



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**ANÁLISIS DE EFECTOS DE LA PROLACTINA  
Y LAS VASOINHIBINAS EN LA RETINA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA

**Q.F.B. EDITH ARNOLD HERNÁNDEZ**

DIRECTORA DE LA TESIS:

**DRA. MARÍA DEL CARMEN CLAPP JIMÉNEZ**



JURIQUILLA, QUERÉTARO.

2011



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.

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-SALUD-2008-CO1-87015).

*Dedicatoria*

*A mis padres, pilares de mi vida*

*A mi hermana, mi compañera inigualable*

*Al Dr. J. de Jesús García Soto<sup>†</sup>, mi mentor en el camino de la ciencia*

*Gracias a Dios por concederme la gracia y la dicha de encontrar mi vocación en la ciencia y poder culminar satisfactoriamente mis estudios de doctorado.*

*Agradezco a:*

*La Dra. Carmen Clapp,  
por ser una gran tutora que me instruyó y apoyó en cada etapa de mi doctorado.*

*La Dra. Lourdes Massieu Trigo y el Dr. Juan Riesgo Escovar,  
por formar parte de mi comité tutorial y sus comentarios valiosos cada semestre.*

*El Dr. Miguel Condés Lara,  
por permitirme desarrollar parte de mi tesis en su laboratorio  
y enseñarme el maravilloso campo de la electrofisiología.*

*La Dra. Stèphanie Thebault,  
por ayudarme, enseñarme y orientarme en muchos momentos de mi doctorado  
y por su gran amistad.*

*El Dr. Jorge Aranda López  
por compartir conmigo toda su experiencia en el laboratorio y una valiosa amistad.*

*Los técnicos Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán,  
por su invaluable ayuda y alegría diaria en el laboratorio.*

*El Lic. en Nutrición Fernando López Barrera  
por siempre prestarme su ayuda cuando lo necesitaba, y su amistad.*

*El Dr. Gerardo Rojas Piloni y al MVZ. Javier Rodríguez Jiménez por su gran ayuda para  
poder llevar a cabo los electroretinogramas.*

*Los doctores Miguel Condés, José Vázquez, Julio Morán y Carlos Aguilar,  
por aceptar ser miembros del jurado y por la revisión crítica y constructiva de la tesis.*

*Todos los compañeros con los que compartí el laboratorio durante todos estos años  
y que me ayudaron de distintas maneras en el trabajo diario,  
en especial a Germán Baeza Cruz por su disposición a ayudarme mucho siempre.*

*Agradecimientos Institucionales*

*Agradezco a:*

*El Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México.*

*El apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)  
bajo el número de becario 99210.*

*El apoyo técnico del Lic. en Nutrición Fernando López Barrera  
y el M.C. Gabriel Nava Pinto.*

*La eficiente asistencia administrativa de la Q. Leonor Casanova Rico  
y de María del Carmen Vázquez en todos los trámites del posgrado.*

*La asistencia técnica del MVZ. Martín García Servín (Bioterio),  
la ISC. Elsa Nydia Hernández Río (Microscopia Confocal),  
la Biol. Lorena López Sánchez (Histología),  
la Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala (Videoconferencias),  
y la Dra. Dorothy Pless, (Edición de textos en inglés).*

*¿Cómo podemos aprender la verdad pensando?  
Como quien aprende a ver mejor una cara dibujándola*

*Ludwing Wittgenstein*

## Índice

	Página
<b>Dedicatoria.....</b>	<b>ii</b>
<b>Agradecimientos .....</b>	<b>iii</b>
<b>Índice.....</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xi</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. La PRL .....</b>	<b>2</b>
1.1 El receptor de la PRL.....	3
1.2 Las vasoinhibinas .....	5
<b>2. El sistema ocular .....</b>	<b>6</b>
2.1 Consideraciones anatómicas.....	6
2.2 La retina .....	7
2.3 La red vascular de la retina.....	9
2.3.1 <i>Coriocapilares</i> .....	10
2.3.2 <i>Red vascular retiniana interna</i> .....	10
<b>3. La PRL y las vasoinhibinas en la retina .....</b>	<b>11</b>
<b>4. Antecedentes inmediatos: Primera parte. ....</b>	<b>12</b>
4.1 Regulación de la vascularización de la retina.....	12
4.2 La retinopatía diabética .....	13
4.3 Las vasoinhibinas y las retinopatías proliferativas. ....	15
<b>5. Antecedentes inmediatos: segunda parte.....</b>	<b>17</b>
5.1 Fisiología de la visión .....	17
5.1.1 <i>Los fotorreceptores y la fototransducción</i> .....	17
5.1.2 <i>La respuesta eléctrica a los estímulos visuales en la retina.</i> .....	19
5.1.3 <i>El Electroretinograma.</i> .....	20
5.1.3.1 Los componentes del ERG .....	20

5.1.3.2 Interpretación y aplicaciones del ERG .....	21
5.1.4 La PRL y la biología celular de la visión. ....	23
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>25</b>
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>26</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
5.1 Reactivos y anticuerpos.....	28
5.2 Animales .....	28
5.3 Inducción de la hiperprolactinemia .....	29
5.4 Medición de los niveles de PRL en el suero.....	30
5.5 Análisis por Western blot.....	31
5.6 Fluoroangiografía retiniana .....	31
5.7 Ensayo de azul de Evans para medir la permeabilidad capilar <i>in vivo</i> .....	32
5.8 Modelo de daño retiniano por exposición luminosa.....	33
5.9 Recolección del tejido y procesamiento .....	33
5.10 ELISA para cuantificar muerte celular.....	34
5.11 Cuantificación de rodopsina.....	34
5.12 Tinción de hematoxilina-eosina de secciones incluidas en parafina .....	34
5.13 Inmunohistoquímica.....	35
5.14 Electrorretinogramas .....	35
5.15 Análisis estadístico.....	36
<b>VI. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
<b>6.1 PARTE 1.....</b>	<b>37</b>
6.1.1 La PRL sistémica es incorporada al ojo y convertida a vasoinhibinas. ....	37
6.1.2 Niveles altos de PRL sistémica mitigan el incremento en la vasopermeabilidad retiniana en respuesta a la inyección intraocular del VEGF .....	39
6.1.3 Niveles altos de PRL sistémica mitigan el incremento en la vasopermeabilidad retiniana en ratas diabéticas.....	40
<b>6.2 PARTE 2.....</b>	<b>41</b>
6.2.1 La PRL inyectada intravítreamente no modifica la muerte celular en la retina inducida por daño luminoso.....	41
6.2.2 La PRL inyectada intravítreamente no modifica la recuperación de la concentración de rodopsina en la retina después de la exposición luminosa. ....	42
6.2.3 Niveles altos de PRL sistémica reducen la apoptosis en la retina inducida por un daño luminoso. ....	43
6.2.4 La hiperprolactinemia reduce alteraciones en el ERG inducidas por la exposición luminosa. ....	44
6.2.5 El receptor de la PRL aumenta en células gliales tras la exposición a luz continua.....	48
6.2.6 El ERG de ratones RPRL <sup>-/-</sup> presenta alteraciones con respecto a los ratones RPRL <sup>+/+</sup> .....	49

<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
7.1 Primera parte.....	54
7.2 Segunda parte .....	58
<b>VII. CONSIDERACIONES FINALES .....</b>	<b>65</b>
<b>VIII. REFERENCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>IX. ANEXO: PUBLICACIÓN .....</b>	<b>83</b>

## Lista de figuras

Figura	página
1. Representación tridimensional de la estructura terciaria de la PRL humana.	3
2. Principales vías de señalización intracelular del receptor de PRL.	4
3. Diagrama de las partes del ojo.	7
4. Diagrama de la organización de las células en la retina y tinción de hematoxilina-eosina de una sección transversal de retina humana.	9
5. Arterias que irrigan a la retina.	10
6. Distribución de los capilares en la retina interna.	11
7. Niveles de PRL sérica cuantificados por ELISA en un grupo de pacientes control no diabéticos (C) y diabéticos (D) sin retinopatía (NRD), con retinopatía diabética no proliferativa (NDRP) o con retinopatía diabética proliferativa (RDP).	16
8. Esquema de los pasos de la fototransducción.	19
9. Esquema de los componentes de un ERG en condiciones escotópicas y fotópicas en la rata.	21
10. Parámetros de evaluación del ERG.	22
11. La hiperprolactinemia resulta en niveles más altos de vasoinhibinas en la retina.	37
12. Niveles de PRL sérica evaluados mediante el bioensayo de las Nb2 en los ratones silvestres (RPRL+/+) y carentes del receptor de PRL (RPRL-/-).	38
13. La hiperprolactinemia mitiga el incremento en la vasopermeabilidad retiniana inducida por la inyección intraocular de VEGF.	39
14. La hiperprolactinemia mitiga el incremento en la vasopermeabilidad retiniana debida a la diabetes.	41
15. La PRL inyectada intravitrealmente no modifica la muerte celular en la retina inducida por daño luminoso.	42
16. La PRL inyectada intravitrealmente no modifica la recuperación de la concentración de rodopsina en la retina medida 15 días después de la exposición luminosa.	43
17. La hiperprolactinemia inhibe la apoptosis en la retina inducida por daño luminoso.	44
18. La hiperprolactinemia reduce alteraciones en el ERG inducidas por la exposición luminosa.	46
19. La hiperprolactinemia reduce alteraciones en el ERG inducidas por la exposición luminosa.	47
20. La hiperprolactinemia reduce alteraciones en el ERG inducidas por la exposición luminosa.	48
21. El receptor de la PRL aumenta en células gliales tras la exposición a luz continua.	49
22. Análisis histológico de retinas de ratones.	50
23. El ERG de ratones RPRL-/- presenta alteraciones con respecto a los ratones RPRL+/+.	51
24. La amplitud de los potenciales oscilatorios disminuye en los ratones knockout (RPRL-/-) y heterocigotos (RPRL+/-) para el receptor de PRL (RPRL).	53

## ABSTRACT

Increased retinal blood vessel permeability and growth lead to diabetic retinopathy a disease also characterized by degenerative changes in retinal function visualized in the electroretinogram (ERG). The hormone prolactin (PRL) is predominantly secreted by the anterior pituitary gland to exert multiple effects in reproduction, osmoregulation, immune response, energy metabolism, and angiogenesis. Also, several extrapituitary tissues produce PRL and process it to vasoinhibins, a family of peptides derived from the proteolytic cleavage of PRL that inhibit vasopermeability and blood vessel growth. Recent studies indicate that the retina is a site for the production and action of PRL and vasoinhibins. Here, we investigated whether vascular and neuronal effects of PRL in the retina could help protect against diabetic retinopathy. Accordingly, we first investigated the contribution of circulating PRL to the generation of intraocular vasoinhibins, and whether such conversion influences the increase of retinal vasopermeability that occurs during the early stages of diabetic retinopathy. In addition, we studied the protective effects of PRL against light-induced retinal apoptosis and ERG alterations. In both studies, we induced hyperprolactinemia by placing two anterior pituitaries grafts under the kidney capsule and tested the effects of blocking endogenous PRL by using PRL receptor null mice (PRLR<sup>-/-</sup>). In the first study, retinal vasopermeability was determined in hyperprolactinemic rats subjected to the intraocular injection of vascular endothelial growth factor (VEGF) or made diabetic with streptozotocin. Our results showed that hyperprolactinemia leads to vasoinhibin accumulation within the retina; this effect was not observed in PRLR<sup>-/-</sup> mice, indicating receptor-mediated incorporation of systemic PRL into the eye. Hyperprolactinemia reduced both VEGF-induced and diabetes-induced increase in retinal vasopermeability, and both reductions were blocked by bromocriptine, an inhibitor of PRL secretion, which lowers the levels of circulating PRL and retinal vasoinhibins. From these findings, we concluded that circulating PRL can influence the progression of diabetic retinopathy after its intraocular conversion to vasoinhibins. In the second study, we found that hyperprolactinemia protects against the apoptosis (evaluated by ELISA) of photoreceptors induced by exposure to white light (1200 lux) for 48 hours. Also, hyperprolactinemia prevented the reduction in the amplitude of the *b*-wave and of the oscillatory potentials induced by the light damage. Notably, PRLR<sup>+/-</sup> and PRLR<sup>-/-</sup> mice showed reduced amplitudes of the *b*-wave and the oscillatory potentials, confirming the essential role of endogenous PRL in maintaining retinal function. In addition, we found that light exposure increased gliosis and expression of the PRL receptor in retinal Müller cells. Because, Müller cells promote photoreceptor survival and the generation of the ERG *b* wave, we propose that PRL acts on these cells, at least in part, to activate neuroprotective mechanisms. In conclusion, hyperprolactinemia can mitigate vascular and visual alterations of retinal function that characterize diabetic retinopathy and may represent a novel therapy against this disease.

## RESUMEN

La hormona prolactina (PRL) se produce principalmente en la hipófisis anterior desde donde es vertida a la circulación para ejercer efectos diversos sobre la reproducción, la osmoregulación, la regulación del sistema inmune, el metabolismo y la angiogénesis. Además, diversos tejidos extrahipofisarios producen PRL y la procesan hacia vasoinhibinas, una familia de péptidos derivados del procesamiento proteolítico de la PRL con acciones inhibitorias de la función vascular. Diversos estudios indican que la retina es un órgano productor y blanco de la PRL y de las vasoinhibinas. En este trabajo investigamos la contribución de la PRL circulante a la generación de vasoinhibinas intraoculares y si dicha conversión podría influir sobre el control de la vasopermeabilidad retiniana que se incrementa en las etapas iniciales de la retinopatía diabética. Además, dado que el receptor de la PRL se concentra en los fotorreceptores retinianos, analizamos posibles acciones de la PRL sobre la supervivencia y funcionalidad de estas células. En la primera parte del estudio, encontramos que ratas hiperprolactinémicas, implantadas con dos hipófisis anteriores bajo la cápsula renal, contienen altos niveles de vasoinhibinas en la retina, evaluados por Western blot. Este aumento en vasoinhibinas se bloquea a través de inhibir la hiperprolactinemia con bromocriptina, un agonista dopaminérgico que inhibe la secreción de PRL por los implantes hipofisarios. Además, mostramos que la hiperprolactinemia no se traduce en mayores niveles de vasoinhibinas retinianas en ratones desprovistos del receptor de PRL (RPRL<sup>-/-</sup>), lo que sugiere que la PRL circulante se incorpora al ojo via su receptor. En forma consistente, la hiperprolactinemia redujo el aumento en la vasopermeabilidad retiniana debido a la inyección intravitreal del factor de crecimiento endotelial vascular que es el principal factor promotor de las alteraciones vasculares en la retinopatía diabética. Asimismo, la hiperprolactinemia inhibió el incremento en la vasopermeabilidad retiniana que tiene lugar en el modelo de ratas diabéticas inyectado con estreptozotocina. Estos resultados apoyan el que altos niveles de PRL circulante resultan en la generación intraocular de vasoinhibinas capaces de contrarrestar alteraciones vasculares debidas a la retinopatía diabética. La segunda parte de nuestro estudio mostró que la hiperprolactinemia, en ratas con implantes adenohipofisarios, protege contra la apoptosis de los fotorreceptores inducida por la exposición a luz continua (1200 lux por 48 horas) y evaluada por ELISA. Además, los electroretinogramas en ratas normales e hiperprolactinémicas mostraron que los altos niveles de PRL sérica protegen la funcionalidad de los fotorreceptores contra el daño luminoso a juzgar por su efecto preservando la amplitud de la onda *b* y de los potenciales oscilatorios, así como la duración de los tiempos implícitos tanto de la onda *a* como la *b*. Consistentemente, en los ratones RPRL<sup>(-/-)</sup> se observó una disminución significativa de la amplitud de la onda *b* y de los potenciales oscilatorios. Además, se encontró que la exposición luminosa incrementa la gliosis y la expresión del RPRL en las células de Müller. En su conjunto, el presente trabajo muestra efectos protectores de la hormona PRL en la retina a través de inhibir la vasopermeabilidad, vía su conversión a vasoinhibinas, pero también a través de promover la funcionalidad de la vía visual. Se propone a la hiperprolactinemia como una estrategia terapéutica en padecimientos que se caracterizan por alteraciones vasculares y visuales como son la retinopatía diabética y la degeneración macular asociada a la edad.

## I. INTRODUCCIÓN

La hormona PRL, producida principalmente por la hipófisis anterior, pero también por varios tejidos extrahipofisarios, fue descubierta en la década de los treinta, a partir de su acción sobre la producción de leche en los mamíferos (Smith, 2004). Sin embargo, se le conocen actualmente más de 200 acciones diferentes en procesos fisiológicos dentro de la reproducción, la osmoregulación, la regulación del sistema inmune, el metabolismo y la angiogénesis (Bole-Feysot, Goffin, Edery, Binart, & Kelly, 1998). A esta versatilidad funcional contribuye la conversión de la PRL a vasoinhibinas, un conjunto de péptidos derivados de la proteólisis de dicha hormona que, a diferencia de la hormona madre, inhiben la neovascularización o angiogénesis, la vasopermeabilidad y la vasodilatación (Clapp, Aranda, Gonzalez, Jeziorski, & Martinez de la Escalera, 2006).

Estudios recientes indican que el ojo es un órgano productor y blanco de las acciones de la prolactina y de las vasoinhibinas. El RNA mensajero de la PRL y de su receptor (RPRL) se expresa en la retina (Aranda et al., 2005; Rivera et al., 2008), y además se ha detectado tanto a la PRL como a las vasoinhibinas en la retina y en diversos fluidos oculares (Aranda et al., 2005; Duenas et al., 2004). Experimentos donde se bloqueó la expresión y acción de estas proteínas se asociaron con la sobreproducción y la vasodilatación de los vasos sanguíneos retinianos (Aranda et al., 2005). Por otra parte, la transducción de vasoinhibinas con vectores virales o la inyección intraocular de vasoinhibinas inhibe la angiogénesis y la vasopermeabilidad en modelos murinos de retinopatía diabética (Garcia et al., 2008; Pan et al., 2004). Estos estudios permitieron proponer a las vasoinhibinas como reguladores fisiológicos de la vascularización retiniana y su posible valor terapéutico en el control de las retinopatías vasoproliferativas, un conjunto de enfermedades que constituyen la principal causa de la ceguera en el mundo y que incluyen a la retinopatía del prematuro, la retinopatía diabética y la degeneración macular asociada con la edad. Estas implicaciones patofisiológicas resaltan la importancia del estudio de la PRL como molécula precursora de las vasoinhibinas.

En contraste con las vasoinhibinas, se conoce muy poco acerca de posibles acciones de la PRL en la retina. Estas acciones son factibles debido a que el receptor de la PRL se expresa en células a lo largo de la retina (Rivera et al., 2008). Además, hace

tiempo, se reportó que la PRL promueve la síntesis de pigmentos visuales en la retina de vertebrados inferiores (Allen & Cristy, 1978; Crim, 1975a, 1975b) y que esta hormona puede regular la susceptibilidad de los fotorreceptores a ser dañados por la exposición a luz continua en ratas (O'Steen & Kraeer, 1977). En la segunda parte de este estudio nos avocamos a investigar si la PRL puede actuar como un agente neuroprotector de la vía visual en la retina.

A continuación se describen antecedentes generales sobre la estructura y función de la PRL, la anatomía ocular, la angiogénesis en la retina y la fisiología de la visión

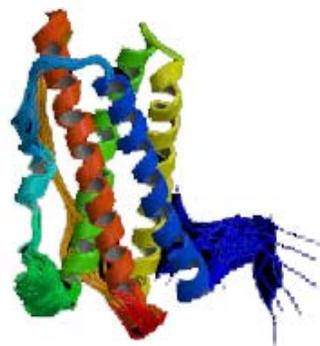
## **1. La PRL**

La hormona PRL es una proteína producida predominantemente por células denominadas lactotrofos que se localizan en la porción anterior de la glándula hipófisis. Sin embargo, múltiples sitios extrahipofisarios expresan PRL, incluyendo el endometrio, la decidua, el miometrio, las células inmunes, el cerebro, la glándula mamaria, la próstata, la piel y el tejido adiposo, entre otros (Ben-Jonathan, Mershon, Allen, & Steinmetz, 1996).

La PRL es sintetizada como una pro-hormona, la cual al sufrir la escisión del péptido de señal, origina la hormona madura de 194 a 199 aminoácidos dependiendo de la especie (rata o humano), con un peso molecular de 23 kDa. La estructura terciaria de la PRL está organizada en cuatro alfa hélices anti-paralelas estabilizadas por tres puentes disulfuro (cys 4-11, cys 58-174 y cys 191-199, en humanos) (Ben-Jonathan, LaPensee, & LaPensee, 2008) (Figura 1). En la adenohipófisis su expresión es regulada por el factor transcripcional Pit-1 (Fox et al., 1990) y su secreción es controlada de manera inhibitoria por el hipotálamo a través del neurotransmisor dopamina (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). Por otra parte, en los tejidos extrahipofisarios no se conoce un mecanismo uniforme para el control de la secreción de la PRL, presumiéndose que su mayor regulación es a nivel transcripcional, como lo es para la mayoría de las citocinas pertenecientes a la familia de factores de crecimiento hematopoyéticos con las cuales la PRL guarda características en común (Ben-Jonathan et al., 1996).

La PRL sufre numerosas modificaciones post-transduccionales que impactan su estabilidad, vida media, afinidad por su receptor y su actividad biológica; entre las cuales

se incluyen la polimerización, el rompimiento proteolítico, la glicosilación y la fosforilación (Sinha, 1995). De todas éstas, es de particular interés el procesamiento proteolítico de la PRL a vasoinhibinas, una familia de fragmentos N-terminales que posee propiedades funcionales diferentes a los de la PRL, actuando como factores antiangiogénicos (Clapp, Martial, Guzman, Rentier-Delure, & Weiner, 1993).



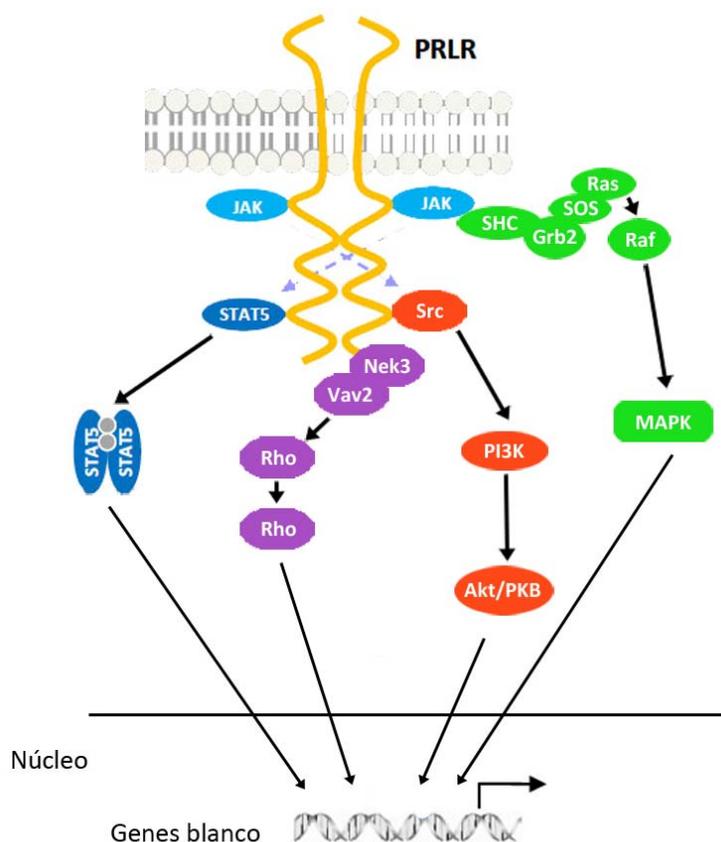
**Figura 1.** Representación tridimensional de la estructura terciaria de la PRL humana.

