividad y actúan a pH neutro. Estas enzimas cortan proteínas de la matriz

extracelular (colágena, laminina, fibronectina, etc), así como otros sustratos que no son constitutivos de la matriz (proteasas, factores de crecimiento, receptores de membrana, citocinas, etc). Las MMPs participan en procesos fisiológicos como la remodelación y desarrollo de los tejidos durante el desarrollo embrionario, la reparación de heridas, la ovulación, la remodelación ósea, la función de células inmunes (macrófagos y neutrófilos), etc. También desempeñan un papel importante bajo condiciones patológicas donde su sobreproducción conlleva a una destrucción aberrante del tejido conjuntivo en padecimientos como la úlcera gástrica, el asma, la arterioesclerosis, la osteoartritis, la artritis reumatoide y la metástasis de células tumorales (Kelly y Jarjour 2003; Vicente y Brinckerhoff 2002; Yoon et al., 2003).

Las MMPs son muy similares en su estructura pero difieren en la especificidad por el sustrato. La familia de las MMPs se divide en: colagenasas 1, 2 y 3 (MMP-1, MMP-8 y MMP-13 respectivamente), gelatinasas A y B (MMP-2 y MMP-9), matrilisina (MMP-7), elastasa de macrófagos (MMP-12), y MMPs de membrana (MT-MMP) 1, 2, 3 y 4 (MMP-14, MMP-15, MMP-16 y MMP-17 respectivamente) (Nagase y Woessner 1999). Las MMPs tienen afinidad proteolítica por todos los componentes de la matriz extracelular del cartílago incluyendo a los proteoglicanos, las colágenas y las glicoproteínas.

La actividad de las MMPs no sólo depende de sus niveles, sino también de modificaciones postraduccionales. Éstas pueden ser secretadas como proenzimas inactivas (pro-MMP) y son activadas por remoción de sus propéptidos amino terminales (Sivak et al., 2002).

La actividad de las MMPs responsable de generar vasoinhibinas a partir de PRL se demostró en los condrocitos articulares, donde se ha propuesto que las vasoinhibinas participan en mantener la avascularidad que caracteriza al cartílago (Macotela et al., 2006). Se reportó que la incubación de PRL de rata con extractos de condrocitos a pH neutro genera predominantemente una vasoinhibina de 17 kDa y en menor nivel de 16 y 14 kDa, mientras que en la PRL humana se generan fragmentos de 17 y 14 kDa. Dicha actividad corresponde a MMPs ya que se bloquea con inhibidores específicos de estas proteasas. Además se mostró que las MMPs puras generan vasoinhibinas a través de un corte entre los aminoácidos Ser155 y Leu156 tanto en la PRL de rata como en la PRL humana (Figura 3) (Macotela et al., 2006). Este sitio de

corte está altamente conservado entre las especies (Macotela et al., 2006) lo que sugiere su relevancia funcional. Si bien algunas MMP como la MMP-8 y la MMP-13 son muy eficientes para generar vaso inhibinas también lo son para su degradación, mientras que otras como la MMP-3, la MMP-9 y la MMP-2 requieren de mayores concentraciones para generar vaso inhibinas y son menos capaces para degradarlas (Macotela et al., 2006).

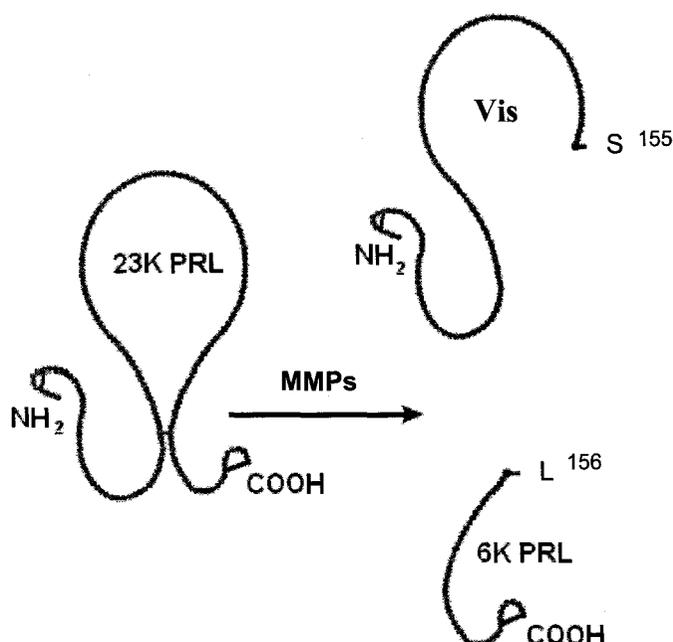


Figura 3. Proteólisis de la PRL a Vaso inhibinas (Vis) por metaloproteasas de matriz (MMPs). Editado de la referencia (Corbacho et al., 2002).

1.3.3 Vaso inhibinas endógenas

Las vaso inhibinas, han sido identificadas en el suero, el líquido amniótico (LA), el ojo (córnea y retina), el cartílago, la glándula pituitaria anterior y posterior, así como en distintos tipos celulares como las células endoteliales y los fibroblastos (Clapp et al 2006; Corbacho et al., 2000a; Corbacho et al., 2000b). Las vaso inhibinas funcionan como agonistas débiles del receptor de la PRL en bioensayos como los del buche del pichón, de las células Nb2 (línea celular derivada de un linfoma murino), y de la glándula mamaria, y este débil efecto se asocia con su reducida afinidad por el receptor

de PRL en los diferentes tejidos (Clapp et al., 1998). Sin embargo, la relevancia funcional de las vasoinhibinas radica en que ejerce un efecto nuevo no presente en la PRL íntegra, que es el de inhibir la angiogénesis (D'angelo et al., 1999).

La amplia distribución de las vasoinhibinas sugiere que estos péptidos pueden ejercer sus efectos antiangiogénicos e inhibitorios de la función vascular a través de acciones sistémicas y locales (autocrinas y paracrinas).

2. ANTECEDENTES

2.1 La Placenta

La palabra placenta se deriva del griego “plakoenta” que significa superficie plana. Mossman en 1991 describió a la placenta como una aposición o una fusión de las membranas fetales a la mucosa uterina que tiene como propósito el intercambio fisiológico entre ambas. Efectivamente, la placenta es una interfase compleja y dinámica entre los tejidos embrionarios y maternos. Entre las principales funciones de la placenta están la transferencia de nutrientes de la madre al feto, la eliminación de desechos del feto, la protección del feto contra agentes patógenos, así como la transmisión del sistema inmunológico de la madre al feto y la producción de hormonas necesarias para el desarrollo del embarazo y la fisiología del feto (Vatish et al., 2006).

El desarrollo normal de la placenta depende en gran medida de la diferenciación e invasión de los trofoblastos, su principal componente celular que se origina a partir del ectodermo del blastocisto en el embarazo temprano. Durante este proceso de diferenciación e invasión, los trofoblastos se dividen rápidamente, para posteriormente formar una interfase entre la madre y el embrión, mientras otra subpoblación de trofoblastos invade la decidua para remodelar las arterias espirales en la pared uterina y así regular la expansión del tejido extraembrionario y aumentar el flujo sanguíneo a la placenta y al producto (Straszewski-Chavez et al., 2005). Los trofoblastos se pueden dividir en dos poblaciones, los que forman parte de la placenta fetal (microvellosidades del corion) y los trofoblastos invasivos que penetran en la

pared uterina (placenta materna) e invaden y sustituyen al endotelio vascular de las arterias uterinas (trofoblastos invasivos). Los trofoblastos de las microvellosidades coriónicas están constituidos por células mononucleadas y por células que funden su citoplasma para dar lugar a una masa celular multinucleada (el sinciotrofoblasto). El sinciotrofoblasto está en contacto directo con la sangre materna (Mayhew 2001). Los citotrofoblastos invasivos remodelan los vasos sanguíneos uterinos para lograr el adecuado abastecimiento de sangre al feto. Estos trofoblastos se subdividen en dos poblaciones: los intersticiales y endovasculares. Mientras los trofoblastos intersticiales invaden el intersticio, o la pared del útero, los trofoblastos endovasculares se infiltran y transforman las arterias espirales, y de este modo incrementan los nutrientes y el flujo sanguíneo materno a la placenta (Kaufmann et al., 2003). Evidencias recientes sugieren que la transformación de las arterias espirales es mediada por la inducción de apoptosis de las células endoteliales que recubren el lumen. Además, parece que la señal proapoptótica es emitida por los trofoblastos invasores (Straszewski-Chavez et al., 2005).

Durante el embarazo, la cantidad de material apoptótico que es desechado desde el sinciotrofoblasto hacia la circulación materna es considerable, particularmente hacia el final de la gestación (Huppertz et al., 2004). Los trofoblastos son portadores de antígenos paternos, los cuales son antigénicamente extraños para el sistema inmune materno y si son liberados, como resultado de la muerte celular, pueden iniciar o acelerar una respuesta inmune que puede tener consecuencias letales para el feto. Por lo tanto, la forma apropiada de remover los trofoblastos muertos antes de liberarse su contenido intracelular es fundamental para la prevención del daño tisular y el rechazo del feto. Además los propios antígenos pueden ser liberados desde las células del endotelio apoptótico y del músculo liso vascular durante el proceso de la transformación de las arterias espirales, que aunque genéticamente esto no tiene problema, puede inducir una respuesta inmune inapropiada. La eliminación de las células apoptóticas es mediada en forma efectiva por macrófagos tisulares o por monocitos circulantes en la sangre de la periferia (Straszewski-Chavez et al., 2005).