### 1.1 El receptor de la PRL

El receptor de la PRL corresponde a una proteína con un solo pase transmembranal, que posee un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular de tamaño variable. Su activación depende de la formación de un complejo activo ligando/receptor tiene una estequiometria de una hormona unida a dos receptores (Bole-Feysot et al., 1998).

El gen del receptor de PRL en el humano está localizado en el cromosoma 5 y tiene un tamaño de 100 kilo pares de bases y contiene 11 exones. El corte y empalme de la región codificante da lugar a diferentes isoformas que difieren en la longitud del dominio citoplásmico (Goffin & Kelly, 1997). Este receptor carece de actividad enzimática intrínseca y es fosforilado/activado predominantemente por una cinasa de tirosina (JAK-2) de la familia “Janus”. Subsecuentemente, se activan varias cascadas de señalización entre las cuales se encuentran la vía clásica de la Janus cinasa 2 (Jak2) y el transductor de señales y activador transcripcional 5 (Stat5) (Bole-Feysot et al., 1998); la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) (Clevenger, Furth,

Hankinson, & Schuler, 2003); la vía de la Src cinasa (Swaminathan, Varghese, & Fuchs, 2008); la vía del fosfoinositol 3 cinasa/proteína cinasa B (PI3K/PKB también conocida como Akt) (Berlanga et al., 1997) y la vía de la Nek3 cinasa-vav2 cinasa-proteína G Rac1 (Clevenger, 2004).



**Figura 2.** Principales vías de señalización intracelular del receptor de PRL.

Estos eventos de señalización inducen la expresión de genes responsivos a la PRL que están involucrados en efectos celulares específicos, tales como la proliferación celular, el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo, y las secreción; los cuales a su vez median funciones biológicas diversas de la PRL que incluyen: la producción de leche durante la lactancia, la modulación del sistema inmune, el balance del agua y electrolitos (osmoregulación), endocrinología y metabolismo, modificaciones del comportamiento, etc (Bole-Feysot et al., 1998).

La diversidad de funciones de la PRL se explica en parte a través de la expresión ubicua de las diferentes isoformas de su receptor en múltiples tejidos, cada una con la potencialidad de mediar acciones específicas. (Ben-Jonathan et al., 2008). Asimismo, la diversidad funcional de la hormona se ha asociado a su heterogeneidad molecular (Sinha, 1995). Entre las diferentes isoformas moleculares de la PRL destacan las vasoinhibinas como mediadores de efectos nuevos ausentes en la molécula nativa, no modificada de la hormona.

## **1.2 Las vasoinhibinas**

A finales de los años 80 y principios de los 90, se descubrió que la PRL podía ser cortada por enzimas proteolíticas para dar lugar a fragmentos de varios tamaños. Se encontró que aquellos fragmentos correspondientes al extremo amino terminal poseen efectos inhibidores de la función vascular y se les denominó vasoinhibinas, (Clapp, Gonzalez et al., 2006).

El tamaño de las vasoinhibinas varía en función de la enzima que corta a la PRL y de la especie. En el humano la proteólisis por catépsina D genera vasoinhibinas de 15, 16.8 y 17.2 kDa (corte en los residuos 132, 147 y 150, respectivamente) (Piwnica et al., 2004), mientras que las metaloproteasas de matriz extracelular (MMP-1,-2,-3,-8,-9 y -13) generan un fragmento de 17.8 kDa (corte en el residuo 156), que a su vez puede sufrir un segundo corte que da lugar a péptidos de 16 y 14 kDa (Macotela et al., 2006); además la proteasa morfogénica de hueso tipo 1 genera una vasoinhibina de 18 kDa (corte en el residuo 159) (Ge, Fernandez, Moses, & Greenspan, 2007).

Las vasoinhibinas se unen con una alta afinidad (Kd de 1–10 nM) a la membrana de las células endoteliales (Clapp & Weiner, 1992), originando respuestas celulares de manera específica como son el bloqueo de la proliferación (Clapp et al., 1993), la migración (S. H. Lee, Kunz, Lin, & Yu-Lee, 2007) y la permeabilidad (Garcia et al., 2008) celular en respuesta a sustancias vasoactivas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y la interleucina-1 $\beta$ , etc; aún cuando la naturaleza molecular de su receptor no ha sido identificada (Clapp & Weiner, 1992).

Los mecanismos de señalización a través de los cuales las vasoinhibinas bloquean funciones en las células endoteliales incluyen: 1) la inhibición a nivel de la proteína G Ras de la activación de la vía de las MAPKs (D'Angelo et al., 1999); 2) la inhibición de la urocinasa activadora del plasminógeno (uPA) a través de estimular la expresión del inhibidor del plasminógeno-1 (H. Lee, Struman, Clapp, Martial, & Weiner, 1998); 3) el bloqueo de la vía de Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 (S. H. Lee et al., 2007); 4) la inactivación de la sintasa de óxido nítrico endotelial a través de inhibir la movilización intracelular de calcio (Gonzalez et al., 2004), y de promover la desfosforilación de la eNOS en la Ser<sup>1179</sup> por la activación de la fosfatasa de la proteína 2A (Garcia et al., 2008). Finalmente, las vasoinhibinas promueven la conversión de Bcl<sub>-XL</sub> a la molécula pro-apoptótica Bcl<sub>-XS</sub> y la activación de caspasas través vía NF-KB (Martini et al., 2000; Tabruyn et al., 2003).

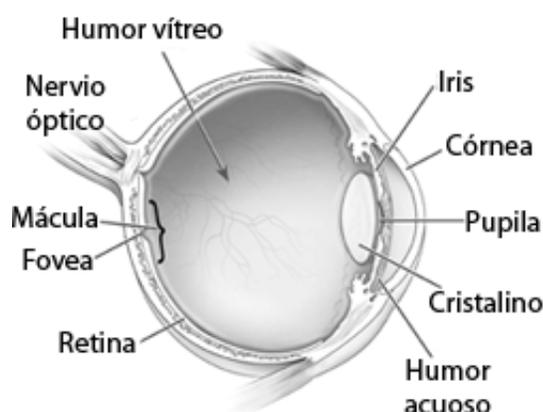
Las vasoinhibinas juegan un papel importante en la regulación fisiológica de la función vascular, al ser generadas de manera endógena en varios tejidos como la misma glándula hipófisis (Piwnica et al., 2004), el cartílago (Macotela et al., 2006) y la retina (Aranda et al., 2005). En particular, se ha propuesto que las vasoinhibinas retinianas participan en mantener el control estricto de la neovascularización que caracteriza a este órgano, y que la alteración en la producción de de estos péptidos puede conllevar a la progresión de las retinopatías vasoproliferativas (Clapp et al., 2008).

## **2. El sistema ocular**

### **2.1 Consideraciones anatómicas**

Los ojos son órganos sensitivos complejos que han evolucionado a partir de regiones fotosensibles situadas en la superficie de los invertebrados (Gehring, 2004). Poseen un gran número de receptores que reciben la información visual y la envían a la corteza cerebral donde es procesada. Dentro de su envoltura protectora (la esclera), cada ojo posee una lente (el cristalino), con posibilidad de enfocar diferentes distancias; un diafragma (el iris), que regula el tamaño de la abertura por la que pasa de la luz (la pupila), y una capa celular fotosensible en la parte ocular posterior (la retina). Esta última es nutrida por un tejido adyacente que contiene muchos vasos sanguíneos (la coroides) y

transporta la información visual al cerebro mediante proyecciones neurales que conforman al nervio óptico (Figura 3). En la parte anterior del globo ocular, está la córnea, un tejido transparente por donde penetra la luz. La cavidad entre la córnea y el cristalino está ocupada por una sustancia llamada humor acuoso; la cámara mayor entre el cristalino y la retina contiene una matriz en consistencia de gel, denominada vítreo; ambos tienen la función de conservar la forma del ojo, de nutrir y regular el equilibrio hídrico/iónico de sus diferentes componentes (Tortora, 2002).



**Figura 3.** Diagrama de las partes del ojo.

## 2.2 La retina

La retina es una capa de tejido neural de ~0.2 mm de espesor en el humano, localizada en la cara interna de la copa óptica que recubre las tres cuartas partes posteriores del globo ocular. La retina está organizada en 10 capas constituidas en forma ordenada y alternada por los núcleos [capa nuclear interna (CNI) y externa (CNE)] y los procesos axonales [capa plexiforme interna (CPI) y externa (CPE)] de los conos y bastones, que son los receptores visuales, y cuatro tipos generales de neuronas: las células bipolares, las células ganglionares, las células horizontales y las células amacrinas (Tortora, 2002).

La capa más externa de la retina es el epitelio pigmentario (EP), que consiste en una capa continua de células cuboidales que contienen melanina, la cual absorbe el exceso de luz no absorbida por los fotorreceptores. El epitelio pigmentario no está involucrado

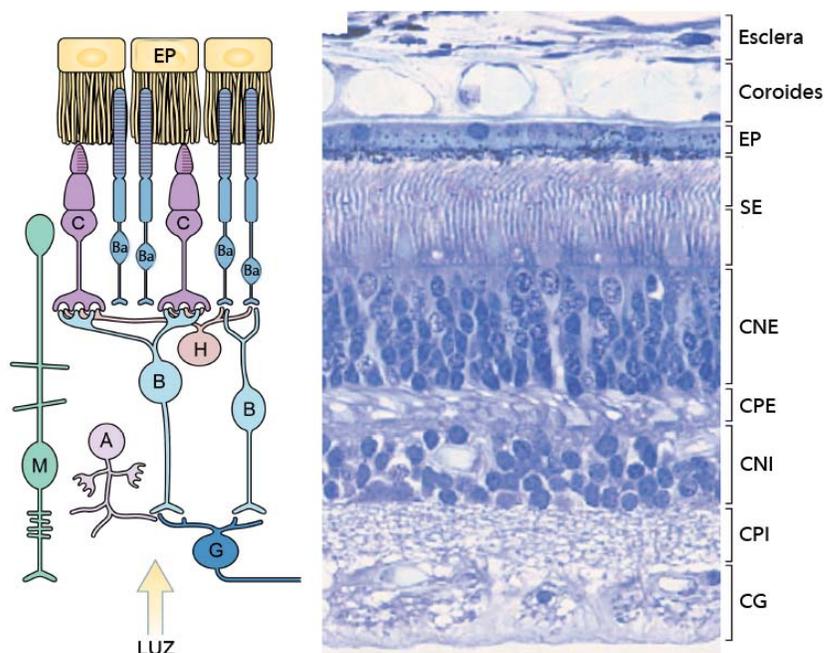
directamente en ninguno de los eventos que de la visión, pero es crucial para el buen funcionamiento y mantenimiento de los fotorreceptores (Sung & Chuang, 2010).

Los fotorreceptores son células con estructura y función muy especializadas. Hay de dos tipos, los conos y los bastones. Cada bastón y cono están divididos en un segmento externo, un segmento interno que incluye una región nuclear, y una zona sináptica. Los segmentos externos son cilios modificados y están constituidos por pilas de sáculos aplanados o de discos separados de la membrana plasmática. Estos sáculos y discos contienen el pigmento fotosensible que reacciona al estímulo luminoso, e inician la transducción de la luz hacia cambios electroquímicos que generan los potenciales de acción en las vías visuales. En los segmentos internos abundan las mitocondrias. Los bastones se denominan así por el aspecto de barras delgadas de sus segmentos externos. Los conos generalmente tienen segmentos internos gruesos y segmentos externos cónicos, aunque su morfología varía según el sitio en la retina; están mayormente concentrados en el centro de la retina y operan dentro de un rango de intensidad luminosa de entre  $10^{-1}$  y  $10^5$  lux, mediando la visión fotópica que es rica en color y caracterizada por alta resolución temporal y espacial. Los bastones, en contraste, están presentes a lo largo de toda la retina excepto en la región central conocida como la fovea, y proveen una visión escotópica sobre los  $10^{-2}$  lux, carente de información colorida (Levin, 2003).

Los fotorreceptores establecen sinapsis con las células bipolares y éstas con las células ganglionares. Los axones de las células ganglionares forman en el nervio óptico que ingresa al sistema nervioso central. Las dendritas y axones de las células horizontales conectan a los fotorreceptores entre sí, en la CPE; mientras que las prolongaciones de las células amacrinas hacen conexiones presinápticas y postsinápticas con las células ganglionares y los elementos neurales circunvecinos (Ganong, 1993). Los elementos neuronales de la retina están asociados a células gliales llamadas células de Müller. Las prolongaciones de estas células forman una membrana limitante interna sobre la superficie interior de la retina, y una membrana limitante externa en la capa de los fotorreceptores. En respuesta a casi todas las alteraciones patológicas de la retina, incluyendo daño fotópico, trauma, isquemia, desprendimiento de retina, glaucoma, retinopatía diabética y degeneración macular, las células de Müller se activan dando lugar a una gliosis. La manera como las células de Müller protegen a la retina es mediante la liberación de

factores neurotróficos y antioxidantes, la recaptura de glutamato y agua (Bringmann et al., 2009).

El nervio óptico abandona el ojo y los vasos sanguíneos entran a él en un punto situado ligeramente por encima del polo posterior del globo ocular. Los vasos retinianos irrigan directamente a las células bipolares y ganglionares, pero los fotorreceptores son nutridos por difusión a partir del plexo capilar de la coroides (Ganong, 1993).

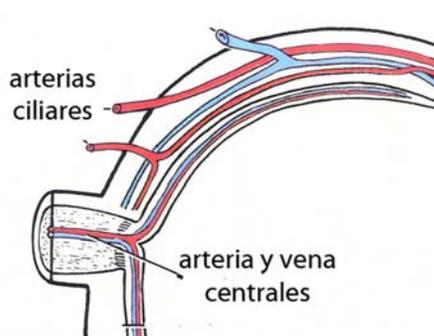


**Figura 4.** Diagrama de la organización de las células en la retina y tinción de hematoxilina-eosina de una sección transversal de retina humana. (EP, epitelio pigmentario; C, conos; Ba, bastones; M, células de Müller; B, bipolares; H, horizontales; A, amacrinas; G, ganglionares; SE, segmentos externos; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CG, células ganglionares). Modificada de (Sung & Chuang, 2010).

### 2.3 La red vascular de la retina

La arteria oftálmica, derivada de la carótida interna, es la encargada de irrigar al ojo y a partir de ésta se originan diversas ramificaciones que drenan la sangre a las distintas partes del ojo. En el caso de la retina, los dos principales lechos vasculares que la irrigan son: los coriocapilares, derivados de las arterias ciliares que atraviesan la esclera

y entran a la coroides, y la red vascular interna, que se deriva de la arteria central (Oystyer, 1999) (Figura 5).



**Figura 5.** Arterias que irrigan a la retina.

### **2.3.1 Coriocalilares**

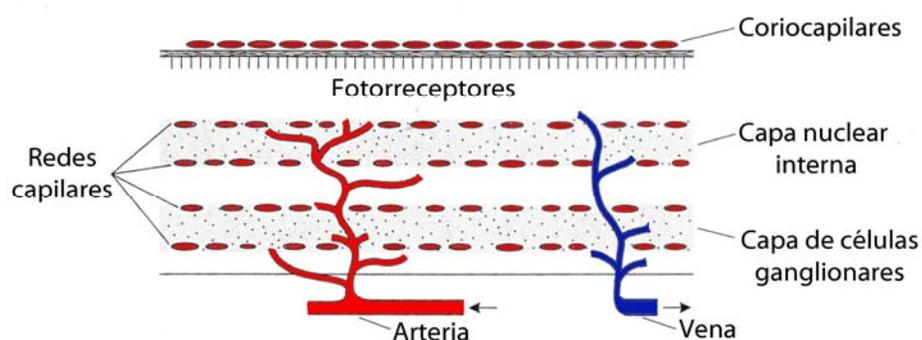
La coroides está formada por las ramificaciones derivadas de las arterias ciliares, es un sistema segmentado en el cual diferentes ramas irrigan distintas zonas y de éstas se derivan los coriocalilares que constituyen una capa sencilla de capilares fenestrados interconectados (anastomóticos) que forman un sistema de irrigación redundante en el cual hay potencialmente muchas rutas por las cuales la sangre puede fluir entre dos puntos cualesquiera del lecho vascular. Estos capilares cubren la cara interna de la coroides y se encargan de aportar los nutrientes y el oxígeno a los fotorreceptores; aún cuando están separados de estos por la membrana de Bruch y el epitelio pigmentario. El flujo sanguíneo de los coriocalilares no está regulado de manera local, solo a nivel sistémico a partir de la inervación simpática que contrarresta cualquier incremento en el flujo sanguíneo mediante vasoconstricción (Nickla & Wallman, 2010).

### **2.3.2 Red vascular retiniana interna**

Por otra parte el lecho vascular interno de la retina se origina a partir de la arteria central que emerge del nervio óptico y se divide en dos arterias papilares, superior e inferior que se subdividen en una arteria nasal y una temporal. La vena central de la retina presenta la misma organización. A partir de estos vasos arteriales principales que corren a lo largo de la superficie de la retina se derivan pequeñas ramificaciones que penetran a las capas de la retina para abastecer la red capilar interna organizada en cuatro niveles, dos en

cada uno de los límites de la capa nuclear interna y otros dos en los límites de la capa de células ganglionares (Figura 6) (Oystyer, 1999). Esta red capilar posee características de una barrera hematorretiana, al poseer una alta densidad de uniones estrechas que regulan de manera altamente selectiva el intercambio de sustancias entre la sangre y el tejido. Además presentan una fuerte regulación de su tono vascular a nivel local (Kaur, Foulds, & Ling, 2008).

A diferencia de los coriocapilares, la red de capilares internos forman un sistema de irrigación sanguínea segmentado y de circulación terminal, es decir no tiene anastomosis; lo que los torna más vulnerables al presentarse una oclusión vascular, ya que se compromete el flujo sanguíneo de una porción de la retina, lo cual puede conducir a edema y un potencial daño tisular (Kaur et al., 2008).



**Figura 6.** Distribución de los capilares en la retina interna. [Modificado de (Oystyer, 1999)].

### 3. La PRL y las vaso-inhibinas en la retina

En el ojo humano se ha detectado la presencia de PRL tanto en el humor acuoso como en el líquido subretiniano (Duenas et al., 2004). Estudios recientes han demostrado que la retina de la rata es un sitio de síntesis de PRL extrahipofisiaria, pues mediante hibridación *in situ* se detectó la expresión del RNA mensajero de la PRL en la CNE, la CPE, la CNI y en la capa de células ganglionares (CG) de la retina (Aranda et al., 2005). De igual manera el RNA mensajero del receptor de la PRL también se localizó a lo largo de la retina, desde la CNE hasta la de la CG (Rivera et al., 2008). Además de la PRL sintetizada en la retina, la PRL circulante de origen hipofisiario es incorporada a los

tejidos oculares, pues la PRL radiactiva inyectada sistémicamente se localiza en la retina, la coroides y cuerpos ciliares (O'Steen & Sundberg, 1982).

Por otra parte, las vasoinhibinas también han sido detectadas en la retina donde se encontró que ayudan a mantener inhibida la angiogénesis bajo condiciones normales. Esto se demostró a través de inyectar en el ojo anticuerpos o RNA de interferencia capaces de bloquear la acción y expresión de las vasoinhibinas, respectivamente, y de observar un aumento en el número de vasos sanguíneos y en la vasodilatación retinianas (Aranda et al., 2005). Además, durante el desarrollo neonatal, las vasoinhibinas participan en la regresión de los vasos hialoideos, un sistema de vasos intraoculares fetales que involucionan por apoptosis durante las primeras dos semanas después del nacimiento en los roedores (Duenas et al., 2004).

En su conjunto, estas observaciones motivaron la investigación de la participación de las vasoinhibinas en las retinopatías vasoproliferativas, donde la neovascularización excesiva conlleva a la ceguera. Por otra parte, la presencia de la PRL *per se* y de su receptor en células involucradas en la fisiología de la visión plantea la búsqueda de una posible función de la PRL en la retina independiente a la de las vasoinhibinas. Ambos aspectos fueron investigados en esta tesis y los antecedentes particulares de cada uno de estos temas se abordan a continuación.

#### **4. Antecedentes inmediatos: Primera parte.**

##### **4.1 Regulación de la vascularización de la retina**

La formación de nuevos vasos capilares sanguíneos a partir de vasos sanguíneos pre-existentes es llamada angiogénesis. La angiogénesis es benéfica para el desarrollo y la reparación de los tejidos ya que los nuevos vasos sanguíneos aportan oxígeno, nutrientes, hormonas y factores regulatorios al tiempo que remueven desechos celulares. Sin embargo la neovascularización puede ser perjudicial cuando es excesiva y aberrante. En este último caso sobrevienen las enfermedades conocidas como “angiogénico-dependientes” entre las que sobresalen el cáncer, la artritis reumatoide y las retinopatías vasoproliferativas (Watt, Athanassopoulos, Harris, & Tsaknakis, 2010).

El estímulo más importante para la formación de nuevos vasos sanguíneos en la retina es la disminución en la concentración de oxígeno local o hipoxia (Gariano & Gardner, 2005) generalmente derivada de la obstrucción capilar y la consecuente reducción en el flujo sanguíneo. Ante tal insulto, el tejido local reacciona promoviendo la secreción de factores pro-angiogénicos (Viridi & Hayreh, 1982), entre los que se destaca el VEGF, que además de inducir la vasoproliferación, estimula la vasopermeabilidad y la supervivencia endotelial (Ferrara, Houck, Jakeman, Winer, & Leung, 1991). Los nuevos vasos sanguíneos son muy permeables y frágiles y su sangrado en la mácula interfiere con la agudeza visual. Pero además, los neovasos llegan a invadir y a sangrar en el vítreo promoviendo la formación de tejido conectivo, la pérdida de la transparencia y la formación de adhesiones que pueden llevar al desprendimiento de retina (Sapieha et al., 2010).

La diabetes, la oclusión de la vena central, o un nacimiento prematuro generan cuadros de isquemia/hipoxia en la retina que conllevan a su neovascularización exacerbada y a la ceguera en la retinopatía diabética, la degeneración macular asociada con la edad y en la retinopatía del prematuro, respectivamente. Dada la pandemia mundial en la que se ha convertido la diabetes, a continuación ahondaremos más en el caso de la retinopatía diabética.

## **4.2 La retinopatía diabética**

En México al igual que en muchos otros países desarrollados, la alta incidencia de diabetes mellitus entre la población, ha llevado a que la retinopatía diabética se convierta en una de las principales causas de la pérdida de la visión. En la última encuesta nacional de salud realizada en el 2006, se menciona que cerca de un millón de personas padecían esta enfermedad en nuestro país (Olaiz-Fernández G, 2006).