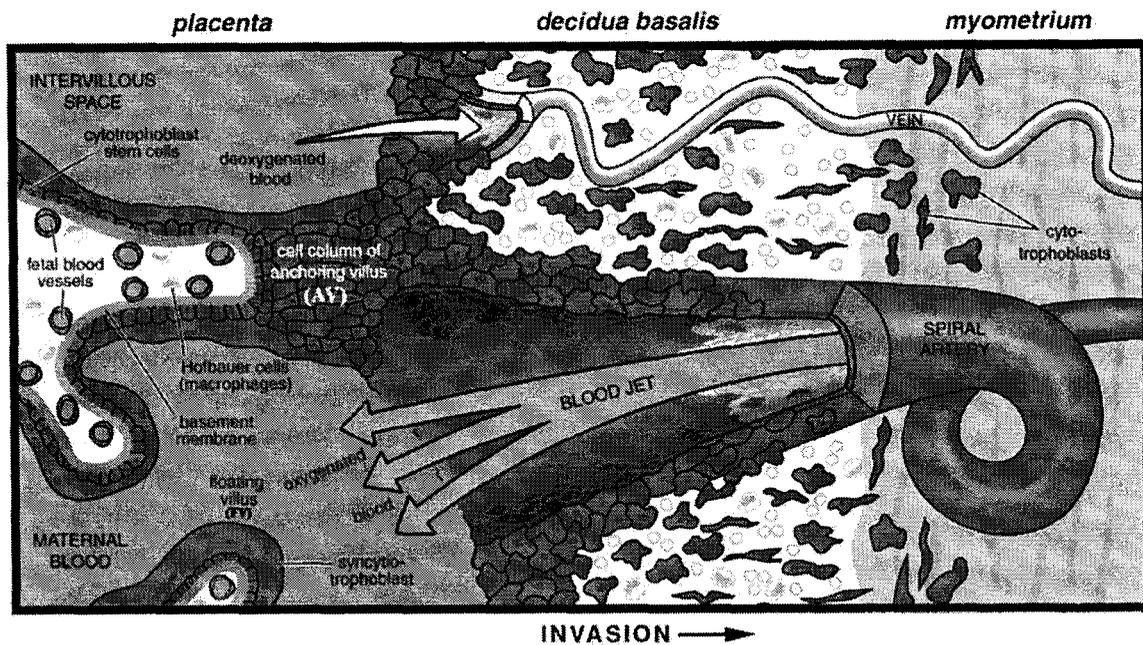


Figura 4. Invasión de trofoblastos a las arterias uterinas. Editado de la referencia (Zhou et al., 2003).

2.2 Preeclampsia

La preeclampsia se caracteriza por la presencia de hipertensión y proteinuria a partir de la semana 20 del embarazo (Roberts et al., 2001; Sibai et al., 2005). Aunque se desconoce el origen de esta enfermedad, se ha propuesto que se desencadena a partir de factores presentes en la placenta capaces de alterar la función del endotelio vascular de la interfase feto-materna y de la circulación sistémica materna (Lam et al., 2005; Sibai et al., 2005). Al respecto se sabe que la placentación requiere que el citotrofo blasto embrionario invada las arterias espirales uterinas, elimine sus capas elásticas y sustituya al endotelio vascular. Esta remodelación se traduce en una marcada dilatación del sistema arterial útero-placentario, lo que aunado a la angiogénesis local, incrementa masivamente el flujo sanguíneo a la placenta logrando la irrigación necesaria para el desarrollo de la unidad feto-placentaria (Fig. 4) (Kliman 2000; Lam et

al., 2005; Roberts et al., 2001). En la preeclampsia, la invasión del citotrofoblasto es defectuosa, se mantiene la alta resistencia de las arterias uterinas y no se permite la perfusión adecuada de la placenta. El menor flujo sanguíneo genera cuadros de estrés oxidativo que favorece la secreción de factores placentarios capaces de inhibir la angiogénesis y estimular el tono vascular (Fig. 5) (Kliman 2000; Lam et al., 2005; Roberts et al., 2001). La deficiente vascularización interfiere con el desarrollo adecuado de la placenta y, por ende, con el crecimiento fetal. Por su parte, la alteración en la regulación del endotelio vascular de la madre conduce a la hipertensión y a fallas en la función renal, que resultan en proteinuria (Lam et al., 2005; Sibai et al., 2005).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el factor angiogénico y de vasodilatación más importante en la placenta (Lam et al., 2005). Las acciones del VEGF son parcialmente mediadas por la producción de NO derivado del endotelio (Fukumura et al., 2001). El NO es un gas altamente reactivo que cuando se produce en las células endoteliales por acción de la eNOS promueve la proliferación endotelial, la vasorelajación, y la permeabilidad vascular (Walford et al., 2003; Ziche y Morbidelli 2000). El decremento en los niveles de VEGF y NO no sólo se han visto durante el desarrollo de la preeclampsia ya diagnosticada, sino también antes de la presencia de los síntomas clínicos (Levine et al., 2004; Maynard et al., 2003; Polliotti et al., 2003; Tranquilli et al., 2004). La placenta de pacientes con preeclampsia secreta a la forma soluble del receptor del VEGF (sFlt-1), que es un antagonista natural del VEGF y la sobre-expresión de sFlt-1 en la rata induce hipertensión y proteinuria (Maynard et al., 2003). Asimismo, la inhibición de la eNOS en modelos experimentales produce hipertensión, proteinuria y retraso en el crecimiento fetal (Vatish et al., 2003). Por lo que el decremento de VEGF y NO en la placenta compromete la angiogénesis placentaria y conduce a las manifestaciones clínicas de la preeclampsia (Fukumura et al., 2001; Lowe 2000; Podjarny et al., 2004; Walford et al., 2003) sugiriendo que la inhibición del VEGF y del NO son causa de dicho padecimiento.

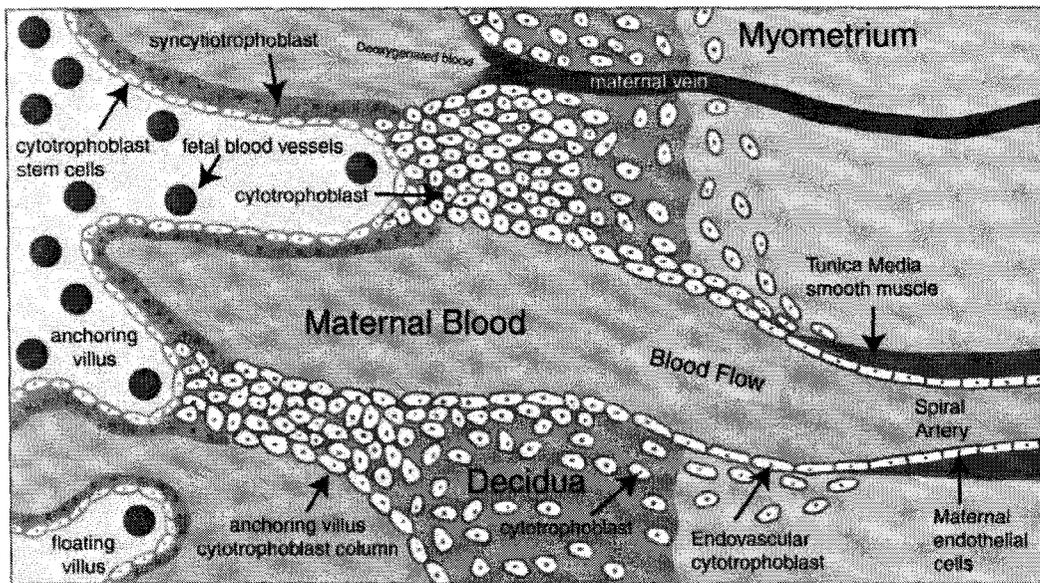


Figura 5. Placentación normal. Invasión normal de los trofoblastos a la decidua uterina (Lam et al., 2005).

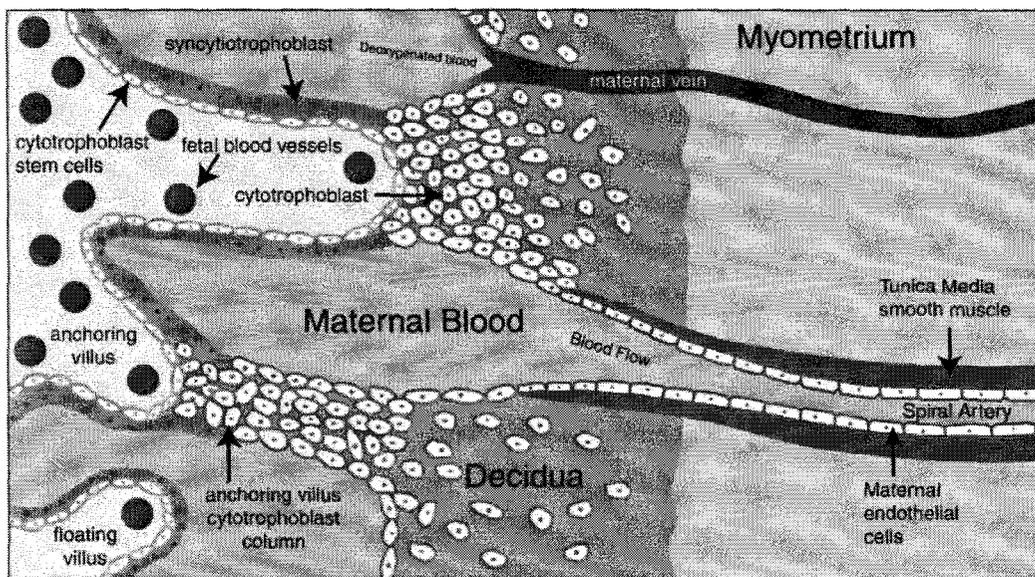


Figura 6. Placentación deficiente. Menor invasión de los trofoblastos a la decidua uterina, modelo de preeclampsia (Lam et al., 2005).

2.3 Papel de la PRL y las vasoinhibinas en la Preeclampsia

La PRL es sintetizada por las células de la decidua uterina, desde donde es transportada al líquido amniótico (LA) (Ben-Jonathan et al., 1996; Maaskant et al., 1996). La prolactina aumenta durante el embarazo tanto en el suero materno como en el fetal, donde alcanza su concentración máxima al final del embarazo; en el líquido amniótico su concentración es por lo menos diez veces mayor que en el suero y es máxima entre las semanas 20 y 24 de la gestación (Ben-Jonathan et al., 1996). Entre los efectos atribuidos a la prolactina durante el embarazo se incluyen la estimulación del desarrollo mamario, de la conducta maternal, y de la secreción de progesterona y de insulina, así como la modulación de la activación de células inmunes y la regulación del volumen y concentración iónica del líquido amniótico (Ben-Jonathan et al., 1996; Soares et al., 1998). Por otra parte, se sabe que la PRL puede ser modificada proteolíticamente por catepsina-D o por metaloproteasas de matriz, hacia vasoinhibinas con acciones antiangiogénicas, vasoconstrictoras y promotoras de la regresión vascular (Clapp et al., 2006; Martini et al., 2000). Las vasoinhibinas actúan directamente sobre las células endoteliales, que son las células que conforman los vasos sanguíneos, bloqueando el efecto del VEGF sobre la activación de la eNOS (Clapp et al., 1993; Ferrara et al., 1991; Tabruyn et al., 2003). Por lo tanto, la sobreproducción de vasoinhibinas a partir de la PRL podría contribuir al desarrollo de la preeclampsia.

La participación de la prolactina en la preeclampsia se propuso hace más de 30 años en función de su marcada presencia en el embarazo y de sus acciones cardiovasculares (Ben-Jonathan et al., 1996) y osmorregulatorias (Freeman et al., 2000). Se tiene evidencia de que la PRL estimula la retención de agua y sodio por el riñón (Horrobin 1975) y que tiene efectos vasoconstrictores (Clapp et al., 2006). Estos últimos son controversiales y podrían estar mediados por su proteólisis hacia vasoinhibinas (Clapp et al., 2006). Sin embargo, los estudios realizados en pacientes con preeclampsia fueron controversiales ya que mostraron que la prolactina estaba elevada, normal o disminuida en el suero materno, en el líquido amniótico e inclusive en la decidua de mujeres preeclámpticas (Golander et al., 1985; Luciano et al., 1984; Ranta et al., 1980). El tema dejó de explorarse, a pesar de que gran

parte de esta controversia se podía explicar por diferencias en las características clínicas de las pacientes y en las etapas del embarazo. Además, en esos estudios no se valoraron a las vasoinhibinas, que por sus propiedades funcionales claramente podrían contribuir a la preeclampsia.

En apoyo a que la prolactina es procesada a vasoinhibinas por la placenta, se ha detectado la presencia de fragmentos de prolactina en el líquido amniótico (Fukuoka et al., 1991; González et al., 2006) y en el suero de mujeres embarazadas (Sinha 1995). Además, la catepsina-D, una de las proteasas que genera a las vasoinhibinas a partir de la prolactina está altamente concentrada en la interfase decidua-placentaria (Earl et al., 1989); y las metaloproteasas de matriz (MMPs), enzimas que también generan a las vasoinhibinas (Macotela et al., 2006), participan en la placentación a través de promover la angiogénesis (Kliman 2000) y regular el tono vascular. De hecho, se ha mostrado que MMPs modifican proteolíticamente a la endotelina hacia una isoforma con acciones vasoconstrictoras muy potentes (Fernandez-Patron et al., 1999), y algo similar podría ocurrir con la prolactina en la placenta. Finalmente, en apoyo a que las vasoinhibinas pueden influir sobre la preeclampsia, resultados de nuestro grupo, mostraron que las vasoinhibinas están elevadas en el líquido amniótico (LA), en el suero y en la orina de pacientes preeclámpticas al final del embarazo (Gonzalez et al., 2007). Además, se observó que el LA de mujeres preeclámpticas, pero no el de embarazos normales, inhibe la proliferación y la producción de NO inducida por el VEGF en células endoteliales de la vena umbilical, y que estos efectos se bloquean en presencia de anticuerpos anti-vasoinhibinas (Gonzalez et al., 2007). Por lo tanto, es posible que el LA de pacientes preeclámpticas sea antiangiogénico y vasoconstrictor, probablemente debido a vasoinhibinas producidas por la placenta a partir de la PRL producida en la decidua. En apoyo a las posibles implicaciones funcionales de un incremento en los niveles de vasoinhibinas en la preeclampsia, se observó una correlación directa entre los niveles de PRL/vasoinhibinas en el LA y las propiedades antiangiogénicas del LA. Asimismo, se encontró una correlación significativa inversa entre el efecto antiangiogénico del LA, la concentración de PRL/vasoinhibinas y el peso de los recién nacidos. Es decir, en la preeclampsia el peso de los recién nacidos fue menor mientras mayor fue la actividad antiangiogénica y la concentración

de PRL/vasoinhibinas en el LA. Esto sugeriría que las vasoinhibinas participan en la disfunción endotelial y en el bajo peso del neonato, que son característicos de la preeclampsia (Gonzalez et al., 2007).

El crecimiento intrauterino restringido (IUGR, por sus siglas en inglés) es otro síndrome que afecta el peso fetal. El IUGR se caracteriza por un tamaño del producto menor a la percentila 10, que se mide a través de evaluar el flujo sanguíneo de las arterias uterinas mediante ultrasonido "doppler", en cualquier etapa del embarazo pero particularmente a partir del segundo trimestre. La etiología del IUGR se desconoce pero se acepta que entre sus causas se incluyen deficiencias en la vascularización de la placenta (Pardi et al., 2002). Si bien un menor peso al nacer puede tener lugar en la preeclampsia, en las pacientes con IUGR no se presenta síntomas característicos de preeclampsia como son la hipertensión y la proteinuria. Dado que tanto la preeclampsia como el IUGR se asocian con una vascularización deficiente de la placenta y que en la preeclampsia se presenta una correlación inversa entre los niveles de PRL/vasoinhibinas en el LA y un menor peso al nacimiento (Gonzalez et al., 2007), se genera la pregunta de ¿si las vasoinhibinas también podrían influir sobre la etiología de la IUGR?, y por ende, ¿si los niveles de las vasoinhibinas pudieran verse afectados en la IUGR?

3. JUSTIFICACIÓN

En base a todas estas consideraciones, proponemos que las vaso inhibinas regulan la vascularización de la placenta durante el embarazo, y por lo tanto, que un desequilibrio a favor de la producción de vaso inhibinas en la placenta de mujeres preeclápticas pudiera contribuir a frenar la angiogénesis y el flujo sanguíneo necesarios para una placentación adecuada. Debido a esto es importante estudiar la generación de vaso inhibinas en la placenta de mujeres preeclápticas. Además, es importante determinar si una sobreproducción de vaso inhibinas se asocia selectivamente a la preeclampsia o también tiene lugar en la IUGR cuya etiología parece involucrar deficiencias en la vascularización de la placenta. En este estudio se investigó por una parte si las vaso inhibinas se generan por acción de catepsina D y de MMPs presentes en la placenta de mujeres preeclápticas; y por otra parte, se compararon los niveles de vaso inhibinas en la orina de mujeres preeclápticas y de mujeres con IUGR.

4. HIPÓTESIS

a) Existe una mayor generación de vaso inhibinas a partir de la proteólisis de PRL por catepsina-D y/o MMPs en los trofoblastos placentarios de mujeres preeclámpticas en comparación con mujeres normales.

b) La concentración de vaso inhibinas aumenta en la orina de las mujeres con preeclampsia y con IUGR.

5. OBJETIVOS

a) Determinar si la incubación de PRL con extractos de trofoblastos aislados de placentas de pacientes preeclámpticas o con un embarazo normal genera vaso inhibinas a partir de PRL. Investigar si la actividad proteolítica responsable de la generación de vaso inhibinas se bloquea por acción de inhibidores de la catepsina D y las MMPs y si ambos tipos de proteasas se incrementan en los extractos de trofoblastos durante la preeclampsia.

b) Determinar la concentración de prolactina y vaso inhibinas en la orina de mujeres con preeclampsia, con IUGR, y con un embarazo normal.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Población de Estudio

El estudio se llevó a cabo utilizando trofoblastos y muestras de orina provenientes de mujeres normales y preeclámpticas obtenidas al final del embarazo por los grupos de los Drs. Adalberto Parra y Jorge Ramírez del “Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes” en la ciudad de México. Además, se incluyeron muestras de orina de mujeres con IUGR atendidas en el mismo hospital. Las muestras de orina (5 ml) se tomaron entre las 8 y 12 horas del día antes de la cirugía por cesárea. En todos los casos, las muestras obtenidas fueron clarificadas por centrifugación (10,000 X g) y los sobrenadantes distribuidos en alícuotas y congelados a -70°C.

La preeclampsia se define operacionalmente como la presencia de niveles de presión sanguínea superiores a 140/90 mmHg en por lo menos dos determinaciones consecutivas y proteinuria de al menos 300 mg en orina de 24 hrs de acuerdo a los criterios de la Norma de Preeclampsia del Instituto Nacional de Perinatología. Por su parte, la IUGR se define a través de valores menores a la percentila 10 en el flujo sanguíneo de las arterias uterinas detectados en el ultrasonido “doppler” a partir del segundo trimestre del embarazo. Ninguna de las pacientes con IUGR presentó hipertensión y proteinuria.

6.2 Corte de PRL a partir de Trofoblastos.

- 1) Obtención de Trofoblastos Placentarios. Los trofoblastos placentarios fueron extraídos de placentas con adherencias de membranas fetales y decidua, mantenidos en refrigeración por un tiempo ≤ 1 hora de su obtención. Las muestras de trofoblastos fueron congeladas y almacenadas a -70 °C. Los trofoblastos se lisaron en un amortiguador de lisis a pH 7 (0.5% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 μ g/ml

aprotinina, y 100 µg/ml fluoruro de fenilmetilsulfonilo, pH 7) mediante un homogenizador de vidrio seguido de Polytron PT 10-35 (Kinematica, Switzerland) en tres sesiones de 5 segundos cada una en el nivel 5. El lisado resultante fue utilizado para el análisis de la proteólisis de PRL en condiciones ácidas. Para el análisis en condiciones neutras, este lisado fue centrifugado a 13 rpm por 6 min a 4°C y se usó el sobrenadante.