El estudio de los mecanismos patofisiológicos que conducen al desarrollo de retinopatía diabética se encuentran en una evolución constante. El consenso hasta el día de hoy, es que se trata de una microangiopatía resultado de la exposición crónica a niveles elevados de glucosa en sangre. La hiperglucemia conduce a un elevado estrés oxidativo debido a la sobreproducción de superóxido, de sorbitol, de productos terminales de

glicosilación (AGE's) y a la activación de la proteína cinasa C (Brownlee, 2001). Estas alteraciones ocasionan la muerte de células endoteliales y pericitos (células accesorias al capilar que participan en el control del flujo sanguíneo), la extravasación de proteínas plasmáticas y la mayor adhesión de leucocitos y plaquetas al endotelio vascular. Como resultado, se generan puntos de oclusión y áreas sin perfusión capilar, que conducen a un estado hipóxico capaz de estimular la secreción de factores estimuladores de la vasodilatación, la vasopermeabilidad y la angiogénesis, entre los que se encuentran el VEGF (Caldwell et al., 2005), la eritropoyetina (Watanabe et al., 2005), el IGF-1 (Haurigot et al., 2009) y enzimas como la anhidrasa carbónica (Gao et al., 2007).

La terapia para el cuidado de los pacientes con retinopatía diabética es limitada. El control de los niveles de glucosa en sangre y de la presión arterial ayuda a prevenir una progresión más rápida de la enfermedad. Sin embargo los pacientes con retinopatía en un estado avanzado requieren de tratamientos oculares más agresivos, tales como la fotocoagulación con láser y la vitrectomía. La fotocoagulación con láser consiste en realizar quemaduras con el láser a lo largo de la retina, para promover la regresión y el arresto de la neovascularización, presumiblemente al favorecer la disminución de la producción de VEGF; lamentablemente esta técnica está asociada con varios efectos colaterales derivados de la naturaleza destructiva del láser, como son dificultades con la adaptación a la oscuridad, la disminución en la agudeza visual y la pérdida de la visión periférica. Por otra parte, la vitrectomía o remoción del vítreo está indicada en situación de hemorragias vítreas persistentes y desprendimiento de retina, con lo cual también se disminuye el riesgo de neovascularización y de edema macular, pero se incrementa el riesgo de glaucoma neovascular y la formación de cataratas (Cheung, Mitchell, & Wong, 2010).

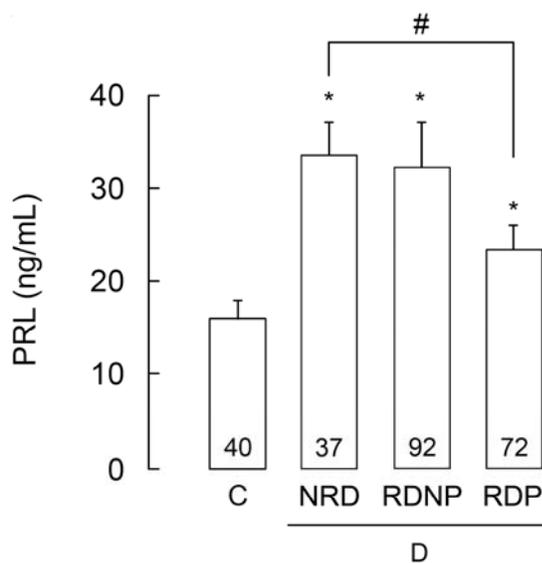
Lamentablemente, estas terapias no son efectivas en el 100% de los casos y el alto riesgo de efectos secundarios ha motivado la búsqueda de nuevos tratamientos. En los últimos años terapias como la administración de agentes anti-VEGF o anti-inflamatorios se encuentran en fases clínicas de análisis, donde también han mostrado efectos secundarios y una baja efectividad a largo plazo (Cheung et al., 2010). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas estrategias que contrarresten las hemorragias (permeabilidad vascular) y la neovascularización retinianas es de interés prioritario.

### **4.3 Las vasoinhibinas y las retinopatías proliferativas**

Las vasoinhibinas no solo actúan como factores anti-angiogénicos en condiciones normales, sino que también son capaces de contrarrestar los cambios vasculares que se presentan en la neovascularización patológica asociada con las retinopatías proliferativas. En un modelo murino de retinopatía del prematuro, la inyección intraocular de un vector adenoviral capaz de expresar una vasoinhibina de 16kDa inhibe la angiogénesis inducida por hipoxia (Pan et al., 2004). En el caso de la retinopatía diabética, las vasoinhibinas inyectadas intraocularmente son capaces de bloquear el aumento en la permeabilidad vascular en ratas diabéticas, y en respuesta a la inyección intraocular de VEGF o del vítreo de pacientes con retinopatía diabética (García et al., 2008).

La posibilidad de que una alteración en los niveles de vasoinhibinas pudiera influir sobre la progresión de la retinopatía diabética se apoya en estudios de hace casi cuatro décadas, donde se reportó que la hipofisectomía protege contra dicho padecimiento (Wright et al., 1969). En la actualidad, estos efectos benéficos se atribuyen a la supresión de la hormona de crecimiento que es diabetogénica (Jeffcoate, 2002) y puede estimular la neovascularización retiniana a través de inducir la expresión del factor angiogénico IGF-1 (Merimee, Zapf, & Froesch, 1983). Sin embargo, dado que la PRL disminuye con la hipofisectomía, también se ha investigado la posible asociación entre los niveles circulantes de PRL y la retinopatía diabética. Al respecto, en los estudios iniciales se reportaron niveles circulantes de PRL más altos en pacientes diabéticos sin retinopatía diabética severa que en aquellos con el grado más severo del padecimiento (Harter et al., 1976; Hunter et al., 1974). Sin embargo, estudios subsecuentes no confirmaron estos hallazgos (Froland, Hagen, & Lauritzen, 1977; Mooradian et al., 1985) y el tema dejó de explorarse a pesar de que los estudios negativos no fueron concluyentes ya que involucraban números reducidos de pacientes y/o no especificaban el grado de la retinopatía. Recientemente, el análisis de un grupo de 241 de pacientes re-evaluó estas observaciones en hombres entre 40 y 70 años de edad sanos y diabéticos sin retinopatía, con retinopatía leve o no proliferativa (con microaneurismas, hemorragias y vasodilatación retiniana pero sin nuevos vasos retinianos) o con retinopatía severa o proliferativa (angiogénesis con desprendimiento de retina) (Figura 7). Los resultados mostraron que los niveles circulantes de la PRL se incrementan en la diabetes pero que

dicho incremento es menor en aquellos pacientes con retinopatía diabética proliferativa (Arnold et al., 2010). El hecho de que la PRL disminuya en la circulación de pacientes diabéticos con el grado más avanzado del padecimiento sugiere que al haber menos sustrato para las proteasas de PRL habría una menor generación de vaso-inhibinas en estas condiciones y, por ende, que una reducción en las vaso-inhibinas pudiera contribuir a la progresión de la retinopatía diabética. En apoyo a estas posibilidades, en un estudio reciente, se reportó que pacientes con retinopatía diabética presentan una concentración menor de vaso-inhibinas en el suero que los individuos no diabéticos (Triebel, Huefner, & Ramadori, 2009). En contraposición a la disminución de la PRL en los cuadros avanzados del padecimiento, sus niveles incrementados observados en la circulación de los pacientes diabéticos en ausencia de retinopatía o ante una retinopatía leve pudieran tener un valor protector vía el favorecer la generación intraocular de vaso-inhibinas. Esta fue la posibilidad que abordamos en la primera parte de este estudio de tesis.



**Figura 7.** Niveles de PRL sérica cuantificados por ELISA en un grupo de pacientes control no diabéticos (C) y diabéticos (D) sin retinopatía (NRD), con retinopatía diabética no proliferativa (NDRP) o con retinopatía diabética proliferativa (RDP). Los resultados son los promedios  $\pm$  error estándar. Los números dentro de la barras corresponden a la n de cada grupo. \* $P \leq 0.001$  vs. control; # $P < 0.05$  vs NRD.

## 5. Antecedentes inmediatos: segunda parte

### 5.1 Fisiología de la visión

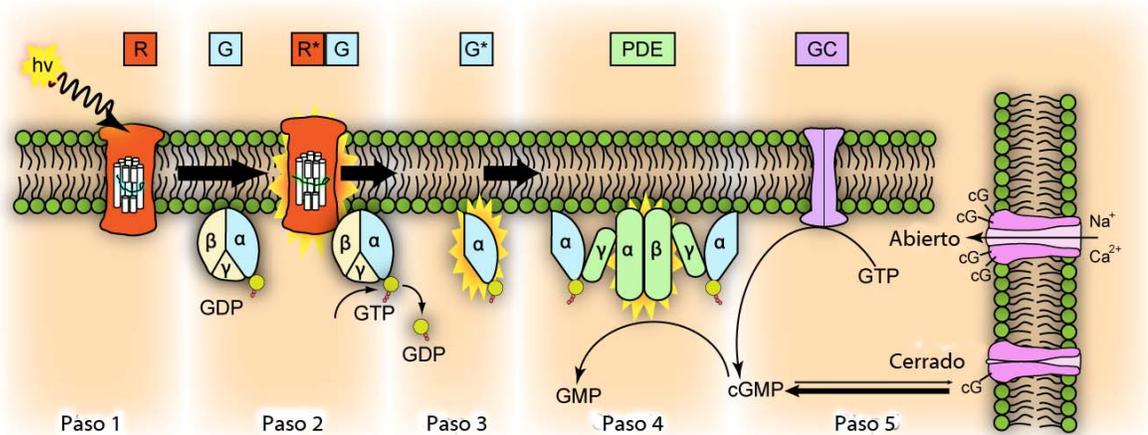
#### 5.1.1. *Los fotorreceptores y la fototransducción*

Los compuestos fotosensibles en los ojos del hombre y de la mayoría de los mamíferos están constituidos por una glucoproteína llamada opsina y el retinal, un derivado de la vitamina A. El pigmento fotosensible que se encuentra en los bastones se llama rodopsina, tiene una sensibilidad máxima a la luz en una longitud de onda de 505 nm y estructuralmente es uno de los muchos receptores transmembranales acoplados a proteínas G. El retinal está unido a tres de los dominios transmembranales de la rodopsina en una posición paralela a la superficie de la membrana. En cuanto a los conos existen tres clases distintas de opsinas en los primates y responden máximamente a luz longitudes de onda luminosas de 440, 535 y 565 nm (azul, verde y rojo, respectivamente) (Oyster, 1999).

La absorción de luz por el fopigmento desencadena la cascada de eventos de la fototransducción, v.gr. la transformación de la energía luminosa en impulsos nerviosos. En la oscuridad, el retinal está en la configuración 11-cis en las membranas de los segmentos externos y los iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) fluyen al segmento externo de los fotorreceptores a través de canales de sodio controlados por ligandos. El ligando que mantiene abiertos dichos canales es el guanosinmonofosfato (GMP) cíclico, o cGMP. El flujo de entrada de  $\text{Na}^+$ , la llamada “corriente oscura”, despolariza parcialmente los fotorreceptores. Como resultado de ello, el potencial de membrana de estos receptores es de unos -30 mV, mucho más cercano a cero que el habitual en las neuronas, que es de -70 mV. Consecuencia de esta despolarización en la oscuridad, los fotorreceptores están secretando constantemente neurotransmisores, siendo estimuladas continuamente las células bipolares en la retina. Cada bastón y cono se conecta con dos células bipolares de distinta naturaleza, unas son estimuladoras (ON) con receptores ionotrópicos que continúan con la polaridad del fotorreceptor y las otras tiene receptores metabotrópicos que las convierten en inhibitorias (OFF), y por lo tanto no continúan con la polaridad del fotorreceptor. La comunicación entre los fotorreceptores y las células bipolares

excitatorias es a través del glutamato, el cual origina una despolarización constante en éstas últimas al unirse a receptores ionotrópicos, por lo tanto cuando se hiperpolariza el fotorreceptor deja de internalizar calcio y no es liberado el neurotransmisor lo cual origina la hiperpolarización de la bipolar; en el caso de las bipolares inhibitorias ocurre lo contrario, pese a que también la comunicación se realiza a través de glutamato, el efecto de éste es mediado por receptores metabotrópicos lo que provoca la apertura de canales de potasio con lo cual logra la hiperpolarización, o sea que en la oscuridad se encuentran así y cuando llega la luz deja de secretarse glutamato y estas bipolares inhibitorias se despolarizan. Estos cambios se transducen a un par de células ganglionares por cada fotorreceptor, una que responde aumentando la frecuencia de los potenciales de acción (ON) y la otra que responde disminuyendo sus potenciales de acción (OFF), lo que en conjunto permite la discriminación de los bordes y/o colores en la imagen (Oyster, 1999).

La única acción de la luz es cambiar la forma del retinal convirtiéndolo en un isómero trans-completo. Esto activa la conversión de rodopsina en una serie de intermediarios. El paso final es la separación del retinal de la opsina (blanqueamiento). La activación de la rodopsina activa a la transducina, una proteína G, que media el reemplazo de GDP por GTP en la subunidad  $\alpha$  de transducina. La subunidad  $\alpha$  que contiene GTP es liberada por la subunidad  $\beta\gamma$  y activa a la fosfodiesterasa por exclusión de una fuerza inhibitoria sobre la molécula. Entonces el GTP sobre la subunidad  $\alpha$  es desdoblado a GDP y las unidades de la transducina se reagrupan, terminando la reacción. Mientras que la fosfodiesterasa activada cataliza la degradación de GMPC en el citoplasma de los fotorreceptores que actúa directamente en los canales de sodio, y la reducción del GMPC produce cierre de los canales y el potencial de membrana se vuelve más negativo, cercano a  $-70$  mV; es decir se hiperpolarizan las membranas de los fotorreceptores y se reduce la liberación de glutamato (Figura 8). Esta cascada de reacciones amplifica la señal luminosa, cada rodopsina activada excita 500 moléculas de transducina, y cada fosfodiesterasa activada hidroliza varios millares de moléculas de GMPC (Oyster, 1999).



**Figura 8.** Esquema de los pasos de la fototransducción. (R, rodopsina; G, proteína G transducina; PDE, fosfodiesterasa; GC, ciclasa de guanilato; GDP, guanosil difosfato; GTP, guanosil trifosfato; GMP, guanosil monofosfato; cGMP, guanosil monofosfato cíclico).

### 5.1.2. La respuesta eléctrica a los estímulos visuales en la retina

Una vez que la luz excita a los fotorreceptores los potenciales se difunden por sus segmentos internos a las terminales sinápticas, donde son liberadas las moléculas de neurotransmisor que van a inducir potenciales graduados locales tanto en las neuronas bipolares como en las células horizontales. Cabe señalar que más de un bastón puede formar sinapsis con una neurona bipolar, mientras que usualmente un solo cono hace sinapsis con una neurona bipolar. La convergencia de muchos bastones en una célula bipolar aumenta la sensibilidad a la luz, mientras que las sinapsis únicas de los conos, son menos sensibles, pero son de mayor agudeza.

Por otra parte las neuronas horizontales ubicadas en las zonas adyacentes al sitio de alta excitación de conos y bastones, hacen conexiones entre estos y sus fotorreceptores vecinos generando señales inhibitorias o potenciadoras de las respuestas de los fotorreceptores que se transmiten a las neuronas bipolares. La inhibición lateral mejora el contraste de la imagen entre las áreas estimuladas intensamente y su alrededor cuya estimulación es menor; mientras la señal de efecto positivo mejorará la resolución espacial. Asimismo, las células horizontales participan en la diferencia cromática. En cuanto a las células amacrinas estas forman conexiones laterales en la capa interna de la

retina con las neuronas bipolares y las ganglionares; son sensibles a los cambios temporales y al ocurrir cambios en el nivel de iluminación, son excitadas por las neuronas bipolares y éstas transmiten la información a las neuronas ganglionares. Las señales excitatorias que reciben las células ganglionares ya sea por las células bipolares o amacrinas van a provocar que estas células se despolaricen e inicien los impulsos nerviosos que viajan por sus axones que conforman el nervio óptico al resto de los elementos neuronales que conforman la vía visual (Tortora, 2002).

### **5.1.3. El Electroretinograma**

El electroretinograma (ERG) en términos generales es un registro de las descargas eléctricas generadas por las células de la retina en respuesta a un estímulo luminoso. En un ERG, el potencial evocado generado por la retina excitada es registrado a una distancia (usualmente la córnea) del fondo. El ERG representa un promedio de todas las células de la retina excitadas por el estímulo de luz (Levin, 2003).

En el ERG, se puede modular la sincronización de la respuesta al estímulo luminoso mediante un estado de adaptación previa (luz u oscuridad), que a la vez permite analizar a cada tipo de fotorreceptor de manera independiente. Una adaptación a la oscuridad (condiciones escotópicas) optimiza la reacción de los bastones, mientras que en una adaptación a luz (condiciones fotópicas) la respuesta predominante es de los conos (Green, 1973).

#### **5.1.3.1 Los componentes del ERG**

El ERG fue el primer biopotencial registrado, pero fue hasta la década de los 40s que se propuso que el ERG comprendía tres procesos diferentes, donde cada uno daba origen a una onda diferente: la onda *a*, la onda *b* y la onda *c* (Granit, 1950). Más adelante se describieron otros elementos del ERG tales como los potenciales oscilatorios. Cada uno de estos componentes tiene características y un origen celular distinto, y se describen a continuación.

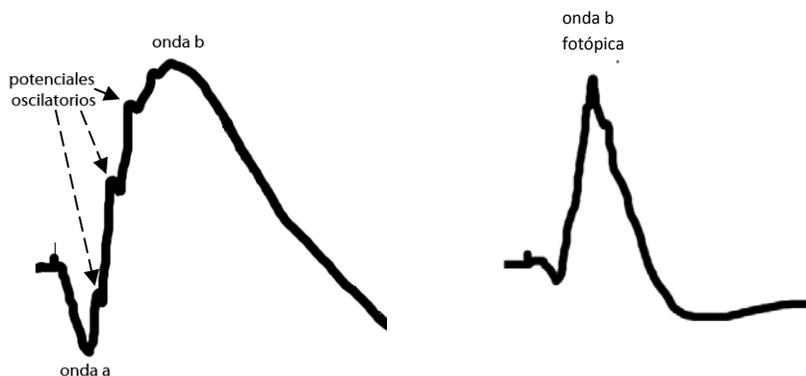
La onda a, la cual es negativa en polaridad y es el componente inicial del ERG. Hasta el momento el consenso ha situado la generación de la onda *a* al nivel de los

fotorreceptores. Dependiendo del estado de adaptación retiniano, tanto los conos solos como conos y bastones pueden contribuir al origen de la onda *a* (Gouras & Hoff, 1970; Nusinowitz, Hood, & Birch, 1995).

La onda b, esta es la más prominente y por ende el componente más importante de la respuesta del ERG. La onda *b* es positiva en polaridad y es generada como un potencial de segundo orden por las células de Müller y las neuronas bipolares (Stockton & Slaughter, 1989).

La onda c, se localiza después de la onda *b*, su polaridad también es positiva y refleja la actividad eléctrica a nivel del epitelio pigmentario de la retina (Weidner, 1976; Wu, Peachey, & Marmorstein, 2004).

Los potenciales oscilatorios, corresponden a los componentes de alta frecuencia del ERG, los cuales son vistos frecuentemente como ondas en la parte ascendente de las ondas *b*. Un análisis de Fourier revela que los potenciales oscilatorios son generalmente de un dominio de frecuencia mayor de 100 Hz. Prácticamente todos los componentes de la retina, con excepción de los fotorreceptores y las células de Müller, han sido sugeridos como posibles candidatos en la generación de los potenciales oscilatorios (Levin, 2003).

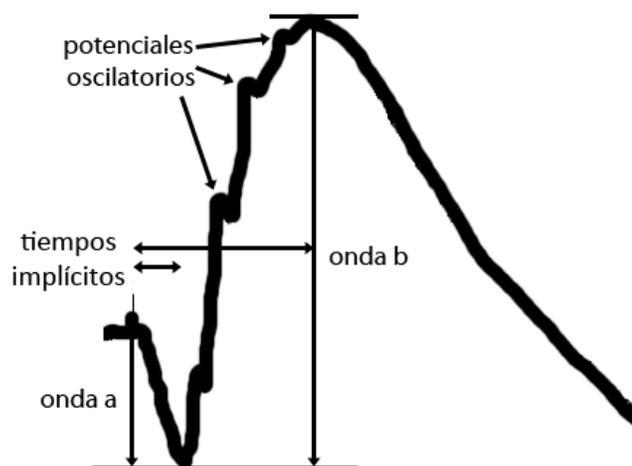


**Figura 9.** Esquema de los componentes de un ERG en condiciones escotópicas y fotópicas en la rata.

### 5.1.3.2. Interpretación y aplicaciones del ERG

El ERG representa la prueba de elección para investigar la funcionalidad de la retina, en su estado normal o alterado como resultado de una patología, envejecimiento o intoxicación. Los parámetros que se miden durante la evaluación del ERG son la amplitud y el tiempo implícito (latencia), de cada uno de los componentes. La amplitud

de la onda *a* se mide desde la línea basal hasta el valle de la onda *a*; mientras que la amplitud de la onda *b* se cuantifica desde el valle de la onda *a* hasta la punta de la onda *b*, ambas en microvoltios. El tiempo implícito o latencia, se mide en milisegundos y se define como el intervalo entre el estímulo y el punto máximo de la onda en cuestión. El mismo análisis de la amplitud y tiempo implícito aplica para los potenciales oscilatorios individuales. Cualquier aumento o disminución de la amplitud o tiempo de cada onda del ERG es un indicio de una patología en la retina, además de que la comparación de las medidas de la onda *a* con la onda *b* permiten identificar el sitio de la retina afectado.



**Figura 10.** Parámetros de evaluación del ERG.

Las respuestas del ERG se modifican en enfermedades retinianas de origen genético, como la retinitis pigmentosa (Sandberg, Weigel-DiFranco, Rosner, & Berson, 1996), la amaurosis congénita de Leber (Lorenz et al., 2000), la ceguera nocturna estacionaria congénita (Sustar, Stirn-Kranjc, Hawlina, & Breclj, 2008), o la distrofias de los conos (Hamel, 2007). También en patologías adquiridas como la retinopatía diabética (Bears, Han, Schneck, & Adams, 2004), el glaucoma (Tafreshi et al., 2010), los procesos inflamatorios (Holder, Robson, Pavesio, & Graham, 2005), el daño fotoquímico (Organisciak & Vaughan, 2010), la retinopatía de origen hepático (Eckstein et al., 1997) o la exposición a tóxicos (Nebbioso, Grenga, & Karavitis, 2009). Todas ellas guardan en

común una afectación de grandes áreas de la retina. En lesiones retinianas focales no se presenta ninguna alteración del ERG (Scholl & Zrenner, 2000).

En numerosas ocasiones el ERG ha mostrado ser una valiosa herramienta para los científicos que desean investigar el efecto de sustancias neuroactivas en la función de la retina. La metodología del ERG implementada en el humano puede ser utilizada con pequeñas modificaciones en toda clase de especies animales tales como: perros, ratas, ratones, cerdos, aves, y conejos, por nombrar algunas (Rosolen, Rigaudiere, Le Gargasson, & Brigell, 2005).