- 2) Análisis de la proteólisis de PRL. La actividad enzimática capaz de procesar a la PRL hacia vasoinhibinas se analizó de acuerdo al siguiente método. Se utilizaron distintas concentraciones de extractos de trofoblastos (0.25, 0.5, 5, 10 y 25 µg) y se incubaron en un amortiguador de incubación neutro (Tris 50 mM, NaCl 150 mM y CaCl₂ 10 mM a pH 7) o en un amortiguador de citrato-fosfato 0.1M a pH 5.5, con 150 mM de NaCl, en presencia de 200 ng de PRL (estándar biológico suministrado por los Institutos Nacionales de Salud de EUA) en un volumen final de 20 µl. Las incubaciones se realizaron durante 24 hrs a 37°C en agitación. La actividad enzimática se caracterizó mediante el uso del inhibidor de MMPs, galardina (10 µM) o del inhibidor de catepsina D, pepstatina A (1.4 µM). Los productos del corte de la PRL se analizaron mediante Western blots en condiciones reductoras.

6.3 Western-blots.

Los productos de la proteólisis de la PRL se analizaron en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones reductoras y desnaturalizantes. Se utilizaron los 20 µl de la reacción de corte (conteniendo 200 ng de PRL) y se mezclaron con 8 µl de amortiguador de Laemli 2X. Después del SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon con 5% de leche descremada (BioRad) durante 2 hrs, y se incubaron con los anticuerpos policlonales anti PRL humana que fueron generados en nuestro laboratorio y purificados de acuerdo al método descrito (Dueñas et al., 1999). Estos anticuerpos se utilizaron a una dilución de 1:500, y se incubaron toda la

noche a temperatura ambiente. Al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS Tween20 al 0.5% y se incubaron durante 1 hr con los anticuerpos secundarios (Jackson Immunoresearch labs, Inc.) anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina diluido 1:5,000 o con el anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa diluido 1:5,000. Las membranas se lavaron 3 veces. La reacción se reveló mediante anticuerpos secundarios acoplados a fosfatasa alcalina y el uso de un estuche comercial (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California).

También se valoró la presencia de catepsina D y de MMPs en los extractos de trofoblastos para lo cual se utilizaron geles de acrilamida al 7.5% (SDS-PAGE), y anticuerpos de cabra anti-MMP-13 y MMP- 8 (Santa Cruz, CA, USA) ó de conejo anti-MMP-2, MMP-3 y MMP-9 (Sigma, St Louis, MO, USA). La catepsina D se detectó utilizando el anticuerpo de cabra anti-catepsina D (Santa Cruz, CA, USA). El complejo antígeno-anticuerpo se reveló utilizando anticuerpos secundarios (1:5000) anti-conejo ó anti-cabra acoplados a fosfatasa alcalina y el estuche comercial. La densidad óptica será determinada utilizando el software 1D image analysis versión 3.5 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA).

6.4 Determinación inmunológica de vaso inhibinas y de PRL en orina de mujeres embarazadas normales, preeclámpticas y con IUGR:

- 1) Inmunoprecipitación-Western blot. Las vaso inhibinas fueron evaluadas a través de la inmuno-precipitación a partir de la incubación de 700 µl de las muestras de orina durante toda la noche, usando 5 µl del anticuerpo policlonal anti-prolactina humana (RIA NIH), seguido por la incubación con proteína A sefarosa (35 µl/ml) durante 2 horas. El análisis del inmunoprecipitado se llevó a cabo en geles de poli acrilamida al 15% bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE), su transferencia a membranas de PVDF y su revelado con el uso de un anticuerpo anti-prolactina humana desarrollado en nuestro laboratorio y un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los anticuerpos y los procedimientos técnicos han sido verificados y descritos previamente por nosotros (Dueñas et al., 2004, Corbacho et al., 2000a).

Este ensayo permite distinguir entre las prolactinas y las vasoinhibinas en función de sus diferentes masas moleculares y estimar sus concentraciones a través del análisis densitométrico de las proteínas inmunorreactivas respectivas.

- 2) Ensayo inmunoenzimático (ELISA): Se utilizó un ELISA comercial para la cuantificación de prolactina humana en las muestras de orina (DSL-10-4500 ACTIVE® Prolactin ELISA, Diagnostic Systems Laboratorios, Inc., Texas, USA).

7. RESULTADOS.

7.1 Análisis del procesamiento proteolítico de la PRL por catepsina D presente en trofoblastos de mujeres con preeclampsia.

Para investigar la generación de vasoinhibinas por trofoblastos aislados de placentas normales y de placentas de mujeres con preeclampsia se incubó una preparación pura de prolactina humana con diferentes concentraciones de proteína de extractos de trofoblastos. Las incubaciones se llevaron a cabo a un pH ácido (5.0) durante 24 h a 37 °C. Bajo estas condiciones se observó que la PRL fue procesada a fragmentos de 14 y 8 kDa, en forma dependiente a la concentración de proteína de los trofoblastos (Fig. 7A). Los niveles de estos fragmentos se cuantificaron a través de sumar los valores densitométricos de ambas bandas y expresarlos en relación al valor densitométrico de la banda de PRL incubada en ausencia de trofoblastos (Fig. 7B). Los resultados mostraron que la generación de fragmentos de prolactina era significativamente mayor cuando se emplearon homogenados de trofoblastos de mujeres con preeclampsia (Fig. 7B). La proteasa responsable del corte de la prolactina podría ser catepsina D, ya que se sabe que esta enzima genera fragmentos de masas similares a partir de la PRL humana (Macotela et al., 2006; Piwnica et al., 2004). Además, en trabajos anteriores se reportó que la catepsina D es expresada en la decidua y que ésta puede actuar bajo las condiciones ácidas debidas a la hipoxia que se presenta en la placenta durante la preeclampsia (Moses et al., 1999). Para determinar si la proteólisis de la PRL bajo condiciones ácidas es debida a catepsina D, se adicionó pepstatina-A, un inhibidor de la actividad de la catepsina D, a la mezcla de incubación. Los resultados mostraron que la pepstatina A previene el procesamiento proteolítico de la prolactina bajo condiciones ácidas, indicando que la enzima responsable de dicho procesamiento es la catepsina D (Fig. 7A y 7B).

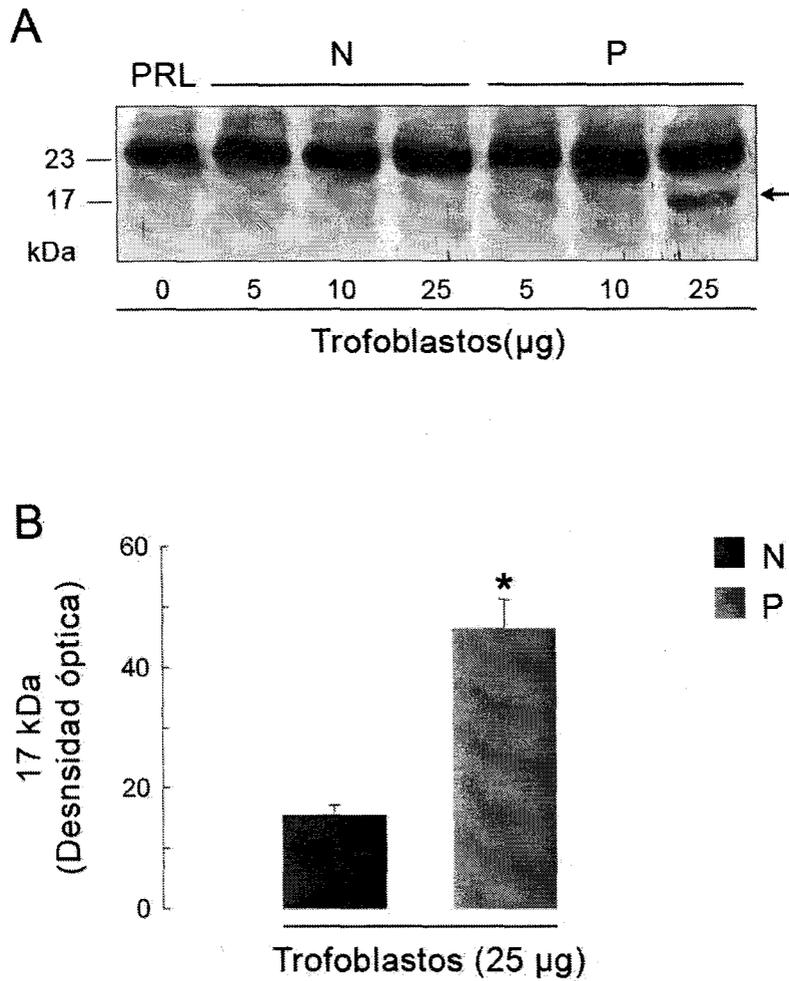


Figura 9. (A) Análisis por Western blot de la actividad enzimática presente en trofoblastos de placentas provenientes de mujeres con embarazos normales (N) o de mujeres preeclámpticas (P) capaz de procesar proteolíticamente a la PRL a pH neutro, 200 ng de prolactina humana fueron incubados a pH 7 con distintas concentraciones de trofoblastos. (B) Los valores densitométricos de la banda de 17 kDa observada bajo la incubación con trofoblastos de pacientes P se expresaron con respecto al valor densitométrico de la banda de 23 kDa de PRL incubada en ausencia de trofoblastos. Los valores son promedios \pm EE de tres experimentos independientes. (n=3)

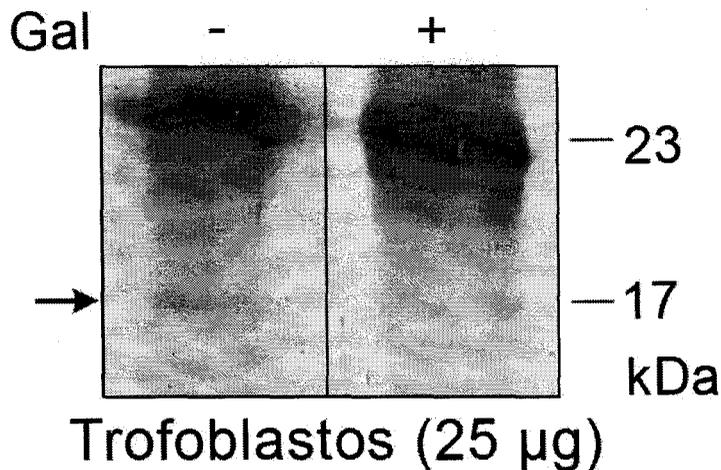


Figura 10. Análisis por Western blot de la actividad de MMPs, capaz de generar vasoinhibinas a partir de PRL, presente en trofoblastos de placentas provenientes de mujeres preeclámpticas. 200 ng de prolactina humana fueron incubados a pH neutro (pH 7) con 25 µg de proteína de los homogenados de trofoblastos en ausencia o presencia del inhibidor específico de MMPs, galardina (Gal).