#### **5.1.4 La PRL y la biología celular de la visión**

Desde hace treinta años, se reportaron efectos de la PRL asociados con la visión en vertebrados inferiores. Así, se mostró que esta hormona incrementa la síntesis de pigmentos visuales en teleosteos (Allen & Cristy, 1978; Crim, 1975a), y en anfibios que atraviesan por una segunda metamorfosis (Crim, 1975b). Más recientemente, utilizando herramientas de bioinformática se encontró que existe un nuevo gen para PRL en los vertebrados no mamíferos, que se expresa principalmente en el ojo y en el cerebro, y es capaz de activar al receptor de PRL, y su remoción en un modelo transgénico provoca una disminución en la capa nuclear interna, lo que indica que juega un papel en el desarrollo de la retina de los teleostos (Huang et al., 2009). En cuanto a los mamíferos, en estudios encaminados a investigar la relación entre el estatus hormonal y la susceptibilidad al daño luminoso en la retina, se encontró que la hipofisectomía protegía de la degeneración de los fotorreceptores y la administración de PRL revertía esta protección (O'Steen & Kraer, 1977). Este hallazgo se interpretó como que la PRL tenía una influencia regulatoria en el efecto de la hipófisis en la destrucción retiniana.

En apoyo a la posible acción de la PRL sobre la funcionalidad de la retina, registros electroretinográficos de mujeres con hiperprolactinemia primaria en la adaptación a la oscuridad muestran una menor sensibilidad de los conos (Fulton et al., 1989), mientras que la hiperprolactinemia que caracteriza los últimos meses de gestación en la mujer se asocia con un aumento en la amplitud de la onda *b* del electroretinograma en comparación con las mujeres no embarazadas (De Luca Brunori et al., 1985). Cabe

mencionar, que el tejido nervioso es un blanco bien conocido de la PRL. En roedores, la PRL estimula la neurogénesis en el bulbo olfatorio durante gestación (Shingo et al., 2003) e incrementa la proliferación de oligodendrocitos lo cual repercute en una mayor mielinización de los axones en el sistema nervioso central en esta fase del ciclo reproductor (Gregg et al., 2007).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pérdida de la visión a consecuencia de un daño en la retina provoca discapacidad y afecta de manera considerable la calidad de vida. En el caso concreto de la pérdida de la visión en pacientes con la retinopatía diabética, las cifras de persona enfermas en nuestro país son alarmantes, se calcula que este padecimiento tiene una prevalencia de 31.6% y una incidencia de hasta el 71% en personas que padecen diabetes por más de 10 años. El incremento en la permeabilidad de los vasos de la retina es de los primeros signos que se presentan en la retinopatía diabética, de aquí que en los últimos años ha habido un gran interés en desarrollar fármacos capaces de inhibir estas etapas tempranas y controlar así el progreso de la patología. En este sentido, el potente efecto inhibitorio de la vasopermeabilidad retiniana de las vasoinhibinas apoya a estos péptidos como agentes terapéuticos potenciales contra la retinopatía diabética. Pero además, dado que las vasoinhibinas derivan del procesamiento proteolítico de la hormona PRL, es posible proponer que la PRL y las vasoinhibinas endógenas influyen sobre la progresión de la retinopatía diabética. El hecho que pacientes diabéticos sin retinopatía presentan niveles incrementados de PRL en la circulación con respecto a los pacientes con el grado más avanzado de retinopatía diabética, apoya la posibilidad de que el aumento en los niveles sistémicos de la PRL favorece la generación de vasoinhibinas intraoculares y, por ende, puede proteger contra la retinopatía diabética. Al respecto, en la primera parte de este trabajo investigamos la contribución de la PRL circulante a la generación de vasoinhibinas intraoculares y si dicha conversión reduce el aumento de la vasopermeabilidad retiniana que tiene lugar en ratas diabéticas.

Por otra parte, la presencia del receptor de la PRL en la retina sugiere el que esta hormona también puede actuar en este tejido en forma independiente a las vasoinhibinas. Dado que la PRL es un factor trófico y protector (anti-apoptótico) en diversos tipos celulares, en la segunda parte de este estudio nos avocamos a investigar si el aumento en los niveles circulantes de la PRL puede proteger contra la pérdida de la funcionalidad de la vía visual en respuesta a un daño luminoso.

### **III. HIPÓTESIS**

1. La PRL circulante es procesada intraocularmente a vaso inhibinas que inhiben el aumento en la vasopermeabilidad retiniana debida a la diabetes.
2. La PRL circulante actúa a través de su receptor en la retina inhibiendo la apoptosis y la disfunción de la vía visual ocasionadas por la exposición a luz continua.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo general**

Demostrar la participación de la PRL circulante en la generación de vaso inhibinas intraoculares y en la supervivencia y función de las neuronas en la retina.

#### **4.2. Parte 1**

##### **Objetivos particulares**

- A. En ratas adultas hiperprolactinémicas:
  1. Determinar si las vaso inhibinas se incrementan en la retina y si dicho incremento depende de la hiperprolactinemia.
  2. Analizar si el incremento de las vaso inhibinas en la retina es dependiente del receptor de PRL.
  3. Evaluar si se inhiben los incrementos en el área vascular y en la vasopermeabilidad de la retina inducidos por la inyección intraocular de VEGF.
- B. En ratas adultas hiperprolactinémicas diabéticas:
  1. Determinar si las vaso inhibinas se incrementan en la retina y si dicho incremento depende de la hiperprolactinemia.
  2. Evaluar si se inhibe el incremento en la vasopermeabilidad retiniana.

C. En ratones knockout para el receptor de PRL:

1. Determinar los niveles de vasoinhibinas en la retina.

#### **4.3. Parte 2**

##### **Objetivos particulares:**

A. En ratas adultas:

1. Determinar si la inyección intraocular de PRL o el aumento en sus niveles circulantes (hiperprolactinemia) modifica la apoptosis de los fotorreceptores inducida por la exposición a luz continua.
2. Determinar si la inyección intraocular de PRL modifica los niveles de rodopsina en la retina tras la exposición a luz continua.
3. Determinar si el aumento en los niveles de PRL circulante (hiperprolactinemia) rescata las alteraciones en el electroretinograma inducidas por la exposición a luz continua.
4. Investigar si la exposición a luz continua induce cambios en la expresión del receptor de PRL en la retina.

B. En ratones knockout para el receptor de PRL:

1. Evaluar la estructura anatómica de la retina.
2. Analizar posibles alteraciones en el electroretinograma.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Reactivos y anticuerpos

La PRL de rata (grado biológico) se obtuvo del Programa Nacional de Hormonas e Hipófisis de los Institutos Nacionales de Salud de EUA (NHPP, Torrance, CA, EUA). El VEGF recombinante humano fue donado por Genetech (rhVEGF165, South San Francisco, CA). La estreptozotocina (#cat 85822), el isotiocianato de fluoresceína (#cat FD-2000S) y el colorante Azul de Evans (#cat E2129) se obtuvieron de Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). En los Western blots se utilizó un anticuerpo anti-PRL monoclonal (dilución 1:500, INN-1) donado por el Dr. Peter Berger (Academia Nacional de Ciencias de Austria, Innsbruck, Austria), un anticuerpo anti-PRL policlonal (dilución 1:500, AFP-131078, NIDDK, Bethesda, MD) y para evaluar a la  $\beta$ -tubulina como control de carga, se empleó un anticuerpo policlonal anti- $\beta$ -tubulina (dilución 1:500; ab6046, Abcam Inc. Cambridge, MA). Para inmunohistoquímica se emplearon el anticuerpo monoclonal anti-receptor de PRL T6 (NB300-531, Novus Biologicals, LLC, Littleton, CO) y el anticuerpo policlonal anti-GFAP (AB5804, Millipore, Billerica, MA) que identifica células gliales de Müller. Para el bioensayo de PRL que utiliza la línea celular Nb2 se empleó un anticuerpo policlonal anti-PRL de rata (C-2), previamente caracterizado (Duenas et al., 2004), o un anticuerpo policlonal anti-PRL recombinante de ratón (AFP-131078, NIDDK, Bethesda, MD).

### 5.2 Animales

Ratas macho albinas de la cepa Wistar (250-300 gramos) y ratones deficientes del receptor de PRL y ratones silvestres de la misma edad (9 semanas, cepa 129SvJ) se mantuvieron y manejaron de acuerdo al reglamento de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología de EUA (ARVO). El comité de bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) aprobó todos los protocolos experimentales utilizados. Los animales se anestesiaron mediante la inyección intraperitoneal (i.p.) de una solución 70% de ketamina/30% de xilacina (1  $\mu$ l/g de peso corporal). La diabetes se indujo mediante la inyección i.p. de 60mg/Kg de

estreptozotocina en un amortiguador de citratos 10 mM (pH 4.5) por 75 días. Los niveles de glucosa en sangre se midieron con un glucómetro comercial (Accu-Chek Active, Roche) 48 horas después de la inyección de estreptozotocina, y las ratas que tuvieron una concentración de glucosa en la sangre  $\geq 250$  mg/dL fueron consideradas diabéticas (Navaratna, McGuire, Menicucci, & Das, 2007).

### **5.3 Inducción de la hiperprolactinemia**

La hiperprolactinemia se indujo mediante la implantación de dos hipófisis anteriores debajo de la cápsula renal, utilizando el método previamente descrito (Adler, 1986). Este es un método convencionalmente aceptado que se basa en que el trasplante de las hipófisis a la cápsula renal les permite escapar del control hipotalámico inhibitorio de la síntesis y secreción de PRL, que fundamentalmente depende de la dopamina (Adler, 1986; Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). De esta manera, las hipófisis trasplantadas secretan tónicamente altos niveles de PRL a la circulación que alcanzan su nivel máximo a los 15 días y se mantienen elevados por espacio de varios meses (Obal, Kacsoh, Bredow, Guha-Thakurta, & Krueger, 1997; Sato et al., 1997). Los animales control fueron sometidos a una cirugía similar pero sin ninguna implantación. Diez días después de la cirugía, las ratas implantadas y las no implantadas fueron inyectadas i.p. diariamente con el vehículo o el agonista dopaminérgico, bromocriptina (5 mg/Kg de peso corporal), por espacio de 5 días. Al cabo de este tiempo, los animales se sacrificaron y el suero y sus retinas se recolectaron para evaluar los niveles de PRL y vasoinhibinas, respectivamente. En otros experimentos, las ratas con o sin implantes hipofisarios por 15 días fueron anestesiadas e inyectadas intraocularmente con solución amortiguadora de fosfatos o con VEGF humano recombinante (300 ng). Después de 24 horas, las hemorragias y la vasopermeabilidad retinianas se evaluaron mediante fluoroangiografía y el ensayo del azul de Evans, respectivamente. Finalmente, para inducir un estado diabético, las ratas con o sin implantes hipofisarios por 15 días fueron inyectados o no con una dosis única i.p. de estreptozotocina después del ayuno en la noche previa. Después de 75 días, los animales fueron anestesiados mediante su exposición a una atmósfera saturada de CO<sub>2</sub> y decapitados para determinar los niveles de PRL en el suero y de vasoinhibinas en la retina o bien anestesiados con ketamina/xilacina para evaluar el grado de vasopermeabilidad

retiniana mediante el ensayo del azul de Evans. Adicionalmente, algunos grupos de ratas diabéticas y no diabéticas, con o sin implantes hipofisarios, fueron inyectados diariamente con bromocriptina 5 días antes del sacrificio.

#### **5.4 Medición de los niveles de PRL en el suero**

Los niveles séricos de PRL en los diferentes grupos experimentales de ratas y ratones se determinaron mediante el bioensayo con células Nb2. Estas células son derivadas de linfocitos T aislados de un linfoma murino cuya proliferación es dependiente de PRL. Este bioensayo se utiliza convencionalmente para determinar la concentración de PRL en el suero (Tanaka et al., 1980), tiene una sensibilidad siete veces mayor al ELISA y al radioinmunoensayo (0.3 ng/ml vs. 2 ng/ml, respectivamente) y permite evaluar a las PRLs de diferentes especies. La especificidad del ensayo se demostró mediante el bloqueo de los efectos mitogénicos de la PRL mediante anticuerpos anti-PRL de la especie en cuestión. En este estudio se empleó el anticuerpo policlonal anti-PRL de rata (C-2, dilución 1:10000), previamente caracterizado (Duenas et al., 1999) o el anticuerpo policlonal anti-PRL de ratón (AFP-131078, dilución 1:1000). Las células Nb2 se crecieron y cultivaron en medio de mantenimiento (DMEM alta glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino, 10% de suero de caballo, 94.6  $\mu$ M de 2-mercaptoetanol y antibióticos) y veinticuatro horas antes del ensayo, las células ( $1 \times 10^6$  células/ml) se sincronizaron en medio estacionario (DMEM alta glucosa suplementado con 1% suero fetal bovino, 10% de suero de caballo, 2-mercaptoetanol y antibióticos). Placas de cultivo de 96 pozos se adicionan por triplicado con 5  $\mu$ l de suero llevados a un volumen de 120  $\mu$ l con medio de bioensayo (DMEM alta glucosa suplementado con 10% de suero de caballo, 2-mercaptoetanol y antibióticos) conteniendo o no el anticuerpo anti-PRL y esta combinación se incubó durante media hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pozo diluidas en 80  $\mu$ l de medio para tener un volumen final de 200  $\mu$ l por pozo. Concentraciones crecientes de PRL estándar de rata o ratón y de las muestras problema se adicionaron por triplicado para obtener una curva dosis-respuesta contra la cual comparar las respuestas proliferativas. La incubación se llevó a cabo durante 72 horas a 37°C, al término de las cuales la proliferación de las células Nb2 se

midió mediante el ensayo colorimétrico con MTT [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil bromuro de tetrazolium, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO] (Cajero-Juarez et al., 2002). El producto colorido fue leído en un espectrofotómetro de placa (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA) a una longitud de onda de 595 nm, la densidad óptica resultante para cada muestra se extrapoló en la curva de dosis-respuesta de PRL.

### **5.5 Análisis por Western blot**

Conjuntos de 4 retinas de rata o 6 retinas de ratón fueron homogenizados en una solución de lisis con inhibidores de proteasas (0.5% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 100 µg/ml fluoruro de fenilmetilsulnonilo, 1 µg/ml aprotinina, pH 7), centrifugados a 9600 x *g* durante 10 minutos. La concentración de proteína total en los sobrenadantes se determinó mediante el método convencional (Noble & Bailey, 2009). Cincuenta µg de dicha proteína se procesaron en geles de SDS-poliacrilamida al 15% bajo condiciones reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal anti-PRL INN-1 (dilución 1:500) dirigido contra el extremo amino terminal de la hormona (Aranda et al., 2005), o con un antisuero anti-PRL de ratón (dilución 1:500, AFP-131078, NIDDK, Bethesda, MD). En todos los Western blots la región correspondiente al tamaño de la -β tubulina (50 kDa) fue incubada con un anticuerpo anti-β-tubulina (dilución 1:500, ab6046, Abcam Inc. Cambridge, MA) como control de carga. Los complejos antígeno-anticuerpos fueron detectados mediante anticuerpos secundarios conjugados a la enzima fosfatasa alcalina (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA). Los valores de densidad óptica se determinaron empleando el software de análisis Quantity One 1-D (Bio-Rad, Hércules, CA).

### **5.6 Fluoroangiografía retiniana**

Veinticuatro horas después de la inyección intraocular de VEGF o vehículo, las ratas control e hiperprolactinélicas fueron anestesiadas e inyectadas a través de la yugular con una solución de isotiocianato de fluoresceína de alto peso molecular (100 mg/ml, FITC-dextran, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a una dosis de 50 mg/Kg y una hora

después los animales fueron anestesiados con CO<sub>2</sub>, decapitados y sus ojos enucleados. Las retinas fueron disectadas en montajes planos y fijadas por inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS 0.1M (pH 7.4) durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los montajes fueron lavados cuatro veces en PBS (por 5 minutos cada vez), montados en portaobjetos y embebidos en un medio de inclusión para fluorescencia (agua/glicerol, 50:50). La vasculatura se examinó con un microscopio de fluorescencia a una magnificación de 4X (Olympus BX60 con la cámara DP70 Olympus) y las imágenes fueron digitalizadas y evaluadas utilizando un programa de análisis de imágenes (Image Pro-Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD). El contorno de la red vascular de cada montaje se delineó y su superficie se calculó para determinar el porcentaje de área vascular con respecto al área total de la retina evaluada. Se promediaron los valores de diez retinas procesadas de ésta manera.

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

La permeabilidad vascular retiniana se cuantificó mediante el ensayo del colorante azul de Evans de acuerdo al método descrito (Qaum et al., 2001). Este ensayo 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 al espacio extracelular. El azul de Evans (45 mg/Kg de una solución de 30 mg/ml) fue inyectado en la vena yugular de ratas anestesiadas y al cabo de 2 horas, los animales se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> y se perfundieron con PBS (pH 3.5). Las retinas fueron extraídas, secadas mediante su exposición al vacío por 5 horas (SPD 1010 SpeedVac System; ThermoSavant, EUA) y su peso seco determinado. Luego, las retinas se sometieron a una digestión orgánica en formamida por 18 horas a 72°C, y se centrifugaron a 70,000 rpm por 1 hora. 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). Concentraciones crecientes de azul de Evans en formamida fueron cuantificadas por triplicado para obtener una curva estándar con la cual calcular la concentración de las muestras procesadas.

## **5.8 Modelo de daño retiniano por exposición luminosa**

Todos los animales fueron mantenidos en un ciclo luz-oscuridad de 12 horas, con una intensidad de la luz ambiental normal que es de aproximadamente de 400 lux. Las ratas fueron inyectadas intraocularmente con 2  $\mu$ l del vehículo [amortiguador de fosfatos (PB) 0.1M, pH 7.2] solo o conteniendo 1  $\mu$ g de PRL de rata, o bien hechas hiperprolactinémicas durante 15 días, e inmediatamente después sometidas o no a un daño por exposición continua a luz blanca por 48 horas. La luz constante con un nivel de iluminación de 1200 a 1500 lux derivó de dos focos de luz blanca de 40-W colocados a 50 cm sobre el piso de la jaula. Después de la exposición luminosa los animales fueron inmediatamente sacrificados para evaluar la apoptosis celular en sus retinas, o sometidos a 24 horas de oscuridad para posteriormente evaluar la funcionalidad retiniana mediante el electroretinograma. La concentración de rodopsina se cuantificó inmediatamente o 15 días después de la exposición luminosa de acuerdo al método previamente reportado (Maeda et al., 2006).

## **5.9 Recolección del tejido y procesamiento**

La retina del ojo derecho de cada rata fue disecada, congelada y almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso para evaluar el nivel de apoptosis por ELISA. El ojo izquierdo se fijó por inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS 0.1M (pH 7.3) durante 3 horas a temperatura ambiente, después se lavó cuatro veces en PBS 0.1M por intervalos de 5 minutos antes de ser sumergido en una solución de sacarosa al 15% durante toda la noche a temperatura ambiente para su crioprotección. Posteriormente, los ojos se orientaron e incluyeron en medio de congelación O.C.T. (Tissue-tek, Sakura Finetek Europe B.V., Holanda) en criomoldes plásticos y congelados rápidamente sumergiendo los moldes en un baño de etanol enfriado con nitrógeno líquido. Finalmente, se obtuvieron criosecciones de 14 micras de la región sagital del ojo que se recolectaron en portaobjetos gelatinizados y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su evaluación. Los ojos de los ratones se procesaron para histoquímica en parafina, se fijaron en solución de Davidson (formalina al 40%, etanol al 95%, ácido acético glacial y agua destilada), se deshidrataron y embebieron en parafina.

Algunas secciones histológicas de 8  $\mu\text{m}$  fueron procesadas para tinción de hematoxilina-eosina.

### **5.10 ELISA para cuantificar muerte celular**

El sistema de detección de muerte celular por ELISA (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) es un método cuantitativo que permite valorar el nivel de apoptosis a través de cuantificar el DNA nucleosomal fragmentado asociado con células apoptóticas. Se empleó siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **5.11 Cuantificación de rodopsina**

Las retinas se disecaron en condiciones de luz roja tenue; enseguida la rodopsina se extrajo de retinas individuales con 500  $\mu\text{l}$  de una solución bis-Tris-propano, 20 mM pH 7.5, que contiene *n*-dodecil- $\beta$ -maltosido 10 mM e hidrazina 5 mM (recién neutralizada). El tejido se homogenizó y agitó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos, se recolectaron los sobrenadantes y se repitió la misma operación una vez más. Los sobrenadantes combinados se centrifugaron a 50000 rpm durante 10 minutos y se determinó la concentración de rodopsina en la retina por espectrofotometría a 490 nm antes y después del blanqueo de la rodopsina por la exposición de las muestras a luz blanca intensa (focos incandescentes de 60 W) durante 12 minutos. La concentración de rodopsina se calculó considerando la disminución en la densidad óptica a 490 nm y el coeficiente de extinción molar,  $c=42000\text{M}/\text{cm}$ .

### **5.12 Tinción de hematoxilina-eosina de secciones incluidas en parafina**

Secciones histológicas (8  $\mu\text{m}$ ) de ojos de ratón incluidas en parafina fueron desparafinadas a 60°C durante 30 minutos, lavadas por dos períodos de 5 minutos con xileno, hidratadas en un gradiente de alcoholes (etanol absoluto al 95% y 80% cada uno por 5 minutos), teñidas con hematoxilina-eosina (por 8 minutos y 1 minuto, respectivamente) y nuevamente deshidratadas en una serie de alcoholes y xileno para finalmente ser montadas en medio Entellan (cat. 1.07961, Merck Darmstadt, Germany).

### **5.13 Inmunohistoquímica**

Las laminillas con las criosecciones se sumergieron en una solución de SDS al 1% en PBS 0.1M durante 5 minutos para la reactivación de los antígenos y luego se lavaron 3 veces por lapsos de 5 minutos con PBS para retirar los restos de SDS que pudieran inactivar a los anticuerpos. Posteriormente, las secciones se incubaron en solución de bloqueo (PBS 0.1M pH 7.4, Triton X-100 al 0.1% y suero normal de cabra al 10%) durante una hora a temperatura ambiente, seguida de la incubación con una mezcla de los anticuerpos primarios dirigidos contra el receptor de PRL (dilución 1:100, en PBS 0.1M pH 7.4, Triton X-100 al 0.1% y suero normal de cabra al 3%) y contra la proteína GFAP (dilución 1:500) durante toda la noche a 4°C en un ambiente húmedo. Subsecuentemente, las secciones se lavaron en PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a partículas fluorescentes AlexaFluor 488 y 594 (dilución 1:1000 en PBS 0.1M pH 7.4, Triton X-100 al 0.1% y suero normal de cabra al 3%; Molecular Probes) durante 1 hora a temperatura ambiente. Secciones sin anticuerpo primario fueron empleadas como control de unión inespecífica del anticuerpo secundario. La inmunofluorescencia fue evaluada con un microscopio confocal (Zeiss Axiovert 200 LSM 510 Meta, Carl Zeiss International) y las imágenes digitalizadas con un programa (Zeiss LSM Image Examiner) acoplado al microscopio.

### **5.14 Electroretinogramas**

Después de un período de adaptación a la oscuridad de 12 horas los animales se anestesiaron con ketamina/xilacina y se sujetaron con ayuda de un instrumento estereotáxico bajo condiciones iluminación roja tenue, que no activa a los fotorreceptores, a una temperatura constante de 37 °C. Las pupilas se les dilataron con una gota de T-P (clorhidrato de tropicamida-fenilefrina, Laboratorios Sophia, Guadalajara, México). Las respuestas del ERG se registraron con un electrodo anular de plata de 2 mm de diámetro colocado sobre la región central de la córnea de cada ojo. Dos electrodos de referencia se colocaron subcutáneamente en sitios de la cabeza cercanos a los ojos. Posteriormente, los animales fueron re-adaptados a la oscuridad durante 20 minutos. La estimulación luminosa se aplicó en trenes de 16 pulsos donde cada pulso emitido por el fotoestimulador (PhotoStimulator, PS33 Plus, GRASS, Warwick, RI, USA) tuvo una duración de 0.7

milisegundos y una frecuencia de un destello cada 10 segundos, lo que permitió asegurar la recuperación completa de la respuesta antes del siguiente pulso. Series de dieciséis pulsos con cuatro intensidades de fotoestimulación (0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 log cd.s/m<sup>2</sup>) se emplearon en el registro escotópico. La señal se amplificó 200 veces y los filtros se ajustaron de 0.1 Hz a 10 KHz (P511, Rackmount High Performance AC Preamplifier, GRASS, Warwick, RI, USA). Al terminar el registro en condiciones escotópicas, los animales se adaptaron a la luz ambiental durante 10 minutos para proceder al registro fotópico, en el cual la estimulación solamente se efectuó a la intensidad máxima (1.2 log cd.s/m<sup>2</sup>). Para el análisis cuantitativo de los registros se utilizó el programa Spike2 (Cambridge Electronic, Cambridge, Inglaterra) y en ambos ojos se midió la amplitud y los tiempos implícitos de la onda *a* y *b* del ERG escotópico y la onda *b* del ERG fotópico. Los potenciales oscilatorios fueron aislados digitalmente mediante el uso de un filtro digital de 100-500 Hz.

### **5.15 Análisis estadístico**

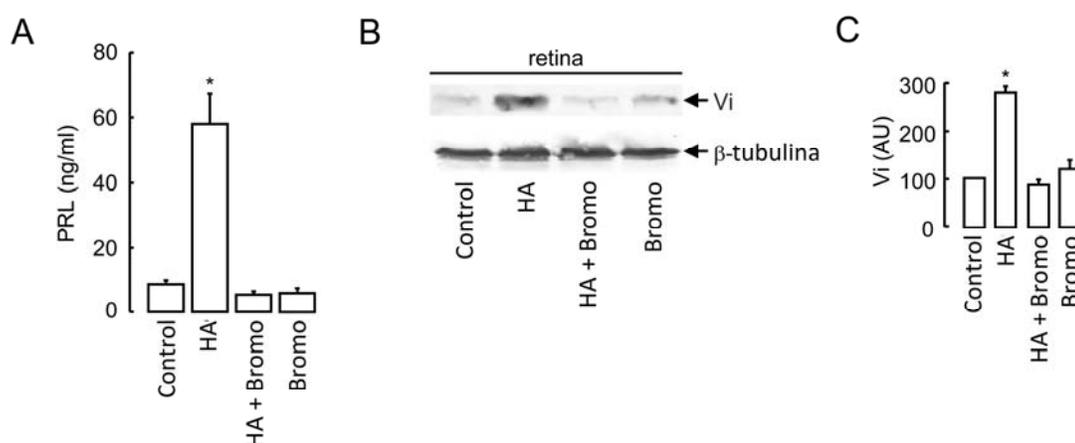
Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar de la media. La significancia estadística se determinó por el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de t-Student no pareada o pareada según el caso. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa Sigma Stat 7.0 (Sigma Stat 7.0. Systat Software Inc., San José, CA). Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 PARTE 1

#### 6.1.1 La PRL sistémica es incorporada al ojo y convertida a vasoinhibinas.

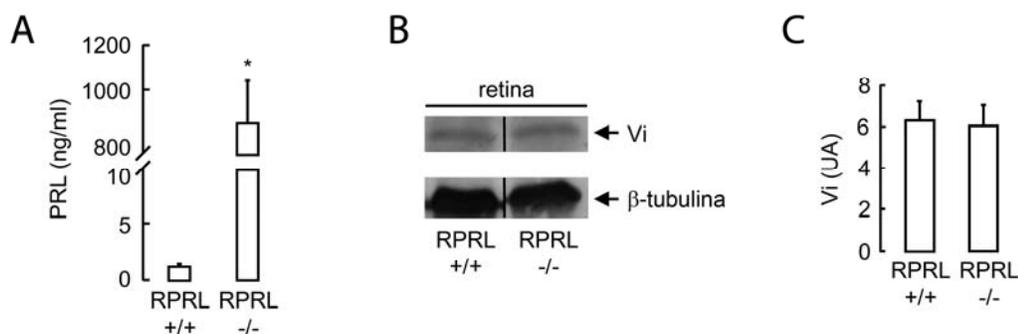
Para investigar si la PRL sérica puede servir como una fuente de vasoinhibinas retinianas, utilizamos un modelo de rata hiperprolactinémica (HA) inducida mediante la implantación de dos adenohipófisis bajo la cápsula renal durante 15 días (Adler, 1986). El análisis mediante el bioensayo de las células Nb2 y Western blot mostró que las ratas implantadas con las hipófisis anteriores mostraron un incremento en los niveles de PRL en el suero seis veces mayor al grupo control de animales no implantados (**Fig. 11 A**,  $n=20$ ). Asimismo, se midió un aumento tres veces mayor de vasoinhibinas en la retina (**Fig. 11 B,C**,  $n=3$ ) de las ratas hiperprolactinémicas comparadas con los controles normoprolactinémicos. La inyección de las ratas implantadas con bromocriptina, un agonista dopaminérgico e inhibidor de la secreción de PRL, redujo tanto la concentración de PRL circulante como de vasoinhibinas en la retina a niveles basales no diferentes a los controles respectivos (**Fig. 11 A-C**).



**Figura 11.** La hiperprolactinemia resulta en niveles más altos de vasoinhibinas en la retina. (A, B, C) Ratas implantadas (HA) o no (control) con dos adenohipófisis bajo la cápsula renal por 15 días, inyectadas o no con bromocriptina (Bromo). (A) Evaluación de los niveles de PRL sérica medidos con el bioensayo de las células Nb2. \* $P < 0.05$  vs. control ( $n=20$  ratas por grupo). (B) Análisis por Western blot

de los niveles de vaso inhibinas en la retina y (C) su cuantificación mediante el análisis densitométrico normalizado para  $\beta$ -tubulina.  $*P < 0.05$  vs. control ( $n=3$ , cada uno correspondiente al conjunto de cuatro retinas). Los datos son promedios  $\pm$  errores estándar de la media.

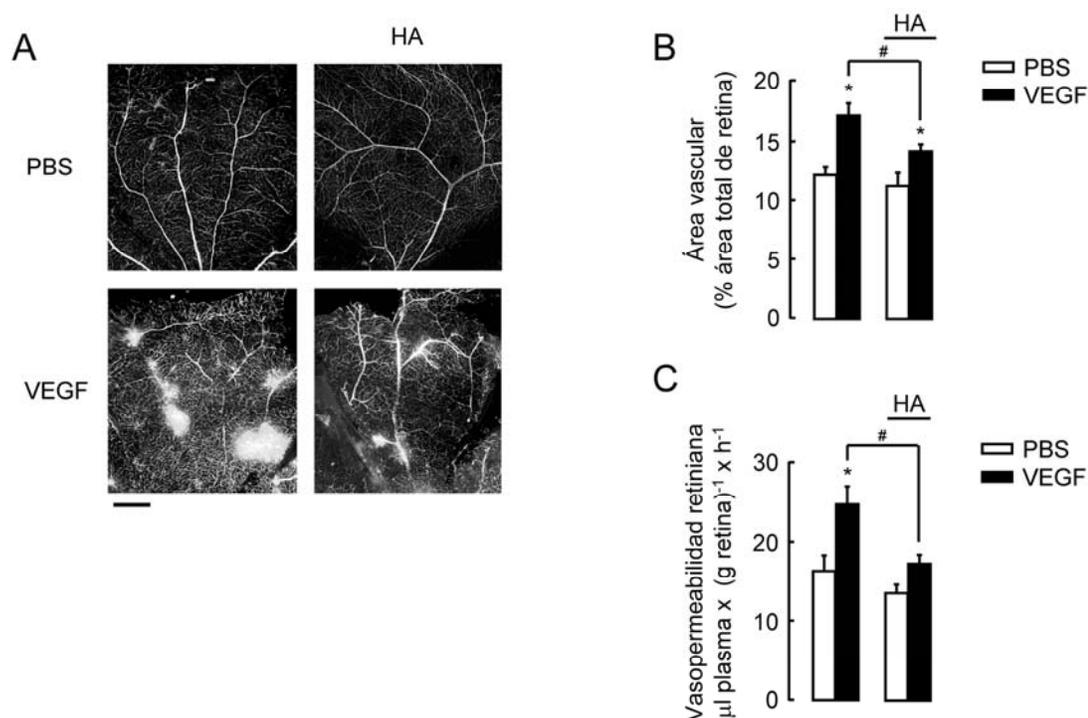
Se conoce que el receptor de PRL está presente en el cuerpo ciliar (Rivera López, 2008), la estructura responsable de incorporar factores sistémicos a los fluidos oculares. Para investigar si el receptor de PRL puede mediar la incorporación de la prolactina sérica y su transferencia hacia el vítreo, analizamos la presencia de vaso inhibinas retinianas en ratones deficientes del receptor de PRL (RPRL<sup>-/-</sup>). Se sabe que los ratones RPRL<sup>-/-</sup> son hiperprolactinémicos debido a que la ausencia del receptor de PRL interrumpe el asa de retroalimentación negativa que ejerce la PRL sobre su propia secreción (Ormandy et al., 1997). Consistentemente, los ratones RPRL<sup>-/-</sup> presentaron niveles de PRL sérica 700 veces mayores que los de los ratones silvestres (**Fig. 12A**,  $n=8$ ). A pesar de este alto nivel de hiperprolactinemia, los niveles de vaso inhibinas en la retina de los ratones RPRL<sup>-/-</sup> fueron similares a los de su contraparte silvestre (**Fig. 12 B, C**,  $n=3$ ).



**Figura 12.** (A) Niveles de PRL sérica evaluados mediante el bioensayo de las Nb2 en los ratones silvestres (RPRL<sup>+/+</sup>) y carentes del receptor de PRL (RPRL<sup>-/-</sup>)  $*P < 0.05$  vs. ratones RPRL<sup>+/+</sup> ( $n=8$  ratones por grupo). (B) Western blot representativo de las vaso inhibinas en la retina de ratones RPRL<sup>+/+</sup> y RPRL<sup>-/-</sup>. (C) Evaluación densitométrica de la concentración de vaso inhibinas normalizada para  $\beta$ -tubulina ( $n=3$ , cada uno correspondiente al conjunto de 6 retinas). Los datos son promedios  $\pm$  error estándar de la media.

### 6.1.2. Niveles altos de PRL sistémica mitigan el incremento en la vasopermeabilidad retiniana en respuesta a la inyección intraocular del VEGF.

Para investigar si el aumento en las vasoinhibinas retinianas debido a la hiperprolactinemia pudiera tener un valor protector contra la excesiva vasopermeabilidad local, ratas hiperprolactinémicas fueron inyectadas intraocularmente o no con VEGF, que es el principal factor inductor de vasopermeabilidad en la retinopatía diabética (Caldwell et al., 2003). El VEGF produjo un aumento en la vasopermeabilidad retiniana medido a través de múltiples áreas de hemorragias reveladas por fluoroangiografía (**Fig. 13 A, B**) y del incremento de la extravasación de albúmina a través del método de azul de Evans (**Fig. 13 C**). Las alteraciones vasculares inducidas por el VEGF en la retina fueron significativamente menores en los animales hiperprolactinémicos (HA) (**Fig. 13**).

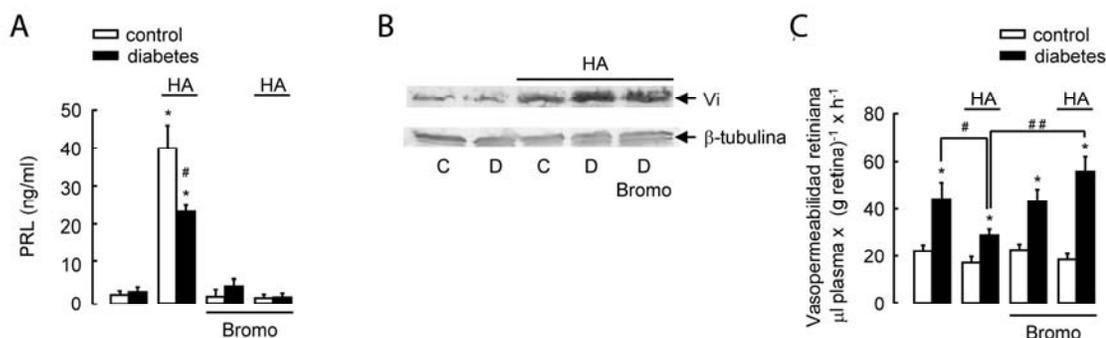


**Figura 13.** La hiperprolactinemia mitiga el incremento en la vasopermeabilidad retiniana inducida por la inyección intraocular de VEGF. (A, B, C) Ratas implantadas (HA) o no con 2 adenohipófisis bajo la cápsula renal fueron inyectadas intraocularmente con PBS o VEGF y examinadas 24 horas después. (A) Imágenes representativas de la fluoroangiografía de las retinas. (B) Cuantificación del área vascular fluorescente de diez montajes planos de retinas en cada grupo. Barra de escala=500 µm. (C) Vasopermeabilidad retiniana

determinada mediante el ensayo del azul de Evans. \* $P < 0.05$  vs. PBS, # $P < 0.05$  vs ratas inyectadas con VEGF no implantadas ( $n=3$  experimentos independientes).

### **6.1.3 Niveles altos de PRL sistémica mitigan el incremento en la vasopermeabilidad retiniana en ratas diabéticas.**

Para investigar si el aumento en las vaso-inhibinas retinianas debido a la hiperprolactinemia pudiera tener un valor protector contra la vasopermeabilidad excesiva debida a la diabetes, se indujo diabetes mediante la inyección de estreptozotocina en ratas implantadas o no con las adenohipófisis. Los niveles de PRL en el suero fueron similares en las ratas diabéticas en comparación con los de las controles no diabéticos (**Fig. 14 A**). En los animales con las adenohipófisis implantadas, el incremento en los niveles de PRL sistémica fue mayor en los animales no diabéticos que en los diabéticos (13 veces vs 8.5 veces, respectivamente) y, en ambos casos, se bloqueó mediante el tratamiento con bromocriptina (**Fig. 14 A**). Consistentemente con estos cambios en la concentración de PRL sérica, los niveles de vaso-inhibinas se elevaron en la retina de las ratas implantadas con las adenohipófisis y la administración de bromocriptina redujo este incremento (**Fig. 14 B**), corroborando que la hiperprolactinemia incrementa los niveles de vaso-inhibinas en la retina. Posteriormente, confirmamos que la vasopermeabilidad retiniana se encuentra incrementada en los animales diabéticos ( $P \leq 0.011$ ). Notablemente, la magnitud de este incremento fue significativamente menor en las ratas diabéticas hiperprolactinémicas que en las ratas normoprolactinémicas (**Fig. 14 C**,  $n=4$ ). La disminución en la permeabilidad vascular en la retina parece ser debida al incremento de vaso-inhibinas intraoculares inducido por la hiperprolactinemia, porque ésta disminución no ocurrió en los animales inyectados con bromocriptina (**Fig. 14 C**). En la ausencia de diabetes, ni la hiperprolactinemia, ni el tratamiento con bromocriptina afectaron la vasopermeabilidad retiniana en comparación con los animales no tratados (**Fig. 14 C**).



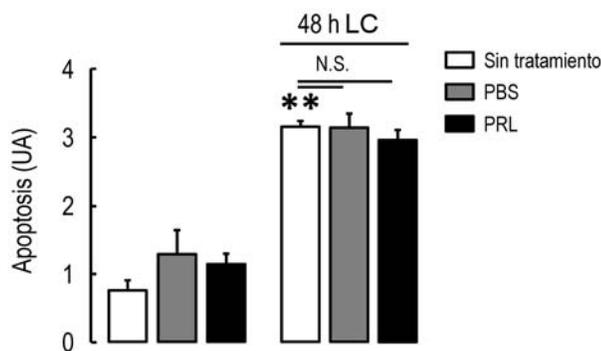
**Figura 14.** La hiperprolactinemia mitiga el incremento en la vasopermeabilidad retiniana debida a la diabetes. A ratas implantadas o no con adenohipófisis (HA) bajo la cápsula renal, se les indujo o no diabetes mediante la inyección de estreptozotocina. Setenta días después se les inyectó (Bromo) o no con bromocriptina (diariamente por cinco días) y se les evaluó para: (A) los niveles de PRL sistémica medidos por el bioensayo de la Nb2 ( $*P < 0.05$  vs. control no diabético y control no implantado y ratas diabéticas;  $n = 4$  ratas por grupo); (B) la presencia de vasoinhibinas retinianas mediante Western blot (cada uno correspondiente al conjunto de 4 retinas); y (C) la vasopermeabilidad retiniana mediante el ensayo del azul de Evans ( $n = 4$  ratas por grupo).  $*P < 0.05$  vs. control no diabético,  $^{\#}P < 0.05$  vs diabético no implantado, y  $^{\#\#}P < 0.05$  vs HA diabético sin bromocriptina.

## 6.2 PARTE 2.

### 6.2.1. La PRL inyectada intravitrealmente no modifica la muerte celular en la retina inducida por daño luminoso.

La exposición a luz de alta intensidad por períodos prolongados en animales albinos induce la muerte por apoptosis de los fotorreceptores y es un modelo para el estudio de enfermedades neurodegenerativas en la retina (Organisciak & Vaughan, 2010; Wenzel, Grimm, Samardzija, & Reme, 2005). Para examinar el posible efecto neuroprotector anti-apoptótico de la PRL en la retina, las ratas inyectadas intravitrealmente con PRL (1µg) o vehículo (PBS) fueron sometidas a una exposición luminosa de 1200 lux durante 48 horas. Los niveles de apoptosis en la retina fueron determinados mediante el ensayo de ELISA diseñado para cuantificar la concentración de DNA nucleosomal fragmentado. Se encontró que la exposición a la luz continua por 48h aumenta tres veces la apoptosis en la retina pero que la inyección intraocular de PRL

previa al daño luminoso no modifica dicho aumento (**Fig. 15**). Los niveles de apoptosis en las retinas de los ojos inyectados con el vehículo (PBS) no fueron diferentes a los de los animales no inyectados.

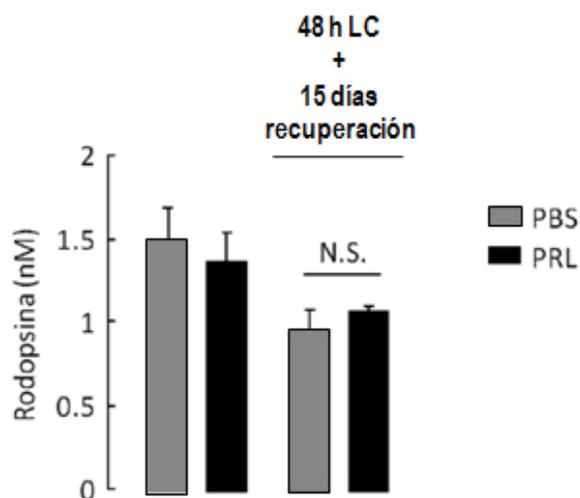


**Figura 15.** La PRL inyectada intravitrealmente no modifica la muerte celular en la retina inducida por daño luminoso. Evaluación por ELISA de la apoptosis en la retina inducida por exposición a luz continua (48h LC) después de la inyección intraocular de vehículo (PBS) o de PRL (1 $\mu$ g). \*\* $P < 0.05$  vs. no inyectado sin exposición a la luz. Los resultados son el promedio  $\pm$  error estándar de cuatro experimentos independientes. N.S. no significativo.

### 6.2.2. La PRL inyectada intravitrealmente no modifica la recuperación de la concentración de rodopsina en la retina después de la exposición luminosa.

La exposición a altas intensidades luminosas por períodos prolongados de tiempo reduce el depósito y actividad del pigmento visual rodopsina (inactivación) (Noell, Walker, Kang, & Berman, 1966) y se ha mostrado que la PRL estimula la síntesis de pigmentos visuales en vertebrados inferiores (Allen & Cristy, 1978; Crim, 1975a, , 1975b). Por lo tanto, consideramos que la determinación de los niveles de rodopsina en la retina ante el reto luminoso podría representar un parámetro más sensible para poder detectar una acción neuroprotectora de la PRL sobre los fotorreceptores retinianos. Considerando que los segmentos externos de los fotorreceptores tardan 15 días en regenerarse completamente (Penn & Williams, 1986), se procedió a medir la recuperación en la concentración de rodopsina en las retinas de animales que 15 días antes habían sido expuestos a la estimulación luminosa y a la inyección intravitreal de la PRL. La concentración de rodopsina disminuyó un 30% en las retinas de animales expuestos a la luz continua (y evaluados 15 días después) con respecto a los no estimulados. La PRL no

afectó la concentración de rodopsina en los animales sometidos o no al daño luminoso (**Fig. 16**,  $n=4$  ratas por cada grupo).

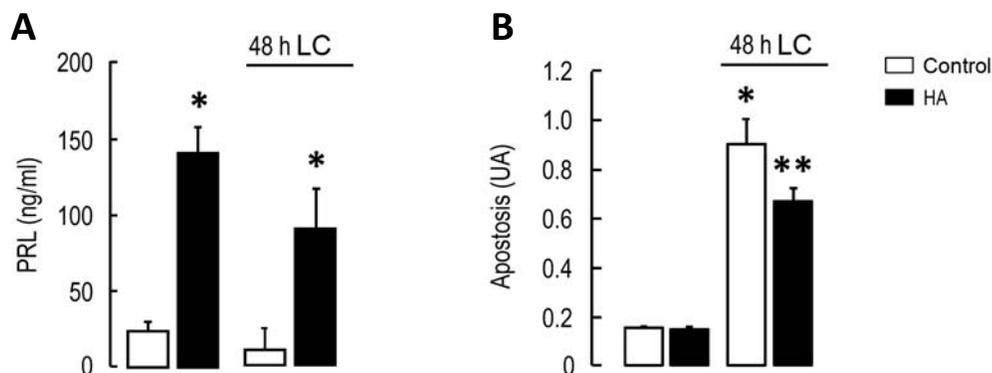


**Figura 16.** La PRL inyectada intravítreamente no modifica la recuperación de la concentración de rodopsina en la retina medida 15 días después de la exposición luminosa. La PRL y el vehículo (PBS) se inyectaron antes de la exposición al daño luminoso (48 h LC). Las dos barras de la izquierda corresponden a los ojos de ratas tratadas con PRL y PBS en ausencia del daño luminoso (controles;  $n=4$ ). Los resultados son promedios  $\pm$  errores estándar de la media. N.S. No significativo.