Para determinar si el procesamiento hacia vasoinhibinas involucra a las MMPs 9, 13 y 2, investigamos los niveles de dichas MMPs en los trofoblastos de mujeres con preeclampsia y de mujeres con embarazos normales mediante Western blots. Encontramos que la concentración de la MMP-9 aumenta en mujeres con preeclampsia con respecto a mujeres con embarazos normoevolutivos (Fig. 11A) y que este aumento es función de la concentración de proteína de los trofoblastos (Fig. 11B). Esta diferencia fue significativa cuando se compararon los promedios de los valores densitométricos de muestras independientes incubadas con la concentración mas alta de proteína (Fig. 11C).

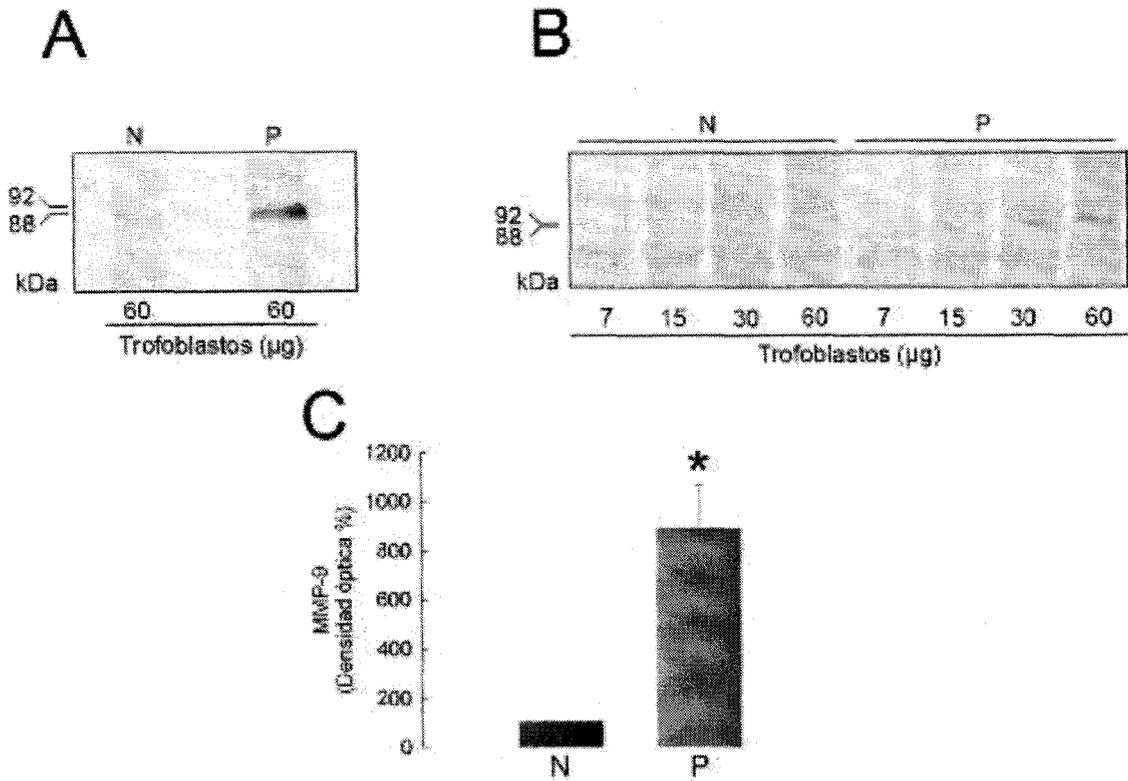


Figura 11. (A) Análisis por Western blot de los niveles de MMP-9 presentes en extractos de trofoblastos aislados de mujeres con embarazos normales (N) y de mujeres preeclámpticas (P). (B) Niveles de la MMP-9 en función de la concentración de proteína en la muestra. (C) Promedios \pm el error estándar de los valores densitométricos de la banda correspondiente a la MMP-9 en P expresados con respecto al valor correspondiente de N. (n=3)

La MMP-13 está presente en los extractos de trofoblastos de mujeres embarazadas normales y preeclámpticas (Fig. 12A). La valoración densitométrica no mostró diferencias entre ambas condiciones (Fig.12B).

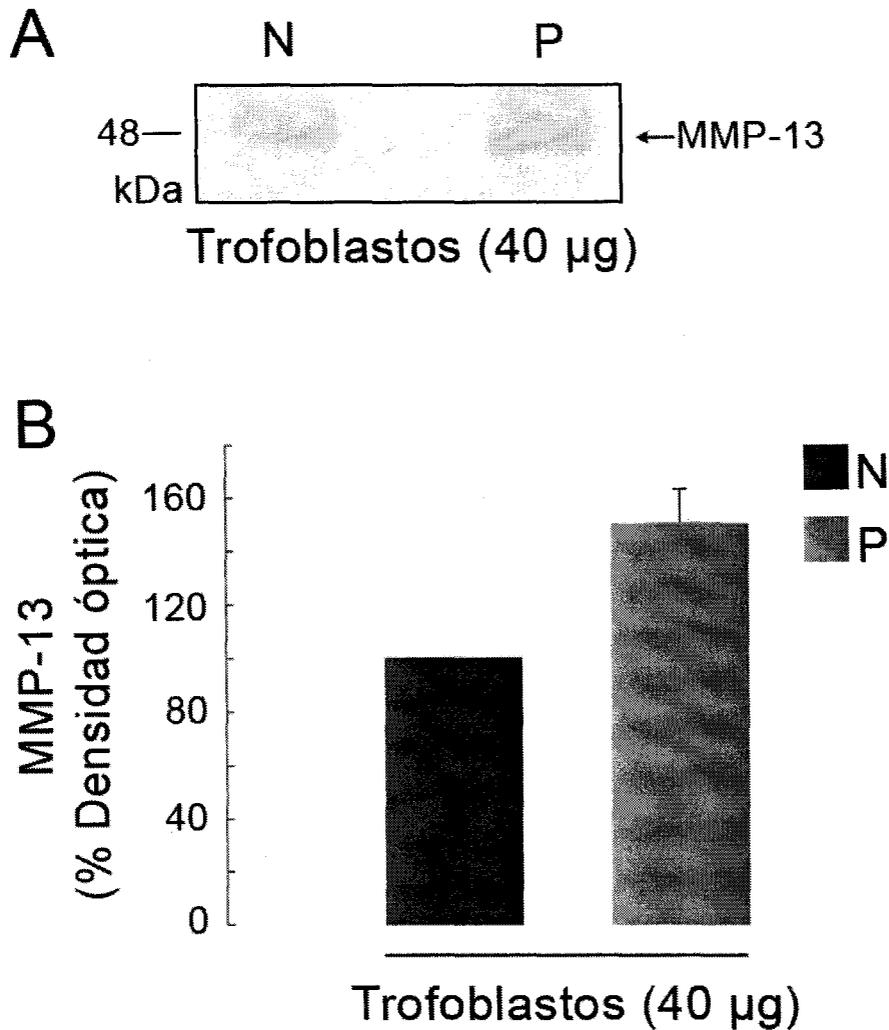


Figura 12. (A) Análisis por Western blot de los niveles de MMP-13 presentes en extractos de trofoblastos aislados de mujeres con embarazos normales (N) y de mujeres preeclápticas (P). (B) Promedios \pm el error estándar de los valores densitométricos de la banda correspondiente a la MMP-13 en P expresados con respecto al valor correspondiente de N. (n=3)

Tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de las formas inactiva (72 kDa) y activa (63 kDa) de la MMP-2 presentes en los extractos de trofoblastos de mujeres con preeclampsia en comparación con los obtenidos de mujeres con embarazos normales (Fig. 13A y 13B).