### 6.2.3. Niveles altos de PRL sistémica reducen la apoptosis en la retina inducida por un daño luminoso.

La ausencia de efecto de la PRL inyectada intravítreamente podría deberse a las condiciones poco fisiológicas de la administración utilizada, v.gr., una dosis muy alta (1  $\mu\text{g}$ ) y un tratamiento agudo local (una sola inyección intravítreal). Dado que en la primera parte de este estudio mostramos que la PRL sistémica puede ser incorporada al ojo, procedimos a investigar si un aumento sostenido en los niveles circulantes de la PRL, comparable al presente en la primera mitad del embarazo o durante la lactancia en roedores, pudiera traducirse en una acción neuroprotectora retiniana. Con tal propósito evaluamos el efecto de la hiperprolactinemia inducida por implantes de dos adenohipófisis bajo la cápsula renal sobre la apoptosis de las células de la retina inducida por el daño luminoso. Los resultados obtenidos corroboraron los altos niveles de PRL en el suero de

las ratas implantadas (HA) sometidas o no al daño luminoso en comparación con los controles no implantados (**Fig. 17 A**). En las ratas hiperprolactinémicas expuestas a la luz, el nivel de apoptosis evaluado por ELISA fue 25% menor en comparación al de las ratas control también sometidas al estímulo luminoso (**Fig. 17 B**). La hiperprolactinemia no modificó el nivel basal de apoptosis en ausencia de luz continua.

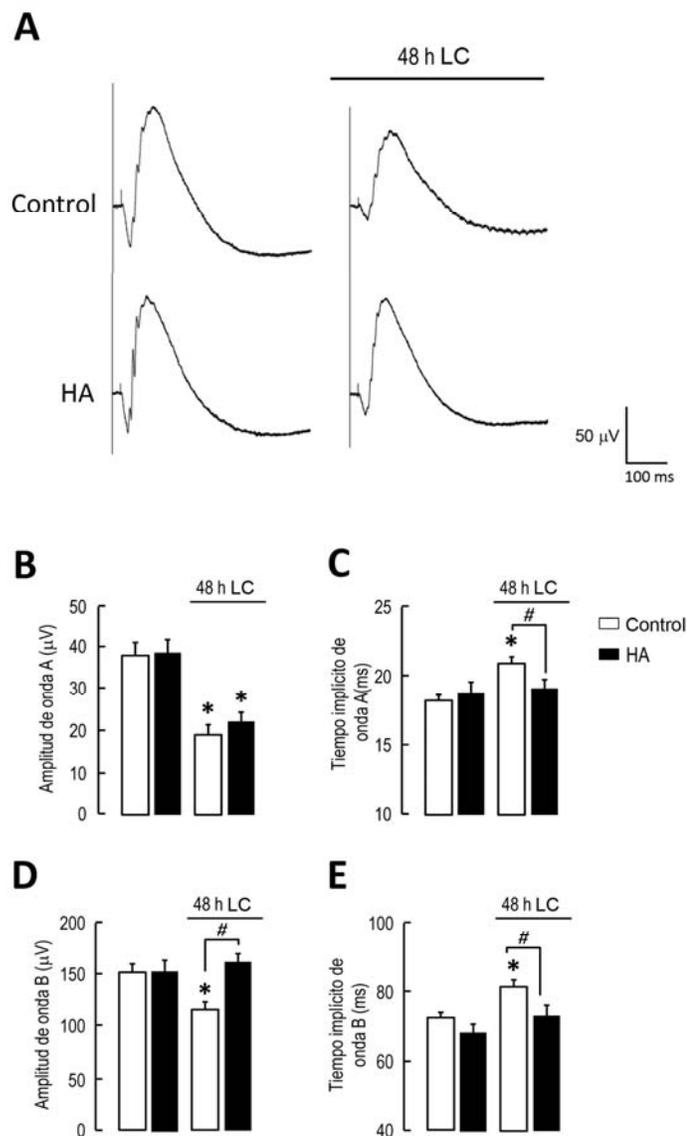


**Figura 17.** La hiperprolactinemia inhibe la apoptosis en la retina inducida por daño luminoso. (A) Niveles de PRL sérica evaluados con el bioensayo de las Nb2 en ratas implantadas (HA) o no (controles) expuestas o no a 48 horas de luz continua (48 h LC). \* $P < 0.05$  vs control no implantado. (B) Evaluación por ELISA de la apoptosis retiniana en las ratas HA y en las controles expuestas o no a 48 h LC. Los resultados son el promedio  $\pm$  error estándar, \* $P < 0.05$  vs. control sin daño luminoso; \*\* $P < 0.05$  vs. control con daño luminoso ( $n = 6$ ).

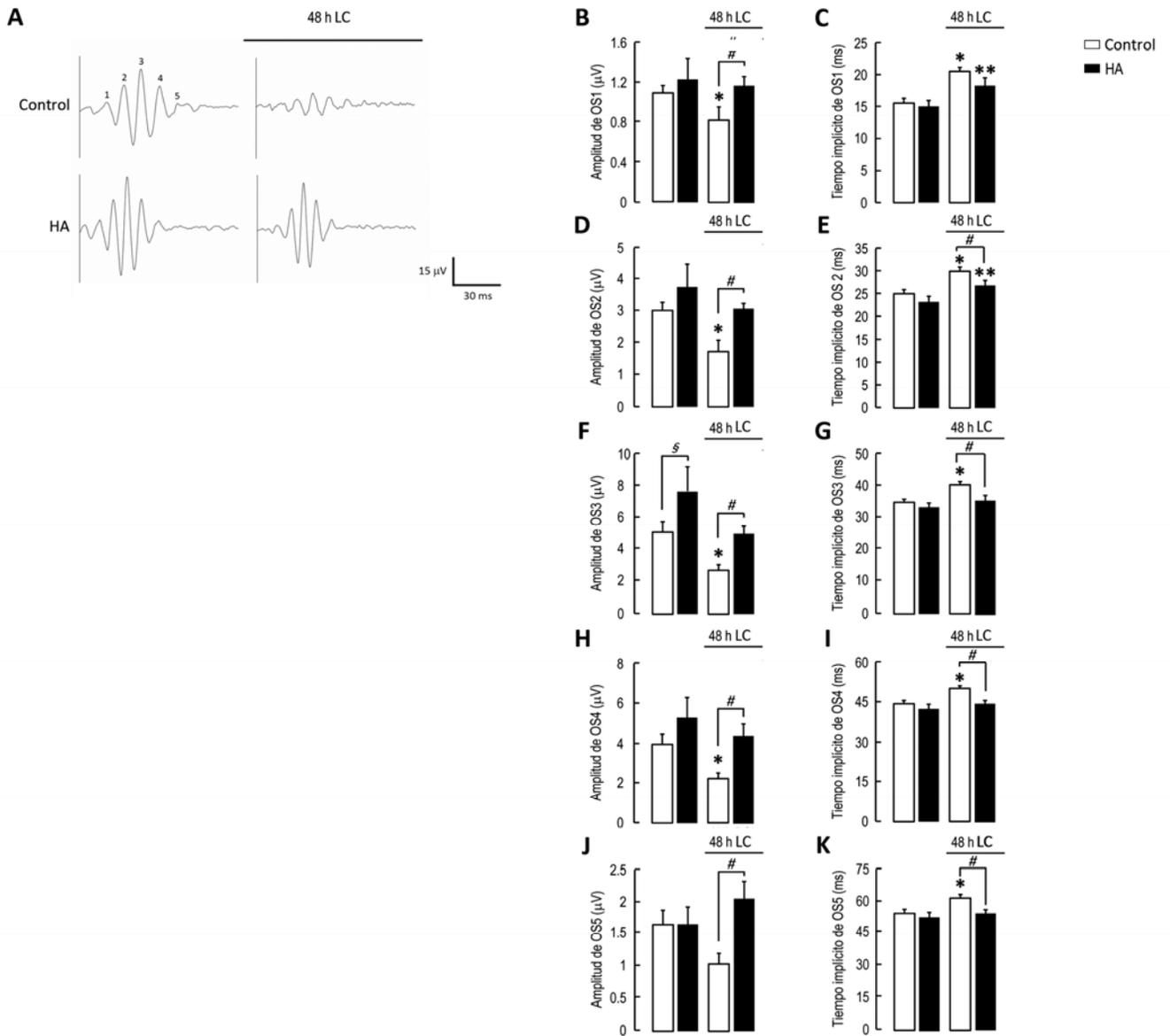
#### 6.2.4. La hiperprolactinemia reduce alteraciones en el ERG inducidas por la exposición luminosa.

El ERG fue utilizado con la finalidad de analizar la capacidad de la PRL sistémica para proteger la función retiniana ante el daño luminoso. Dado que en el caso de las ratas no se encontraron diferencias significativas entre las respuestas a las cuatro intensidades luminosas empleadas para la fotoestimulación de la retina en el ERG, para el análisis de los resultados se consideraron los registros obtenidos con la máxima intensidad de estimulación luminosa ( $1.2 \log \text{cd.s/m}^2$ ). Bajo condiciones escotópicas, los registros representativos de estos estudios (**Fig. 18A, 19A, y 20A**), mostraron que un día después de la exposición a la luz constante por 48 horas se presenta una disminución significativa en diferentes parámetros del ERG, a saber: (1) disminuyen la amplitudes de la onda *a* y *b* en un 50% y 23%, respectivamente (**Fig. 18 B, E**). (2) Disminuye la amplitud de los cinco

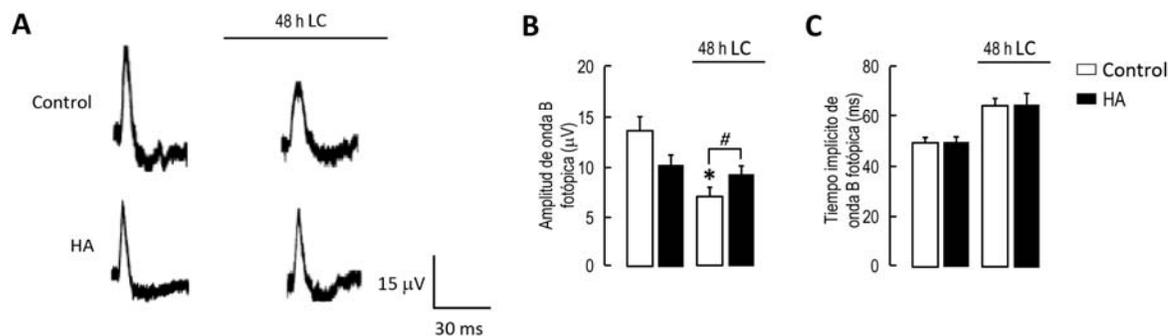
potenciales oscilatorios OS1, OS2, OS3, OS4 y OS5 aislados de la pendiente de la onda *b*, disminuyen en un 25%, 41%, 49%, 45% y 37%, respectivamente (**Fig. 19B-F**). (3) Retardo en los tiempos de latencia (implícitos) de la onda *a* y *b* del 12% y 11%, respectivamente (**Fig. 18 C, F**); y de los potenciales oscilatorios OS1, OS2, OS3, OS4 y OS5 del 24%,27%, 11%, 2% y 4%, respectivamente (**Fig. 19 G-K**). Por su parte, bajo condiciones fotópicas la amplitud de la onda *b* disminuye un 48% (**Fig. 20 B**) y hay un retardo de su tiempo implícito de un 24% (**Fig. 20 C**). En los animales hiperprolactinémicos (HA) sometidos a 48 h de exposición luminosa continua se previene la reducción de las amplitudes de la onda *b* en condiciones escotópicas y fotópicas (**Fig. 18 E y 20 B**), y los retardos de los cinco potenciales oscilatorios (OS1- OS5) (**Fig. 19 B-F**). Estos parámetros no son diferentes de los registrados en los animales no expuestos al daño luminoso. Además, los tiempos de latencia de la onda *b* escotópica y fotópica (**Fig 19 C**), y de los OS2 y OS3 (**Fig. 20 C**) tampoco son diferentes. Más aún, a pesar de que la amplitud de la onda *a* no se preserva en los animales hiperprolactinémicos expuestos a la luz continua, su tiempo implícito no cambia respecto a los animales no sometidos al daño, (**Fig. 19 B, C**).



**Figura 18.** La hiperprolactinemia reduce alteraciones en el ERG inducidas por la exposición luminosa. Evaluación de la respuesta funcional de la retina en condiciones escotópicas. (A) Registros representativos de animales implantados con dos adenohipófisis (HA) y no implantados (control), expuestos o no a luz continua durante 48 horas (48 h LC). Promedios de las amplitudes y los tiempos implícitos de la onda *a* (B, C) y la onda *b* (D,E) de los animales HA y controles, expuestos o no al daño luminoso. \* $P < 0.05$  vs. control sin exposición luminosa, # $P < 0.05$  vs. control con exposición luminosa ( $n = 16-18$  animales para cada grupo).



**Figura 19.** La hiperprolactinemia reduce alteraciones en el ERG inducidas por la exposición luminosa. (A) Potenciales oscilatorios representativos de los animales implantados (HA) o no (controles) con dos hipófisis anteriores, expuestos o no a luz continua durante 48 horas (48 h LC). Promedios  $\pm$  errores estándar de las amplitudes y los tiempos implícitos de OS1 (B,C), OS2(D,E), OS3(F,G), OS4(H,I), OS5(J,K) de los animales HA y controles, expuestos o no al daño luminoso. \* $P$ <0.05 y \$ $P$ <0.05 vs. control sin exposición luminosa, # $P$ <0.05 vs. control con exposición luminosa ( $n=16-18$  animales para cada grupo).

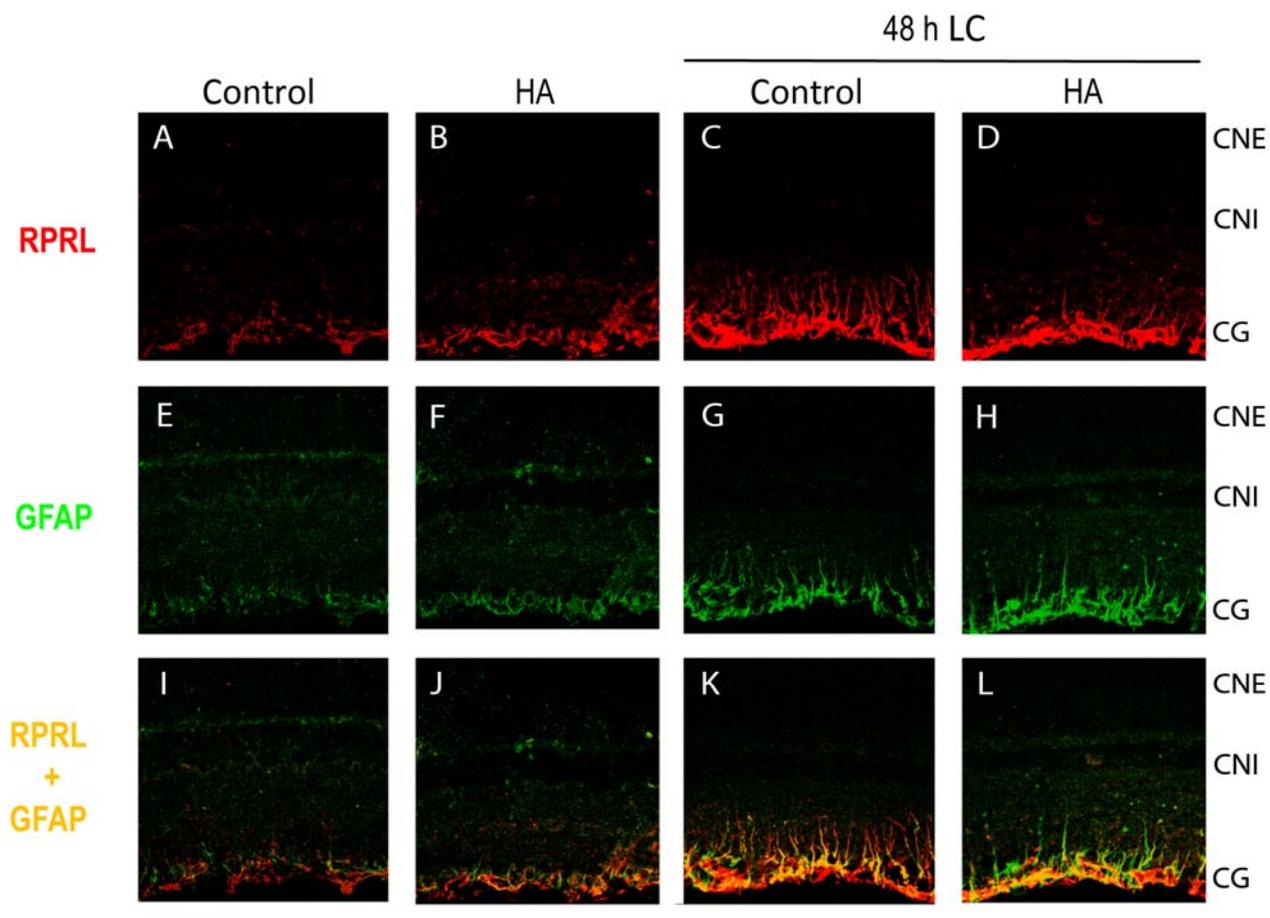


**Figura 20.** La hiperprolactinemia reduce alteraciones en el ERG inducidas por la exposición luminosa. Evaluación de la respuesta funcional de la retina en condiciones fotópicas. (A) Registros representativos de los animales implantados (HA) o no (controles) con dos hipófisis anteriores, expuestos o no a luz continua durante 48 horas (48 h LC). Promedios  $\pm$  errores estándar de la amplitud (B) y el tiempo implícito (C) de la onda *b* fotópica de los animales HA y controles, expuestos o no al daño luminoso. \* $P < 0.05$  vs. control sin exposición luminosa, # $P < 0.05$  vs. control con exposición luminosa ( $n = 16-18$  animales para cada grupo).

### 6.2.5. El receptor de la PRL aumenta en células gliales tras la exposición a luz continua.

Dado que la hiperprolactinemia previene alteraciones en el ERG inducidas por el daño luminoso, procedimos a analizar si dicho estímulo luminoso afecta la expresión del receptor de la PRL en las células gliales de la capa de células ganglionares (CG) de la retina. De acuerdo a experimentos previos, el análisis por inmunohistoquímica reveló la presencia del receptor de PRL en proyecciones celulares que bordean la capa de CG en proximidad al vítreo (**Fig. 21 A**); el doble marcaje con anticuerpos específicos para las células gliales (anti-GFAP) (**Fig. 21 E**) permitió identificar que muy probablemente algunas de estas proyecciones positivas al receptor de PRL provenían de astrocitos. En las retinas de animales expuestos a la luz continua, la expresión del receptor de PRL se incrementó en la zona de los astrocitos y apareció en proyecciones celulares de la capa plexiforme interna (**Fig. 21 C**), que también fueron positivas para GFAP (**Fig. 21 G**) y, dada su localización que atraviesa la capa plexiforme interna, éstas corresponden a las proyecciones de las células de Müller (**Fig. 21 K, L**). No se observaron cambios aparentes en la expresión y distribución de ambas marcas en animales

hiperprolactinémicos (HA) sometidos (**Fig. 21 D, H, L**) o no a la estimulación luminosa (**Fig. 21 B, F, J**).

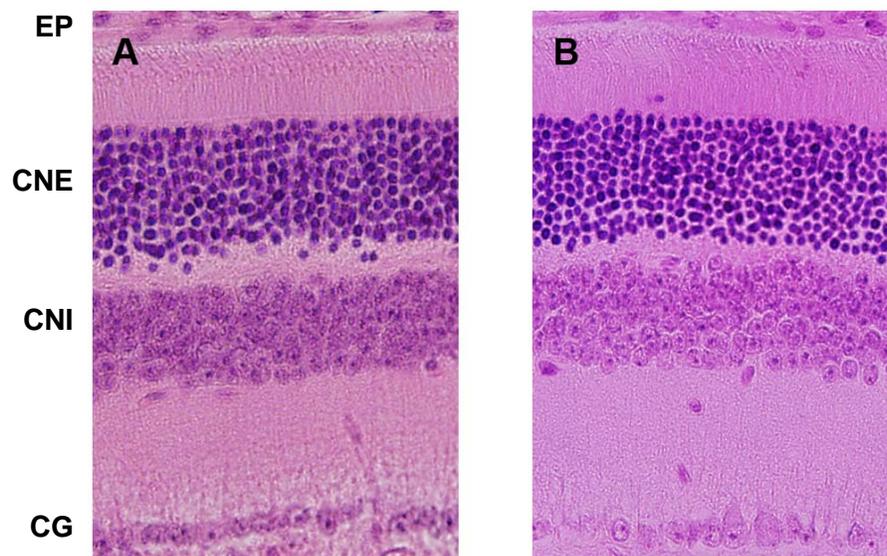


**Figura 21.** El receptor de la PRL aumenta en células gliales tras la exposición a luz continua. Análisis por doble inmunohistoquímica de la presencia del receptor de PRL (RPRL) y del marcador de células gliales (proteína ácida fibrilar de los filamentos intermedios, GFAP) de retinas de animales no implantados (control, normoprolactinémicos) o implantados con hipófisis anteriores bajo la cápsula renal (AH, hiperprolactinémicos) expuestos o no a 48 horas de luz continua. Secciones histológicas de retinas marcadas para RPRL (rojo, A-D) o para la GFAP (verde, E-H). Sobreexposición de ambas marcas (I-L). CNE, capa nuclear externa; CNI, capa nuclear interna; CG, capa de células ganglionares. 40X, escala=100  $\mu$ m.