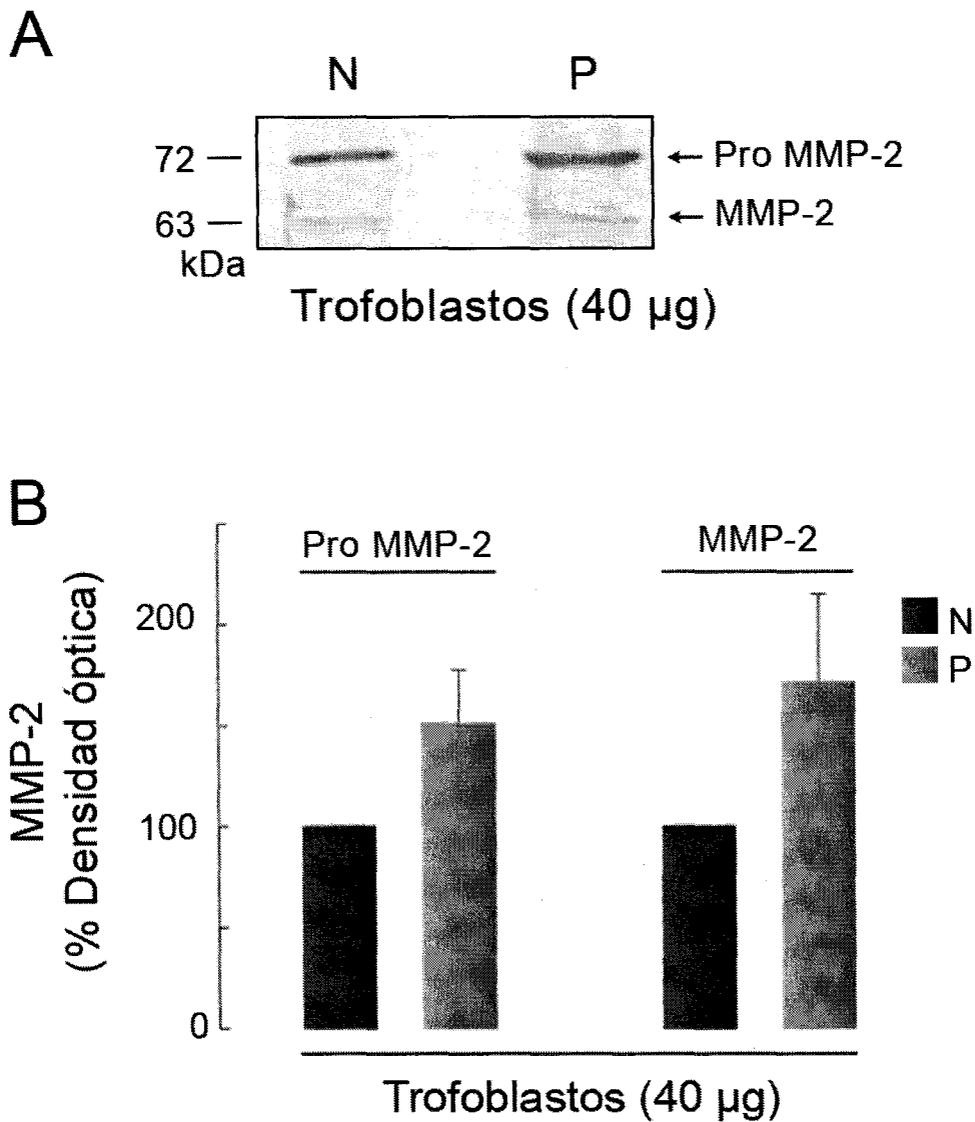


Figura 13. (A) Análisis por Western blot de los niveles de Pro MMP-2 y MMP-2 presentes en extractos de trofoblastos aislados de mujeres con embarazos normales (N) y de mujeres preeclámpticas (P). (B) Promedios \pm el error estándar de los valores densitométricos de las bandas correspondientes a la Pro MMP-2 y a la MMP-2 en P expresados con respecto al valor correspondiente de N. (n=3)

7.3 Análisis de la presencia de vasoinhibinas en la orina de mujeres con preeclampsia y con IUGR.

La inmunoprecipitación seguida de Western blot de muestras de orina de mujeres preeclámpticas mostró la presencia de proteínas tipo vasoinhibinas de 17, 16 y 14 kDa (Fig. 14A). Dichas proteínas están aumentadas en relación a las de las muestras de orina de mujeres con embarazos normales. El aumento en las vasoinhibinas no se observó en el grupo de pacientes con IUGR. Las diferencias fueron significativas cuando se sumaron los valores densitométricos de las tres vasoinhibinas y se promediaron con los respectivos valores de 5 pacientes independientes en cada grupo (Fig. 14B).

Por lo que respecta a la PRL, los Western blots no permitieron su detección debido a que las cadenas ligeras de las IgG utilizadas en la inmunoprecipitación migran a la altura esperada para la hormona (23-25 kDa) (Fig. 14A, punta de flecha). Por lo tanto, se utilizó la técnica de ELISA para cuantificar los niveles de PRL en la orina de los diferentes grupos del estudio. Los niveles excretados en la orina se graficaron en forma independiente entre las cinco sujetos de cada grupo (Figura 15A) y sus promedios no mostraron diferencias significativas (Fig. 15B).

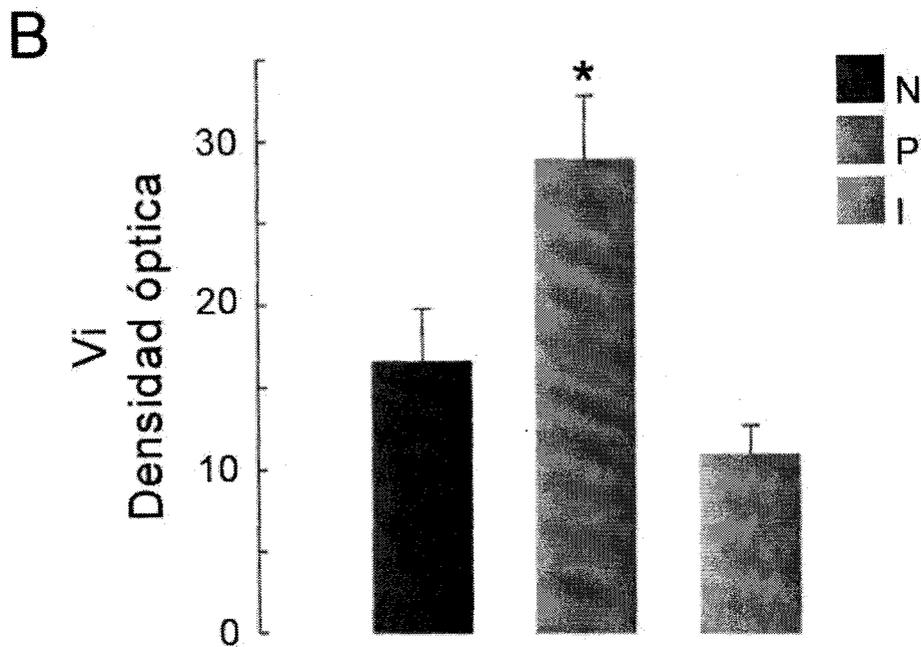
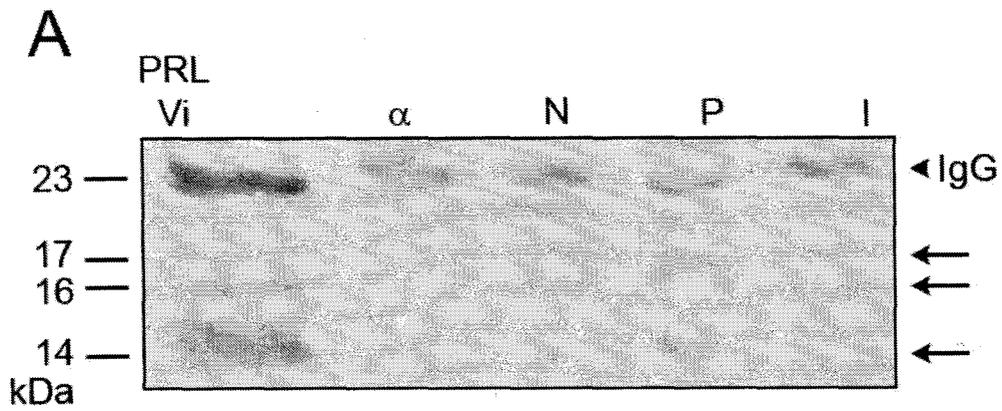


Figura 14. (A) Análisis por Western blot de los niveles de vasoinhibinas presentes en la orina de mujeres con embarazos normales (N), de mujeres preeclámpticas (P) y mujeres con el síndrome IUGR (I). **(B)** Promedios \pm el error estándar de la suma de los valores densitométricos de las bandas correspondientes a las vasoinhibinas en P y en I expresados con respecto al valor de la suma correspondiente de N. (n=5)

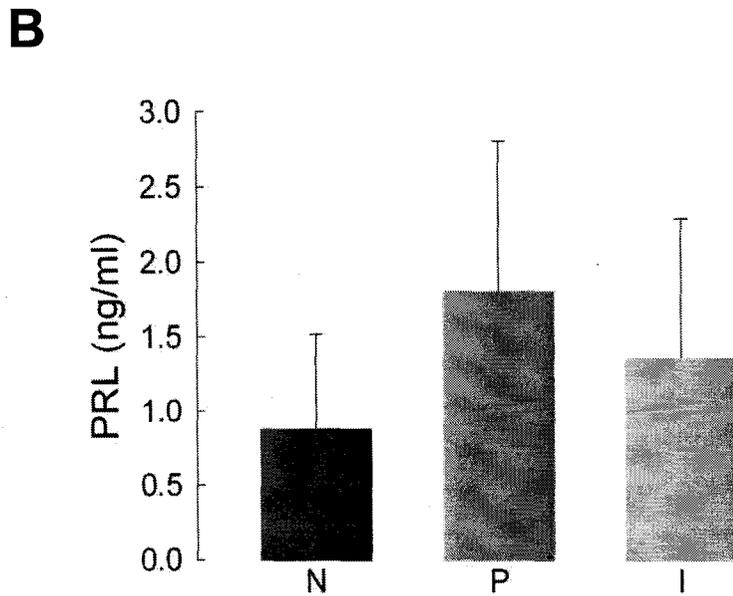
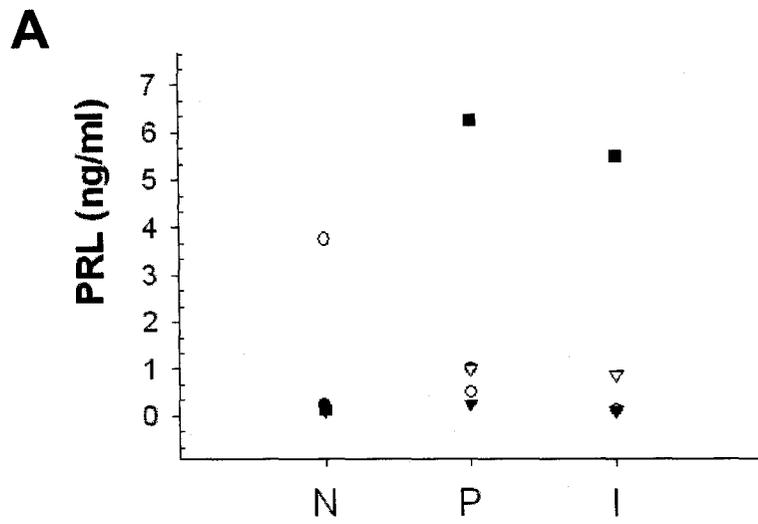


Figura 15. (A) Cuantificación de los niveles de PRL presentes en la orina de mujeres con embarazos normales (N), con preeclampsia (P), y mujeres con el síndrome IUGR (I) por ELISA. **(B)** Promedios \pm el error estándar de la suma de los valores densitométricos correspondientes a PRL obtenidos por ELISA de N, P e I. (n=5)

8. DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la generación de vaso-inhibinas por la placenta y su presencia en la orina en mujeres con preeclampsia. Reportamos un aumento en la concentración y en la actividad generadora de vaso-inhibinas de enzimas del tipo de la catepsina D y de las MMPs en los trofoblastos de placentas de mujeres preeclámpticas. Además, corroboramos el aumento en los niveles de vaso-inhibinas durante la preeclampsia y observamos una aparente selectividad en torno a dicho padecimiento ya que el aumento en la excreción urinaria de vaso-inhibinas no se observó en pacientes con IUGR.

El rol de la PRL en la preeclampsia fue sugerido desde hace 30 años (Horrobin et al., 1977) y se ha vuelto a revisar recientemente (Parra et al., 2002). La osmoregulación (Horrobin et al., 1971) y la hipertensión causadas por la PRL, (Horrobin et al., 1973; Mills et al., 1986) junto con el incremento en la concentración de esta hormona en la sangre materna a lo largo del embarazo y sus niveles altos en el LA, permitieron a los investigadores proponer que un desequilibrio en la regulación de la PRL pudiera contribuir a la patofisiología de la preeclampsia. Ahora, se sabe que una de las principales causas de la preeclampsia es la angiogénesis defectuosa en el desarrollo y formación de la placenta (Lam et al., 2005) y que la PRL puede procesarse proteolíticamente a fragmentos con propiedades antiangiogénicas y vasoconstrictoras (vaso-inhibinas) (Clapp et al., 2006), conocimientos que refuerzan la posibilidad de que la PRL esté involucrada en la generación y progresión de este padecimiento (Parra et al., 2002). Sin embargo, los estudios abocados a investigar la participación de la PRL en la preeclampsia no reportaron cambios significativos en los niveles circulantes de la hormona en la preeclampsia, tanto en las madres como en los fetos (Luciano et al., 1984; Ranta et al., 1980). Tampoco se reportaron cambios en el LA de mujeres preeclámpticas con respecto a las normales (Luciano et al., 1984; Ranta et al., 1980). Estos hallazgos fueron corroborados por un estudio reciente de nuestro laboratorio, donde otra vez, los niveles de PRL no se vieron alterados en la preeclampsia (González et al., 2007). Sin embargo, en nuestro estudio, a diferencia de los

anteriores, se determinaron las vasoinhibinas, y se encontró que estos péptidos se incrementan en la circulación, en la orina, y en el LA de mujeres con preeclampsia (González et al., 2007). Notablemente, también se mostró que las vasoinhibinas del LA inhiben la proliferación y producción de óxido nítrico por células endoteliales en cultivo, lo que apoyó sus propiedades antiangiogénicas y vasoconstrictoras capaces de contribuir a la patofisiología de la preeclampsia (González et al., 2007). Además, se reportó una correlación inversa entre los efectos antiangiogénicos de las vasoinhibinas del LA y el bajo peso al nacimiento durante la preeclampsia (González et al., 2007).

La posibilidad de que las vasoinhibinas del líquido amniótico pudieran interferir con la vascularización y función de la placenta y por ende sobre el desarrollo del producto y su peso al nacer generó la pregunta de si el IUGR, otro padecimiento independiente de la preeclampsia que se caracteriza por el bajo peso del producto a lo largo del embarazo, pudiera también asociarse con altos niveles de vasoinhibinas.

En este proyecto iniciamos el análisis de la pregunta anterior a través de comparar los niveles de vasoinhibinas en la orina de pacientes con IUGR y con preeclampsia. Nuestros hallazgos mostraron que solamente en la preeclampsia y no en la IUGR se encuentran elevadas las vasoinhibinas en la orina. El estudio es aún preliminar porque involucró un número limitado de pacientes. Sin embargo, el resultado no es inesperado dado que una característica de la preeclampsia es la proteinuria y por ello no es de sorprender el encontrar mayores niveles de todas las proteínas incluso de las vasoinhibinas en asociación a dicho padecimiento. Dado que se evaluó la misma concentración de proteína en la orina de cada paciente, la mayor presencia de vasoinhibinas en la preeclampsia probablemente refleja su mayor concentración en la circulación y probablemente su mayor producción por la placenta. Es menester valorar los niveles sistémicos de estos péptidos en la circulación y en el LA de los diferentes grupos en estudio. Este trabajo está en proceso y depende de la limitación en el número de pacientes con IUGR que son atendidos en el Instituto de Perinatología "Isidro Espinoza de los Reyes" con quienes se colabora en el desarrollo de este estudio. Si bien la incidencia de preeclampsia es del 5% de todos los embarazos la de IUGR es del 3-7%.

Nuestro trabajo apoya la mayor producción de vasoinhibinas por la placenta de mujeres preeclámpicas. Encontramos que la catepsina-D de los trofoblastos puede cortar a la PRL hacia vasoinhibinas y que esta actividad se incrementa con la preeclampsia. Además, la mayor actividad probablemente involucra un aumento en la producción de la enzima dado que también observamos mayores niveles de catepsina D y de su precursor procatepsina-D en extractos de trofoblastos provenientes de placentas de pacientes preeclámpicas que en aquellos de mujeres con embarazos normales. La PRL aumenta en la circulación materna durante el embarazo y también es producida por la decidua uterina (Ben-Jonathan N, et al., 2008) de donde es transportada via su receptor al líquido amniótico (Ben-Jonathan N, et al., 2008). Es posible que tanto la PRL circulante como la local sean modificadas hacia vasoinhibinas por efecto de la catepsina D durante la preeclampsia. Al respecto, la actividad de la catepsina D depende de un pH ácido que difícilmente se encuentra presente en el espacio extracelular bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, se ha reportado que la catepsina D se expresa en la interfase decidua-placenta y que condiciones ácidas ocurren localmente en asociación con la hipoxia que se genera en la preeclampsia (Moses et al., 1999). Notablemente, nuestro trabajo también reporta que los trofoblastos de mujeres preeclámpicas contienen MMPs que pueden procesar a la PRL a vasoinhibinas bajo condiciones neutras. Varias son las MMPs que pueden generar a las vasoinhibinas. Nosotros encontramos que la MMP-9 se incrementa considerablemente en los trofoblastos de mujeres con preeclámpsia, mientras que las MMP-2 y la MMP-13 no se alteran en relación al padecimiento. Las MMPs normalmente se secretan o se mantienen ancladas a la superficie externa de la membrana plásmatica desde donde procesan diversos sustratos entre los que se encuentran factores antiangiogénicos como la endostatina (Noel A, et al., 2007) y la angiostatina (Noel A, et al., 2007), factores de crecimiento solubles o embebidos en la matriz extracelular (Mott y Werb, 2004). Cabe mencionar que la PRL puede unirse a conjugados de heparina presentes en la matriz extracelular (Khurana et al 1999b). De tal manera, que PRL soluble o adherida a la matriz extracelular proveniente de la circulación o secretada por la decidua pudiera ser blanco de las MMPs placentarias durante la preeclampsia.

En resumen, nuestros hallazgos sugieren que la catepsina D y las MMPs (probablemente la MMP-9) participan en la generación de vasoinhibinas en la preeclampsia y que dichos péptidos pueden tener una distribución sistémica. Un aspecto esencial para esclarecer la influencia de las vasoinhibinas en la etiología de la preeclampsia requiere de la determinación de sus niveles locales (LA) y sistémicos antes de las manifestaciones clínicas de este padecimiento, Estamos en proceso de reunir los grupos clínicos que nos permitan realizar este estudio.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten proponer las siguientes posibilidades:

1. La catepsina D y la MMP-9 podrían ser las proteasas responsables de una mayor producción de vaso inhibinas en las placentas de pacientes preeclámpicas.

2. La mayor concentración de vaso inhibinas excretadas en la orina podría reflejar el incremento sistémico de estos péptidos durante la preeclampsia.

3. Las vaso inhibinas se asocian a la preeclampsia y pudieran influir sobre su patofisiología.

10. REFERENCIAS

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. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005, 46:2947-2953

Ashton SV, Whitley GS, Dash PR, Wareing M, Crocker IP, Baker PN, Cartwright JE. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005, 25:102–108

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

Barrett AJ. Cathepsin D and other carboxyl proteinases. *Proteinases in mammalian cells and tissues.* 1977; 209-248

Benes P, Vetvicka V, Fusek M. Cathepsin D Many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008, 68 (1):12-28.

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

Ben-Jonathan N, La Pensee CR, La Pensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endoc Rev.* 2008, 29(1):1-41

Bentzien F, Struman I, Martini JF, Martial J, Weiner R. "Expression of the Antiangiogenic Factor 16K hPRL in Human HCT116 Colon Cancer Cells Inhibits Tumor Growth in Rag1^{-/-} Mice", *Cancer Res.* 2001, 61:7356-7362.

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

Clapp C, Lopez-Gomez FJ, Nava G, Corbacho A, Torner L, Macotela Y, Duenas Z, Ochoa A, Noris G, Acosta E, Garay E, Martinez de la Escalera G. Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *J Endocrinol.* 1998, 158(1):137-44.

Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology.* 1993, 133(3):1292-9

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. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci.* 1994, 91(22):10384-8.

Clapp C, Weiner RI. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology.* 1992, 130(3):1380-6.