#### 6.2.6. El ERG de ratones RPRL<sup>-/-</sup> presenta alteraciones con respecto a los ratones RPRL<sup>+/+</sup>.

Con la finalidad de analizar posibles acciones neuroprotectoras de la PRL endógena, se examinó la histología y el ERG de los ratones RPRL<sup>-/-</sup> en relación con los

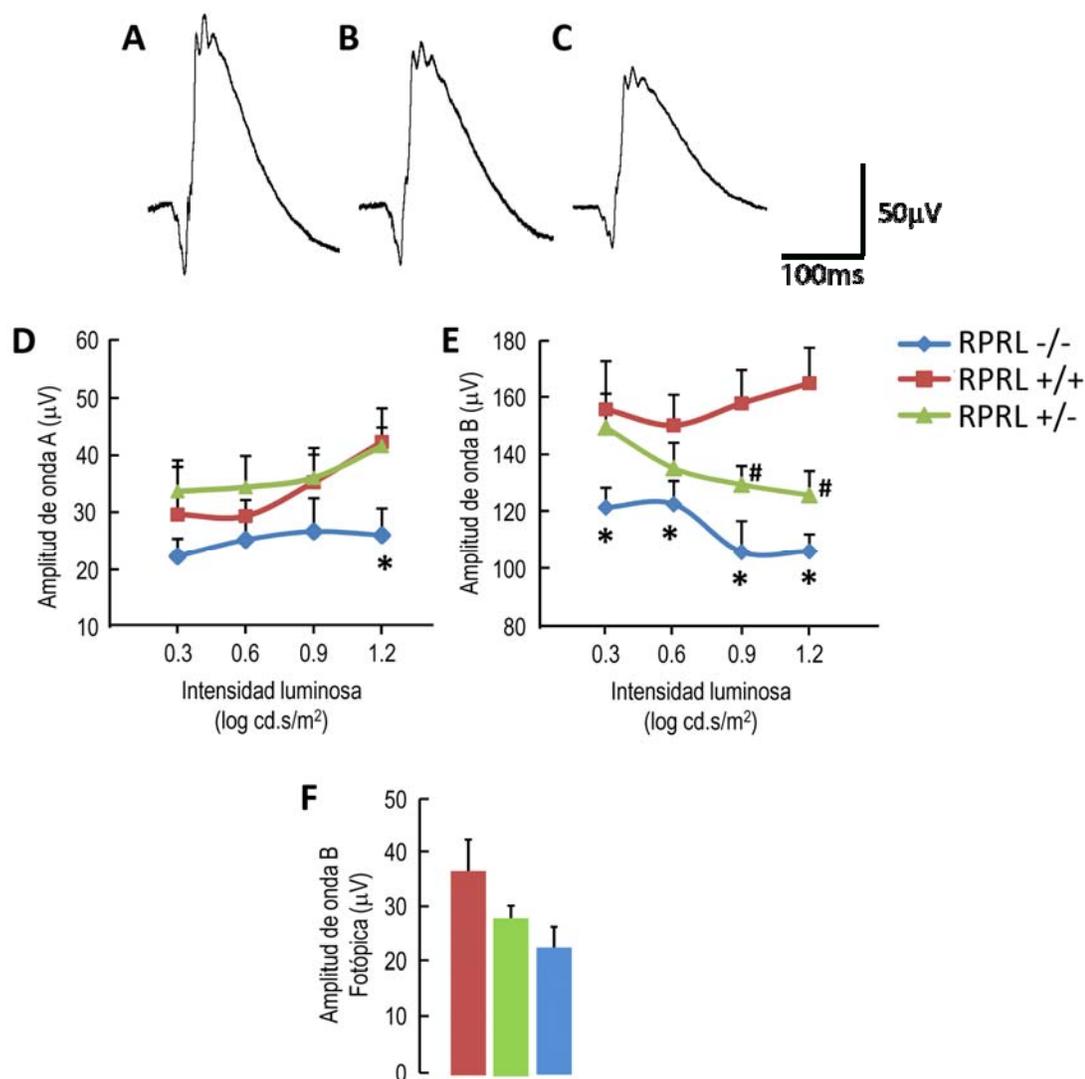
ratones silvestres (RPRL+/+). No se encontraron diferencias aparentes en la histología de las retinas entre ambos grupos de ratones (**Fig. 22A, B**).



**Figura 22.** Análisis histológico de retinas de ratones. Tinción de hematoxilina y eosina en secciones de retinas de ratones RPRL+/+ (A) y RPRL-/- (B), ambos ratones albinos con fondo genético 129SvJ. Imágenes representativas tomadas a 40X de una  $n=3$ . CG, células ganglionares; CNI, capa nuclear interna; CNE, capa nuclear externa; EP, epitelio pigmentario.

La evaluación del ERG reveló alteraciones en la funcionalidad de la retina en los ratones RPRL-/- con respecto a los RPRL+/+ (**Fig. 23**). Bajo condiciones escotópicas, la amplitud de la onda *a* disminuye  $27 \pm 1.7\%$  en los ratones RPRL-/- con respecto a los silvestres y heterocigotos, pero solamente cuando se emplea la intensidad máxima de estimulación luminosa ( $1.2 \log \text{cd.s/m}^2$ ) (**Fig. 23 A-D**). En contraste, la amplitud de la onda *b* es menor en los animales RPRL-/- independientemente de la intensidad luminosa que se utilice (**Fig. 24 A-C y E**). La disminución de la amplitud de la onda *b* en los ratones RPRL-/- es de  $22.1 \pm 2.9\%$ ,  $18.4 \pm 2.5\%$ ,  $33.1 \pm 2.7\%$  y  $35.8 \pm 2.6\%$ , para las cuatro intensidades luminosas evaluadas, respectivamente, en relación a las amplitudes registradas en los ratones silvestres (**Fig. 23 E**). Cabe señalar que en los ratones heterocigotos (RPRL+/-) los promedios de la amplitud de la onda *b* en las dos intensidades mayores de fotoestimulación ( $0.9$  y  $1.2 \log \text{cd.s/m}^2$ ), disminuyeron  $18 \pm 2.6\%$

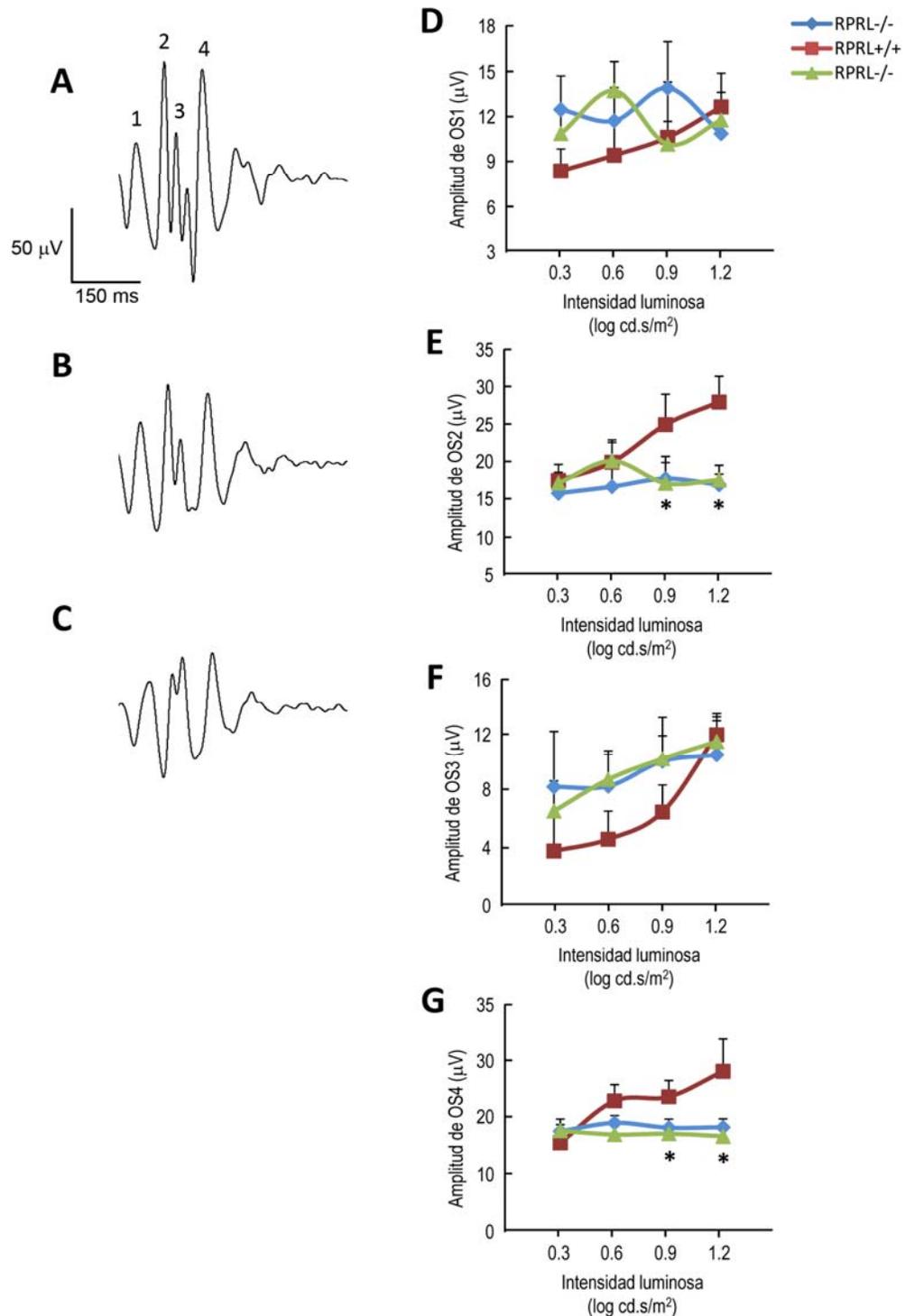
y  $23.8 \pm 2.4\%$ , respectivamente, en comparación a las amplitudes promedio de los ratones silvestres (**Fig. 23 E**). Los tiempos de latencia tanto de la onda *a* como la onda *b*, no fueron diferentes entre los tres genotipos bajo ninguna de las intensidades de fotoestimulación empleadas (datos no mostrados). Bajo condiciones fotópicas, el promedio de la amplitud de la onda *b* (**Fig. 23 F**) no fue diferente entre los tres grupos de ratones, al menos para el tamaño de muestra analizada.



**Figura 23.** El ERG de ratones RPRL<sup>-/-</sup> presenta alteraciones con respecto a los ratones RPRL<sup>+/+</sup>. ERG de ratones silvestres (RPRL<sup>+/+</sup>), heterocigotos (RPRL<sup>+/-</sup>), y knockout (RPRL<sup>-/-</sup>), para el receptor de PRL (RPRL). (A-C) ERG escotópicos representativos de los ratones RPRL<sup>+/+</sup> (A), RPRL<sup>+/-</sup> (B) y RPRL<sup>-/-</sup> (C) registrados a una intensidad luminosa de 1.2  $\log \text{cd.s/m}^2$ . Promedios  $\pm$  errores

estándar de las amplitudes de la onda *a* (D) y de la onda *b* (E), de los registros de ERG medidos a intensidades crecientes de estimulación luminosa en los tres grupos de ratones (RPRL<sup>+/+</sup>, *n*=6; RPRL<sup>+/-</sup>, *n*=12; RPRL<sup>-/-</sup>, *n*=16). \**P*<0.05 vs. RPRL<sup>+/+</sup>, #*P*<0.05 vs. RPRL<sup>+/+</sup>. (F). Promedios ± errores estándar de las amplitudes de la onda *b* de ERG bajo condiciones fotópicas tomados en los tres grupos de ratones y registradas tras una estimulación luminosa de 1.2 log cd.s/m<sup>2</sup>.

Los registros de los potenciales oscilatorios de los ratones RPRL<sup>-/-</sup> y RPRL<sup>+/-</sup> mostraron alteraciones claras en su forma y amplitud con respecto a los de los ratones RPRL<sup>+/+</sup> (**Fig. 24 A-C**). Los cambios se detectaron en los potenciales OS2 y OS4 pero no en los OS1, OS3 y OS5. Para el caso de los ratones RPRL<sup>-/-</sup>, las amplitudes de los potenciales OS2 disminuyeron 39.3% y 47.76%, a las intensidades luminosas de 0.9 y 1.2 log cd.s/m<sup>2</sup>, respectivamente (**Fig. 24 E**). Asimismo, a las mismas intensidades las amplitudes de los OS4 disminuyeron 35.3% y 30.2%, respectivamente en dichos ratones (**Fig. 24 G**). Las amplitudes de los potenciales OS2 y OS4 fueron similares entre los RPRL<sup>-/-</sup> y los RPRL<sup>+/-</sup> (**Fig. 24 D-G**).



**Figura 24.** La amplitud de los potenciales oscilatorios disminuye en los ratones knockout (RPRL<sup>-/-</sup>) y heterocigotos (RPRL<sup>+/-</sup>) para el receptor de PRL (RPRL). Potenciales oscilatorios representativos en ratones silvestres (RPRL<sup>+/+</sup>) (A), RPRL<sup>+/-</sup> (B) y RPRL<sup>-/-</sup> (C). (D-G) Promedios  $\pm$  errores estándar de las amplitudes de los potenciales oscilatorios OS1 (D), OS2 (E), OS3 (F) y OS4 (G) medidos a intensidades crecientes de estimulación luminosa en los tres grupos de ratones (RPRL<sup>+/+</sup>,  $n=6$ ; RPRL<sup>+/-</sup>,  $n=12$ ; RPRL<sup>-/-</sup>,  $n=16$ ). \* $P<0.05$  vs. RPRL<sup>+/+</sup>.

## VII. DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis muestran que el ojo, específicamente la retina, es un órgano blanco de las acciones vasculares y neuroprotectoras de la PRL. En la primera parte del estudio, se encontró que la PRL protege contra el aumento en la vasopermeabilidad de la retina asociado a la retinopatía diabética. En la segunda parte se observó que la PRL preserva la supervivencia y función de células retinianas ante un daño luminoso. Inicialmente ambas partes se discuten de forma independiente para después integrarlas en una conclusión final.

### 7.1 Primera parte

La relación entre los niveles de PRL circulante y la retinopatía diabética ha sido un tema controversial durante mucho tiempo. En estudios realizados hace más de dos décadas se reportaron tanto niveles elevados (Mooradian et al., 1985), como disminuidos (Harter et al., 1976) o normales (Cerasola et al., 1981; Froland et al., 1977) de PRL en el suero de pacientes con retinopatía diabética. Esta heterogeneidad en los resultados parece deberse a que los estudios utilizaron grupos reducidos de pacientes [ $\leq 10$  pacientes; (Harter et al., 1976; Hunter et al., 1974)] o bien no evaluaron el grado de severidad del padecimiento. Al respecto, en un trabajo de nuestro laboratorio realizado en 221 sujetos mostró que la concentración de PRL circulante se incrementa en la diabetes y es mayor en las personas diabéticas sin retinopatía que en aquellas con retinopatía diabética proliferativa (Arnold et al., 2010). La relación inversa entre la PRL y la severidad de la retinopatía diabética sugiere que la PRL pudiera tener un valor protector contra la progresión de este padecimiento. Este efecto protector estaría mediado a través de la conversión intraocular de la PRL hacia vasoinhibinas. Se conoce que las vasoinhibinas están presentes en la retina de ratas normales donde parecen participar restringiendo la vascularización local (Aranda et al., 2005). También se han detectado estos péptidos en el líquido subretiniano de pacientes con retinopatía del prematuro (ROP) (Duenas et al., 2004), un padecimiento también debido a la neovascularización de la retina asociado al diferencial del oxígeno ambiental al que los prematuros recién nacidos son expuestos

dentro y fuera de la incubadora (Chen & Smith, 2007). De manera interesante, se mostró que vasoinhibinas intraoculares promueven la regresión vascular del sistema hialoideo fetal en ratas recién nacidas y se propuso que promueven la regresión de los neovasos en ROP controlando su progresión (Duenas et al., 2004). Más directamente, la influencia de las vasoinhibinas sobre la retinopatía diabética se apoya en un reporte previo que muestra que los pacientes con este padecimiento tienen niveles menores de vasoinhibinas en el suero en comparación a personas no diabéticas (Triebel et al., 2009). Esta disminución en vasoinhibinas podría ser consecuencia de la disminución en los niveles circulantes de PRL que se observa en los casos más severos de la retinopatía diabética (Arnold et al., 2010) y deberse a una menor secreción de PRL por la adenohipófisis o a una mayor depuración de la PRL y/o de las vasoinhibinas a nivel renal. Posibilidades que se están estudiando activamente en el laboratorio.

Por su parte, la hiperprolactinemia que caracteriza a la diabetes, particularmente en sus etapas tempranas, podría favorecer la incorporación de PRL al ojo y su conversión a vasoinhibinas en la retina. Al respecto, se conoce que en roedores, la PRL marcada radiactivamente, inyectada sistémicamente se incorpora a estructuras oculares como la coroides, los cuerpos ciliares y la retina (O'Steen & Sundberg, 1982) y en esta tesis mostramos que la hiperprolactinemia conduce a una acumulación de vasoinhibinas en la retina de la rata. Encontramos que las vasoinhibinas retinianas aumentan en los animales hiperprolactinémicos y este aumento se bloquea mediante el tratamiento con bromocriptina, un antagonista dopaminérgico que reduce la PRL circulante a niveles basales (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). Enseguida analizamos el posible mecanismo a través del cual la PRL sistémica se incorpora al ojo. Esto es importante, dado que el ojo posee dos barreras hemáticas, una en la porción anterior, en los cuerpos ciliares, y otra en la porción posterior, en la retina, y ambas regulan de manera estrecha la incorporación de factores sistémicos determinando la composición de los fluidos oculares (Cunha-Vaz, 1997). Al respecto, trabajo de nuestro laboratorio mostró la presencia del receptor de la PRL en los cuerpos ciliares y la consecuente posibilidad de que dicho receptor medie el transporte activo de la PRL al interior del ojo (Arnold et al., 2010). En apoyo a esta propuesta, en esta tesis encontramos que animales desprovistos del receptor de la PRL (RPRL<sup>-/-</sup>) no muestran el aumento de vasoinhibinas retinianas debido a la

hiperprolactinemia. Esto apoya que la PRL requiere unirse a su receptor presente en las membranas celulares del epitelio ciliar para ser incorporada al ojo. Se presupone que el complejo PRL-receptor es transportado transcelularmente hacia el humor acuoso y posteriormente al vítreo y a la retina. De hecho, un mecanismo similar ya ha sido descrito para el transporte de la PRL circulante, a través de los plexos coroideos, al cerebro (Mangurian, Walsh, & Posner, 1992) o bien, a través del epitelio mamario, a la leche (Seddiki, Delpal, Aubourg, Durand, & Ollivier-Bousquet, 2002). En apoyo a que el transporte de la PRL sistémica al interior del ojo opera en la diabetes, nuestros resultados mostraron mayores niveles de vasoinhibinas en las retinas de ratas diabéticas hiperprolactinémicas.

En la retinopatía diabética la liberación exacerbada y constante de moléculas pro-angiogénicas como el VEGF resulta en una vasopermeabilidad incrementada que propicia la aparición de hemorragias y vasoproliferación (Caldwell et al., 2003). El VEGF es de gran interés pues se le considera el principal factor determinante de la retinopatía diabética. El VEGF se incrementa en los fluidos oculares de pacientes diabéticos en asociación con la severidad de la retinopatía diabética (Funatsu et al., 2005) y la administración intravítrea de anticuerpos capaces de inmunosequestrar al VEGF han mostrado resultados promisorios para el control de este padecimiento, como son la regresión de la neovascularización, una mejora de la agudeza visual y una disminución del engrosamiento de la retina (Jardeleza & Miller, 2009). Recientemente, se demostró que vasoinhibinas exógenas inyectadas intraocularmente son capaces de inhibir el incremento en la vasopermeabilidad retiniana que ocurre en respuesta a la inyección intravítrea de VEGF y también la que opera a consecuencia de la diabetes inducida por estreptozotocina en la rata (García et al., 2008). De manera similar, en este estudio encontramos que las vasoinhibinas intraoculares generadas a partir de un incremento crónico en la PRL sérica, mitigan el incremento en la vasopermeabilidad tanto en ratas diabéticas como en ratas inyectadas intraocularmente con VEGF. Estos hallazgos apoyan el impacto funcional del aumento en las vasoinhibinas retinianas debidas a la hiperprolactinemia, al tiempo que muestra el valor terapéutico potencial de la hiperprolactinemia para contrarrestar alteraciones vasculares oculares en la diabetes.

La hiperprolactinemia patológica en humanos (más de 20 ng/ml y de 25 ng/ml, en hombres y mujeres, respectivamente) está generalmente asociada a la presencia de prolactinomas o al tratamiento con fármacos diversos que incluyen: antidepresivos (tricíclicos, inhibidores de la monoamina oxidasa, inhibidores de la recaptura de serotonina), antipsicóticos (fenotiacinas, haloperidol, risperidona), antihipertensivos (metildopa, verapamil), hormonales (estrógenos, opiáceos, cimetidina), etc. Los efectos colaterales de altos niveles de PRL incluyen: amenorrea, galactorrea, ginecomastia, hipogonadismo crónico, alteraciones del comportamiento (reducción en la libido), e inmunodepresión (Haddad & Wieck, 2004; Torre & Falorni, 2007). El grado y tipo de efectos colaterales de la hiperprolactinemia dependen de la magnitud y tiempo de la elevación de los niveles hormonales. El nivel de hiperprolactinemia inducido en este estudio es equivalente al observado en estados fisiológicos como la gestación tardía o la lactancia (Yin & Arita, 2000). Notablemente, diversas evidencias indican que el embarazo es un factor de riesgo para la retinopatía diabética. Al respecto, el estudio realizado por el grupo de investigación clínica sobre el control de la diabetes y sus complicaciones o DCCT (por sus siglas en inglés: “Diabetes Control and Complication Trial research group”) reportó que la retinopatía diabética se agrava 2.5 veces en el embarazo y que este alto riesgo se corrige en el postparto (Bhatnagar, Ghauri, Hope-Ross, & Lip, 2009; Diabetes Control and Complications Trial Research, 2000). Los mecanismos responsables de la exacerbación de la retinopatía diabética en el embarazo no se conocen, pero es posible que la PRL y las vasoinhibinas contribuyan en alguna medida. Existe evidencia de que los niveles de PRL son menores en las mujeres embarazadas diabéticas en comparación con mujeres embarazadas sanas (Larinkari et al., 1982) y durante la lactancia, cuando la retinopatía diabética involuciona significativamente (Moloney & Drury, 1982), hay altos niveles de PRL en sangre. Sin embargo, también se reportó que los niveles circulantes de PRL no se correlacionan con la presencia de retinopatía diabética durante el embarazo (Larinkari et al., 1982) y no se han llevado a cabo estudios en los que se analice a la PRL sistémica en función de las diferentes etapas de la retinopatía. El embarazo podría representar un caso especial en atención al ambiente prioritariamente pro-angiogénico que lo caracteriza y que se requiere para que los órganos de la madre y del producto crezcan y se diferencien. Este ambiente refleja el predominio

de la expresión y/o actividad de factores proangiogénicos vs. los antiangiogénicos. Por lo tanto, cabría esperar que en el embarazo, a pesar de la hiperprolactinemia, los niveles de vasoinhibinas se reduzcan, y que esta reducción sea aún mayor en el caso de mujeres gestantes diabéticas con retinopatía. Esta posibilidad se refuerza cuando se considera que la falla renal asociada a la diabetes podría favorecer la depuración metabólica de las vasoinhibinas y por ende, la reducción de sus niveles circulantes. Es menester determinar la concentración tanto de la PRL como de las vasoinhibinas en el suero y en la orina de mujeres gestantes sanas y diabéticas con retinopatía para evaluar estas posibilidades.

En conclusión, nuestro trabajo apoya que la PRL, vía su conversión a vasoinhibinas, actúa como agente protector contra las alteraciones vasculares retinianas debidas a la diabetes. Más aún, en la segunda parte de este estudio hemos encontrado que la PRL puede actuar independientemente a las vasoinhibinas protegiendo a la retina contra daños degenerativos.

## **7.2 Segunda parte**

La observación de que la PRL circulante se incorpora a la retina (primera parte de esta tesis) aunada al hecho de que el receptor de la PRL está presente en la retina neural (Rivera et al., 2008), nos llevó a investigar si la hiperprolactinemia podría afectar la funcionalidad de la vía visual. Con este propósito empleamos el modelo de hiperprolactinemia inducido por implantes hipofisarios bajo la cápsula renal y aplicamos una exposición a luz continua capaz de producir daño degenerativo en la retina. Nuestros resultados mostraron que el aumento en los niveles de la PRL circulante inhibe la apoptosis de los fotorreceptores y previene alteraciones del ERG asociadas al daño luminoso. Además encontramos que estos efectos protectores también tienen lugar en respuesta a la PRL endógena, dado que la delección genética parcial o total del receptor de la PRL (en ratones RPRL+/- y RPRL-/-, respectivamente) reduce las amplitudes de las ondas *a* y *b* del ERG.