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

Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, Noris G, Macotela Y, Struman I, Martínez de la Escalera G, Freeman BA, Clapp C. Proteolytic Cleavage Confers Nitric Oxide Synthase Inducing Activity upon Prolactin. *J Biol Chem.* 2000b, 275(18):13183-6.

Corbacho AM, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Roles of Prolactin and Related Members of the Prolactin/ Growth Hormone/ Placental lactogen family in Angiogenesis. *J Endocrinol.* 2002, 173(2):219-38.

Coolman M, de Maat M, Van Heerde WL, Felida L, Schoormans S, Steegers EA, Bertina RM, de Groot CJ. Matrix Metalloproteinase-9 Gene -1562C/T Polymorphism Mitigates Preeclampsia. *Placenta.* 2007, 28(7):709-13.

Cosío, G., Jeziorski, M.C., Lopez-Barrera, F., De La Escalera, G., Clapp C. Hypoxia inhibits expression of prolactin and secretion of cathepsin-D by the GH4C1 pituitary adenoma cell line. *Lab Invest.* 2003, 83(11):1627-36

Craven CM, Morgan T, Ward K. Decidual spiral artery remodeling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta*. 1998, 19:241-52

D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. 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*. 1995, 92(14):6374-8

D'Angelo G, Martini JF, Iiri T, Fantl WJ, Martial J, Weiner RI. 16K Human Prolactin Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Activation of Ras in Capillary Endothelial Cells. *Mol Endocrinol*. 1999, 13 (5):692-704

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. Prolactin in the eye of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004, 45:2049-55

Dueñas Z, Torner L, Corbacho AM, Ochoa A, Gutierrez-Ospina G, Lopez-Barrera F, Barrios FA, Berger P, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999, 40(11):2498-505.

Earl U, Morrison L, Gray C, Bulmer JN. Proteinase and proteinase inhibitor localization in the human placenta. *Int J Gynecol Pathol*. 1989, 8:114-24

Fernandez-Patron C, Radomski MW, Davidge ST. Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res*. 1999, 85:906-11

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

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 2000, 80:1253-1631.

Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci*. 2001, 98:2604-9

Fukuoka H, Hamamoto R, Higurashi M. Heterogeneity of serum and amniotic fluid prolactin in humans. *Horm Res*. 1991, 35 (suppl 1):58-63

Ge G, Fernández CA, Moses MA, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17 kDa antiangiogenic factor. *PNAS*. 2007, 104(24):10010-5

Golander A, Kopel R, Lazebnik N, Frenkel Y, Spierer Z. Decreased prolactin secretion by decidual tissue of preeclampsia in vitro. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1985, 108:111-3

Gonzalez C, Parra A, Ramírez-Peredo J, García C, Rivera JC, Macotela Y, Aranda J, Lemini M, Arias J, Ibarguengoitia, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest*. 2007, 87(10):1009-17

González C, Parra A, Ramírez-Peredo J, Macotela Y, Arias J, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Vasoinhibins in amniotic fluid from severe preeclampsia inhibit endothelial cell proliferation: Implications for birth weight. The Endocrine Society's 88th annual meeting. Boston, MA. 2006: 24-27

Horrobin DF. The possible role of prolactin in pre-eclampsia. *Zentralbl Gynakol*. 1977, 99:526-36

Horrobin DF, Lloyd IJ, Lipton A, et al. Actions of prolactin on human renal function. *Lancet*. 1971, 2:352-4

Horrobin DF, Manku MS, Burstyn PG. Effect of intravenous prolactin infusion on arterial blood pressure in rabbits. *Cardiovasc Res*. 1973, 7:585-7

Huppertz B, Kingdom JC. Apoptosis in the trophoblast—role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig*. 2004, 11:353-62

Hurley MJ, Larsen LB, Kelly AL, McSweeney PLH. The milk acid proteinase cathepsin D: a review. *International Dairy Journal* 2000, 10(10):673-81

Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod.* 2003, 69:1-7

Kelly EA, Jarjour NN. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2003, 9:28-13

Kim J, Luo W, Chen DT, Earley K, Tunstead J, Yu-Lee LY, Lin SH. Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res.* 2003, 63:386-93

Kliman HJ. Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. *Am J Pathol.* 2000, 157:1759-68

Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension.* 2005, 46:1077-85

Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004, 350:672-83

Lowe DT. Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. *Nitric Oxide.* 2000, 4:441-58

Luciano AA, Varner MW. Decidual, amniotic fluid, maternal and fetal prolactin in normal and abnormal pregnancies. *Obstet Gynecol.* 1984, 63:384-8

Maaskant RA, Bogic LV, Gilger S, et al. The human prolactin receptor in the fetal membranes, decidua, and placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996, 81:396-405

Macotela Y, Aguilar MB, Guzmán-Morales J, Rivera JC, Zermeño C, López-Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Matrix metalloproteinases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16kDa prolactin. *J Cell Sci.* 2006, 119:1790-1800

Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI. The Antiangiogenic Factor 16K PRL Induces Programmed Cell Death in Endothelial Cells by Caspase Activation. *Mol Endocrinol.* 2000, 14(10):1536-49

Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, Libermann TA, Morgan JP, Sellke FW, Stillman IE, Epstein FH, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest.* 2003, 111:649-58

Maynard SE, Epstein FH, Karumanchi SA. Preeclampsia and angiogenic imbalance. *Annu Rev Med.* 2008, 59:61-78.

Mayhew TM. Villous trophoblast of human placenta: a coherent view of its turnover, repair and contributions to villous development and maturation. *Histol Histopathol.* 2001, 16:1213-24

Mills DE, Ward RP. Effect of prolactin on blood pressure and cardiovascular responsiveness in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1986, 181(1):3-8

Moses EK, Freed KA, Higgins JR, Brennecke SP. Alternative forms of a novel aspartyl protease gene are differentially expressed in human gestational tissues. *Mol Hum Reprod.* 1999, 5:983-9

Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods.* 1983, 65:55-63

Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999, 274(31):21491-4

Narumiya H, Zhang Y, Fernandez-Patron C, Guilbert LJ, Davidge ST. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in the plasma of women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2001, 20(2):185-94

Noël A, Jost M y Maquoi E. Matrix metalloproteinases at cancer tumor–host interface. *Semin Cell Dev Biol.* 2007, 19(1):52-60

Pardi G, Marconi AM, Cetin I. Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses--a review. *Placenta.* 2002, 23(Suppl A):S136-41

Parra A, Ramirez-Peredo J. The possible role of prolactin in preeclampsia: 2001, a hypothesis revisited a quarter of century later. *Med Hypotheses*. 2002, 59:378-84

Pepper MS, Vassalli JD, Montesano R, Orci L. Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J Cell Biol*. 1987, 105:2535-41

Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial JA, Kelly PA, Goffin V. Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol*. 2004, 18:2522-42

Polliotti BM, Fry AG, Saller DN, Mooney RA, Cox C, Miller RK. Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2003, 101:1266-74

Podjarny E, Losonczy G, Baylis C. Animal models of preeclampsia. *Semin Nephrol*. 2004, 24:596-606

Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet*. 2001, 357:53-6

Ranta T, Stenman UH, Unnerus HA, Rossi J, Seppala M. Maternal plasma prolactin levels in preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 1980, 55:428-30

Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005, 365:785-99

Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endoc Rev*. 1995, 16:354-69

Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Ret Eye Res*. 2002, 21:1-14

Soares MJ, Müller H, Orwing KE, Peters TJ, Dai G. The uteroplacental prolactin family and pregnancy. *Biol Reprod*. 1998, 58:273-84

Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev.* 2005, 26(7):877-97

Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: An efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 1999, 96(4):1246-51

Tabruyn SP, Sorlet CM, Rentier-Delrue F, Bours V, Weiner RI, Martial JA, Struman I. The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol.* 2003, 17(9):1815-23

Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980, 51:1058-63

Torner L, Mejia S, Lopez-Gomez FJ, Quintanar A, Martinez de la Escalera G, Clapp C. A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology.* 1995, 136(12):5454-60

Tranquilli AL, Bezzeccheri V, Giannubilo SR, Scagnoli C, Mazzanti L, Garzetti GG. Amniotic vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) in women with subsequent preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004, 113:17-20

Vatish M, Randeve HS, Grammatopoulos DK. Hormonal regulation of placental nitric oxide and pathogenesis of pre-eclampsia. *Trends Mol Med.* 2006, 12:223-33

Vetvicka V, Vektvickova J, Fusek M. Effect of human procathepsin D on proliferation of human cell lines. *Cancer Lett.* 1994, 79(2):131-5

Vicenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res.* 2002, 4:157-64

Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2003, 1:2112-8

Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2003, 36(1):128-37

Zaidi N, Maurer A, Nieke S, Kalbacher H. Cathepsin D: a cellular roadmap. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008, 376(1):5-9

Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000, 50:139-48

11. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas moleculares de la catepsina D.	7
Figura 2. Proteólisis de la PRL a Vasoinhibinas (Vis) por catepsina D.	8
Figura 3. Proteólisis de la PRL a Vasoinhibinas (Vis) por metaloproteasas de matriz (MMPs).	10
Figura 4. Invasión de trofoblastos a las arterias uterinas.	13
Figura 5. Placentación normal.	15
Figura 6. Placentación deficiente.	15
Figura 7. Proteólisis de PRL por CD presente en trofoblastos.	26
Figura 8. Concentración de CD en trofoblastos.	27
Figura 9. Proteólisis de PRL por MMPs presentes en trofoblastos.	29
Figura 10. La Galardina bloquea el efecto de las MMPs presentes en trofoblastos.	30
Figura 11. Niveles de MMP-9 presentes en trofoblastos.	31
Figura 12. Niveles de MMP-13 presentes en trofoblastos.	32
Figura 13. Niveles de MMP-2 presentes en trofoblastos.	33
Figura 14. Niveles de vasoinhibinas en orina de mujeres con preeclampsia e IUGR.	35
Figura 15. Niveles de PRL en orina de mujeres con preeclampsia e IUGR.	36