El modelo de exposición a luz continua empleado en este estudio, se ha utilizado ampliamente para investigar la acción de agentes neuroprotectores capaces de prevenir la muerte por apoptosis de los fotorreceptores en la retina (Wenzel et al., 2005). Además,

resulta importante señalar que este modelo es tan flexible que permite modular el tiempo de exposición luminosa de acuerdo a la intensidad de la fuente de luz empleada; en este trabajo optamos por emplear una intensidad baja por un tiempo prologado (48 h), lo cual permite evaluar la recuperación de un daño discreto, si bien presenta el inconveniente de someter a los animales a condiciones estresantes y no se logran observar cambios aparentes en la estructura de la retina, a diferencia de lo que ocurre al emplear intensidades de daño muy altas del orden de los 15000 lux o más por tiempos cortos de horas.

Nuestros hallazgos mostraron que la PRL inhibe la apoptosis inducida por el daño luminoso evaluada por ELISA en extractos de retina. Dado que se ha mostrado que el reto luminoso empleado solamente induce apoptosis en los fotorreceptores y no en otros tipos celulares de la retina (Levin, 2003), así podemos inferir que la PRL actuó sobre los fotorreceptores estimulando su supervivencia. Al respecto, cabe señalar que al tratarse de roedores en este modelo las acciones protectoras de la PRL se refieren principalmente a la supervivencia de los bastones y no así de los conos, que son más abundantes en las retinas humanas, y para lo cual se requeriría inducir el daño retiniano en primates (Levin, 2003). Por otra parte, sabemos que en la rata los fotorreceptores retinianos expresan el receptor de la PRL (Rivera et al., 2008). Curiosamente, el efecto antiapoptótico de la PRL en la retina no se observó cuando en lugar de la hiperprolactinemia por 15 días se administró PRL exógena vía la inyección intraocular de una sola dosis farmacológica (1  $\mu$ g). Desconocemos el por qué de esta diferencia, pero es interesante notar que los niveles de PRL en nuestro modelo de hiperprolactinemia son similares a las concentraciones de PRL circulante alcanzadas en el embarazo y la lactancia (Ben-Jonathan et al., 2008; Yin & Arita, 2000), y por ende que esta condición mimetiza situaciones fisiológicas. Por otra parte, es posible que la acción protectora de la PRL requiera de un mayor tiempo de exposición a la hormona que el alcanzado por la inyección intravitreal. Al respecto, se conoce que para agentes neuroprotectores, como el factor de crecimiento hepático (HGF). La dosis efectiva de su inyección intravitreal es diez veces mayor a la que utilizamos para la PRL (Machida et al., 2004). Es posible que una dosis más alta facilite un mayor tiempo de acción.

La acción antiapoptótica de la PRL no es una sorpresa porque se conoce que esta hormona es un factor de supervivencia en distintos tipos celulares tales como células inmunes (Kochendoerfer, Krishnan, Buckley, & Buckley, 2003; Leff et al., 1996), células epiteliales de próstata (Ahonen, Harkonen, Rui, & Nevalainen, 2002), células de la decidua (Tessier, Prigent-Tessier, Ferguson-Gottschall, Gu, & Gibori, 2001), células  $\beta$ -pancreáticas (Fujinaka, Takane, Yamashita, & Vasavada, 2007), células de la granulosa (Perks et al., 2003), células del timo y del bazo (Krishnan, Thellin, Buckley, Horseman, & Buckley, 2003), y los condrocitos del cartílago articular (Zermeno et al., 2006). Se desconoce la vía de señalización a través de la cual la PRL inhibiría la apoptosis de los fotorreceptores. Es de notar, que las acciones neuroprotectoras de otros factores en la retina contra la apoptosis debida al daño luminoso, son mediadas a través de la vía del inositol trifosfato (PI3)-cinasa y su efector Akt (Nakazawa et al., 2003), o por la activación de Ras que posteriormente activa a MEK/ERK en la vía de las MAPK cinasas (Liu, Peng, Laties, & Wen, 1998). Notablemente, la PRL protege de la apoptosis por mecanismos similares (Fujinaka et al., 2007; Kochendoerfer et al., 2003; Krishnan et al., 2003; Tessier et al., 2001). Adicionalmente, se ha propuesto que la apoptosis de los fotorreceptores inducida por la exposición a la luz deriva del estrés oxidativo que se produce en la retina. En este sentido se ha mostrado que la inhibición de la sintetasa neural de óxido nítrico (nNOS) (Donovan, Carmody, & Cotter, 2001), así como la activación de STAT3 en respuesta al factor inhibidor de leucemia (LIF), previene la producción de óxido nítrico (NO) e inhibe el estrés oxidativo, previniendo la apoptosis de los fotorreceptores. Se tienen evidencias de que la PRL puede inhibir la producción de NO que resulta de la activación de las NOS constitutivas (Gonzalez et al., 2004) e inducibles (Corbacho et al., 2003) en diferentes tipos celulares, y también que incrementa la activación de STAT3 en cardiomiocitos para inhibir el estrés oxidativo que se presenta en el corazón en asociación con la cardiomiopatía del postparto (Hilfiker-Kleiner et al., 2007). De tal manera, que la inhibición en la producción de NO o la activación de STAT3 podrían ser otros mecanismos del efecto antiapoptótico de la PRL en la retina. Finalmente, existen evidencias de que la hiperprolactinemia puede actuar en la retina disminuyendo los niveles de receptor de la hormona liberadora de tirotropina (TRH-R)

(Sharif, 1988). Aun cuando no se conoce la función de tales receptores en la retina, se sabe que son miembros de la familia de receptores rodopsina/beta adrenérgicos acoplados a proteínas G, y en el tejido cerebral activan a la vía del inositol 3 fosfato y del diacilglicerol que a su vez activa a PKC, y a AP-1 (Sun, Lu, & Gershengorn, 2003). Resulta interesante que AP-1 se ha relacionado con la inducción de la apoptosis en el modelo de daño luminoso (Wenzel et al., 2005). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la PRL al disminuir al TRH-R en la retina pudiera prevenir el incremento de AP-1 durante el daño luminoso y de esta manera prevenir la apoptosis de los fotorreceptores.

Cabe señalar que daños de tipo mecánico en la retina (Wen et al., 1995) o luminoso (O'Driscoll, O'Connor, O'Brien, & Cotter, 2008), desencadenan mecanismos autoprotectores que involucran la expresión endógena de moléculas neurotróficas tales como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y de sus receptores en la retina (Chaum, 2003). Dado que la PRL se expresa en la retina (Rivera et al., 2008) es posible que esta hormona se encuentre entre los mecanismos autoprotectores activados por la luz. De esta forma con todo lo anterior proponemos que el paradigma de la hiperprolactinemia funciona a través de mimetizar dicha autoprotección a través de incrementar los niveles intraoculares de la PRL. Esta posibilidad deberá ser analizada a través de evaluar el efecto del reto por exposición a la luz sobre la expresión del RNA mensajero de la PRL en la retina.

La pérdida de funcionalidad en la retina ante retos como el daño luminoso tiene la propiedad de alterar el ERG a través de producir una disminución de las amplitudes de las ondas *a* y *b* y del aumento de sus tiempos de latencia. En nuestro modelo murino, el daño luminoso afecta principalmente a los bastones cuya actividad es la responsable de generar la onda *a* del ERG (Organisciak & Vaughan, 2010). Después de la exposición a la luz continua y bajo condiciones escotópicas, la hiperprolactinemia no tuvo efecto sobre la amplitud de la onda *a*, pero previno la disminución de la amplitud de la onda *b* y el retardo en su tiempo implícito en condiciones escotópicas. Dado que la onda *b* del ERG no deriva de la actividad de los fotorreceptores (bastones) sino de las neuronas de segundo orden y puede ser alterada por las células de Müller (Weymouth & Vingrys, 2008), se propone que la PRL actúa sobre estas dos últimas para ejercer sus efectos protectores. Cabe notar

que estos efectos protectores de la PRL sobre el rescate del ERG bajo condiciones escotópicas son similares a los observados tras la administración de factores neurotróficos como el factor inhibidor de la leucemia (LIF) (Ueki, Wang, Chollangi, & Ash, 2008), el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) (Cao et al., 2001) y el factor neutrófico derivado de cerebro (BDNF) (Ikeda, Tanihara, Tatsuno, Noguchi, & Nakayama, 2003) y de estrógenos (X. Yu et al., 2004). Adicionalmente, se encontró que la PRL preserva la amplitud y los tiempos implícitos de los potenciales oscilatorios escotópicos derivados de la onda *b*, cuyo origen se remite a las neuronas bipolares y amacrinas de tipo dopaminérgico (Wachtmeister, 1998). Notablemente, la disminución de las amplitudes de los potenciales oscilatorios se considera un signo temprano del daño retiniano en patologías como la retinopatía diabética y la hipertensión sistémica (Wachtmeister, 1998).

Por otra parte, el análisis del ERG bajo condiciones fotópicas de registro, indicó que la PRL también preserva la actividad eléctrica de los fotorreceptores. Así, se encontró que en registros fotópicos la PRL previno la disminución de la onda *b* del ERG, que bajo esta condición de luz, refleja mayoritariamente la actividad de los conos, aunque también de los bastones, si bien en menor grado. Al respecto, es de gran interés que estos efectos protectores de la hiperprolactinemia bajo condiciones fotópicas podrían contribuir a explicar la observación de que las mujeres durante el tercer trimestre del embarazo, cuando los niveles de PRL sérica son más altos, presentan una mayor amplitud de la onda *b* que las mujeres no embarazadas (De Luca Brunori et al., 1985).

Se conoce que las células de Müller responden a todo daño aplicado a los fotorreceptores (Bringmann et al., 2009). Nuestros resultados confirman esta observación, al mostrar que en respuesta al daño luminoso, tiene lugar un incremento en la expresión de GFAP en el filamento interno, el pie terminal y la membrana limitante interna de las células de Müller, indicativo de la activación de estas células o gliosis. Entre los mecanismos de protección retiniana derivados de la gliosis de las células de Müller, se encuentra el incremento en estas células de la expresión tanto de factores neuroprotectores como de sus receptores. Estos factores promueven la supervivencia de los fotorreceptores a través de efectos autócrinos o parácrinos (Bringmann et al., 2009). En este sentido, el incremento en la expresión del receptor de PRL en las células de Müller, tras el daño luminoso, apoya que el efecto protector de la PRL sobre la vitalidad de los fotorreceptores

podría estar mediado, al menos en parte, a través de su efecto sobre de las células de Müller promoviendo la producción de factores antiapoptóticos como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (T. Harada et al., 2000), el factor neurotrófico ciliar (CNTF) (Peterson, Wang, Tzekova, & Wiegand, 2000) y el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) (C. Harada et al., 2003). Por otro lado, la ausencia de un efecto de la hiperprolactinemia sobre la gliosis de las células de Müller y la expresión del receptor de PRL, parece indicar que la PRL por sí misma no desencadena mecanismos antiapoptóticos en estas células. De acuerdo a estas consideraciones, proponemos que en presencia del daño luminoso, la mayor expresión del receptor de PRL en las células de Müller facilitaría la acción de PRL presente en la retina capaz de estimular la producción y acción de factores antiapoptóticos por estas células. En este sentido, la hiperprolactinemia potenciaría estos mecanismos a través de incrementar los niveles intraoculares de la hormona.

Para investigar la posible participación de la PRL endógena en estos mecanismos, llevamos a cabo el análisis del ERG en los animales RPRL<sup>+/-</sup> y RPRL<sup>-/-</sup>. Encontramos que la ausencia parcial y total del receptor de PRL en la retina disminuye las amplitudes de las ondas *a*, *b* y los potenciales oscilatorios 2 y 4, observadas en los ERGs bajo condiciones escotópicas. Estos hallazgos indican que la PRL es indispensable para mantener la funcionalidad de la vía visual bajo condiciones normales. Además, apoyan el valor protector de la hiperprolactinemia contra las alteraciones del ERG observadas ante el daño luminoso. Cabe mencionar, que el deterioro de la amplitud de la onda *b* es mayor que el de la onda *a*, lo que es consistente con nuestra propuesta de que la acción protectora de la PRL involucra a las células de Müller. En este sentido, además del efecto antiapoptótico es posible que la PRL pudiera estar participando en la recaptura de neurotransmisores, del calcio, o en el control del estrés oxidativo que llevan a cabo las células de Müller y que se sabe preserva la onda *b* del ERG (Block & Schwarz, 1998). Por otro lado, las retinas de los ratones RPRL<sup>-/-</sup> no muestran alteraciones morfológicas aparentes con respecto a los animales silvestres lo cual sugiere que la PRL no es indispensable para mantener la supervivencia de los fotorreceptores bajo condiciones normales. Esta ausencia de efecto, probablemente se debe a la presencia de múltiples mecanismos redundantes, como ocurre para el ratón parcialmente deficiente de BDNF<sup>+/-</sup>

(Wilson, Kunchithapautham, & Rohrer, 2007). Al respecto sería de interés someter a los ratones desprovistos del receptor de la PRL al daño luminoso para evaluar si la ausencia de la PRL endógena influye sobre la supervivencia de los fotorreceptores amenazada por una situación de reto.

## VII. CONSIDERACIONES FINALES

En esta tesis se investigó el impacto funcional de la hormona PRL en la función ocular a través de analizar sus acciones sobre componentes vasculares y neurales de la retina. Por una parte, se demostró la participación de la PRL en el control de la microcirculación retiniana vía su conversión intraocular a vasoinhibinas y, por otra parte, se mostraron acciones neuroprotectoras de esta hormona sobre la funcionalidad de la vía visual.

Los hallazgos obtenidos demuestran la influencia de la hiperprolactinemia sobre la retina. Esto llama la atención, porque el ojo tiene una barrera hemato-retiniana que limita el paso de factores sistémicos, como son las hormonas, al interior de las estructuras y fluidos oculares. Nuestro trabajo mostró que el receptor de la PRL media la incorporación de la PRL sistémica a la retina y que dicha incorporación es función de los niveles circulantes de la hormona. A este respecto, los niveles de hiperprolactinemia generados en nuestro modelo experimental son equivalentes a los alcanzados durante el embarazo y la lactancia, lo que permite presuponer que bajo dichos estadios fisiológicos se favorecen los efectos protectores de la PRL sobre la retina. En este sentido, se ha mostrado que en mujeres embarazadas la onda *b* del ERG tiene una mayor amplitud (efecto que observamos en respuesta a la hiperprolactinemia en este estudio) (De Luca Brunori et al., 1985). Si bien, no se han analizado cambios en la microcirculación de la retina en relación al embarazo, es posible especular que una mayor generación de vasoinhibinas intraoculares tendría lugar a consecuencia de la hiperprolactinemia que caracteriza a esta fase del ciclo reproductor. De ser así, el aumento de vasoinhibinas oculares sería útil para contrarrestar el ambiente predominantemente proangiogénico que se genera durante el embarazo, en atención al crecimiento de ciertos órganos y sistemas de la madre y el producto, y que en la retina tendría repercusiones negativas.

Un aspecto importante de nuestro estudio es el análisis de las implicaciones clínicas que los efectos oculares de la hiperprolactinemia podrían tener sobre la progresión de la retinopatía diabética. Al respecto, un antecedente relevante que se generó en nuestro laboratorio en paralelo a esta tesis, fue el descubrimiento de que los niveles circulantes de

PRL se incrementan en la circulación de pacientes diabéticos pero que este aumento se reducen en aquellos pacientes con el grado más severo de la retinopatía diabética. Esta relación inversa entre la PRL circulante y la progresión de la retinopatía diabética nos llevó a investigar la posibilidad de que la hiperprolactinemia pudiera tener un valor protector contra el desarrollo de este padecimiento. Así, nuestros resultados mostraron que altos niveles de PRL en sangre se traducen en la acumulación de vasoinhibinas en la retina capaces de reducir alteraciones vasculares tempranas (excesiva vasopermeabilidad) debidas a la diabetes, quedando por elucidar el papel de las vasoinhibinas en las etapas proliferativas de la enfermedad que no se manifiestan en el modelo animal empleado (D. Y. Yu et al., 2001). Cabe mencionar que la inducción de diabetes por estreptozotocina se considera un modelo de diabetes tipo I. Sin embargo, los cambios en la microvasculatura retiniana que se presentan en este modelo tales como el engrosamiento de membrana basal, la dilatación y oclusión de los capilares y el incremento en la vasopermeabilidad retiniana (Bek, 1997; Masuzawa et al., 2006; Sosula, Beaumont, Hollows, & Jonson, 1972), se presentan de manera similar en todos los pacientes con retinopatía diabética sin importar si son diabéticos del tipo I o II (Gardner, Abcouwer, Barber, & Jackson, 2011). De tal manera, que el efecto protector de la hiperprolactinemia sobre la vasopermeabilidad retiniana puede extrapolarse a ambos tipos de diabetes. Adicionalmente, es bien conocido que los pacientes diabéticos presentan un deterioro neuronal que provoca cambios en el ERG incluso antes de las manifestaciones clínicas de la retinopatía diabética (Fletcher, Phipps, Ward, Puthussery, & Wilkinson-Berka, 2007; Tzekov & Arden, 1999). Estas alteraciones incluyen la disminución de las amplitudes de los potenciales oscilatorios derivados de la onda *b* del ERG y nuestro trabajo demostró que la hiperprolactinemia en respuesta a un daño neuronal preserva la amplitud normal de dichos potenciales. De tal manera, que es posible proponer que, además de contrarrestar cambios vasculares, la PRL circulante ejerce efectos protectores sobre la vía visual en la retinopatía diabética.

Una derivación lógica de este estudio es proponer a la hiperprolactinemia como un tratamiento efectivo para controlar el progreso y la severidad de la retinopatía diabética. Esto es importante porque hasta ahora, los tratamientos contra este padecimiento no son del todo efectivos. Por ejemplo, el más utilizado es la fotocoagulación con láser de la retina. A pesar de su alta efectividad en el 50% de los casos, su naturaleza destructiva

lesiona la retina y tiene efectos colaterales serios (Cheung et al., 2010). Esto ha hecho que el uso de factores capaces de contrarrestar los cambios vasculares se encuentre bajo intensa investigación. Por ejemplo, el empleo de anticuerpos contra el VEGF ha generado resultados positivos en pruebas clínicas si bien con algunos efectos secundarios (Cheung et al., 2010; Simo & Hernandez, 2008; Wirostko, Wong, & Simo, 2008). En este sentido se puede especular que la hiperprolactinemia y/o el tratamiento con PRL/vasoinhibinas tendrían ventajas adicionales sobre el uso de agentes encaminados a bloquear un solo factor proangiogénico como el VEGF. Esto en función de que las vasoinhibinas pueden contrarrestar las acciones vasculares de varias sustancias vasoactivas, incluido el VEGF; que la hiperprolactinemia favorece la supervivencia y funcionalidad de la vía visual, y que la inducción de hiperprolactinemia podría involucrar un tratamiento sistémico vs. una inyección intravitreal que es altamente invasiva y puede tener efectos colaterales serios (Cheung et al., 2010).

Es de notar que existen varias drogas utilizadas en la práctica clínica para inducir hiperprolactinemia y que incluyen medicamentos (Torre & Falorni, 2007). La eficiencia de estos medicamentos para producir hiperprolactinemia es variable como también los efectos colaterales asociados con su uso. Queda por investigar su potencial valor terapéutico para el control de las alteraciones vasculares y neuronales asociadas a la retinopatía diabética. En conclusión, los resultados de esta tesis proponen que la PRL sistémica es un inhibidor endógeno de la progresión del daño tanto vascular en la retinopatía diabética, así como un factor neurotrófico y neuroprotector de la retina.

## VIII. REFERENCIAS

- Adler, R. A. (1986). The anterior pituitary-grafted rat: a valid model of chronic hyperprolactinemia. *Endocr Rev*, 7(3), 302-313.
- Ahonen, T. J., Harkonen, P. L., Rui, H., & Nevalainen, M. T. (2002). PRL signal transduction in the epithelial compartment of rat prostate maintained as long-term organ cultures in vitro. *Endocrinology*, 143(1), 228-238.
- Allen, D. M., & Cristy, M. (1978). Thiourea does not block visual pigment responses to prolactin in trout. *Vision Res*, 18(7), 859-860.
- Aranda, J., Rivera, J. C., Jeziorski, M. C., Riesgo-Escovar, J., Nava, G., Lopez-Barrera, F., et al. (2005). Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(8), 2947-2953.
- Arnold, E., Rivera, J. C., Thebault, S., Moreno-Paramo, D., Quiroz-Mercado, H., Quintanar-Stephano, A., et al. (2010). High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes*, 59(12), 3192-3197.
- Bearse, M. A., Jr., Han, Y., Schneck, M. E., & Adams, A. J. (2004). Retinal function in normal and diabetic eyes mapped with the slow flash multifocal electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(1), 296-304.
- Bek, T. (1997). Glial cell involvement in vascular occlusion of diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol Scand*, 75(3), 239-243.
- Ben-Jonathan, N., & Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev*, 22(6), 724-763.
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R., & LaPensee, E. W. (2008). What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev*, 29(1), 1-41.
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L., & Steinmetz, R. W. (1996). Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*, 17(6), 639-669.

- Berlanga, J. J., Gualillo, O., Buteau, H., Applanat, M., Kelly, P. A., & Edery, M. (1997). Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *J Biol Chem*, 272(4), 2050-2052.
- Bhatnagar, A., Ghauri, A. J., Hope-Ross, M., & Lip, P. L. (2009). Diabetic retinopathy in pregnancy. *Curr Diabetes Rev*, 5(3), 151-156.
- Block, F., & Schwarz, M. (1998). The b-wave of the electroretinogram as an index of retinal ischemia. *Gen Pharmacol*, 30(3), 281-287.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*, 19(3), 225-268.
- Bringmann, A., Iandiev, I., Pannicke, T., Wurm, A., Hollborn, M., Wiedemann, P., et al. (2009). Cellular signaling and factors involved in Muller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res*, 28(6), 423-451.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813-820.
- Cajero-Juarez, M., Avila, B., Ochoa, A., Garrido-Guerrero, E., Varela-Echavarria, A., Martinez de la Escalera, G., et al. (2002). Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *Eur J Cell Biol*, 81(1), 1-8.
- Caldwell, R. B., Bartoli, M., Behzadian, M. A., El-Remessy, A. E., Al-Shabrawey, M., Platt, D. H., et al. (2003). Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev*, 19(6), 442-455.
- Caldwell, R. B., Bartoli, M., Behzadian, M. A., El-Remessy, A. E., Al-Shabrawey, M., Platt, D. H., et al. (2005). Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: role of oxidative stress. *Curr Drug Targets*, 6(4), 511-524.
- Cao, W., Tombran-Tink, J., Elias, R., Sezate, S., Mrazek, D., & McGinnis, J. F. (2001). In vivo protection of photoreceptors from light damage by pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(7), 1646-1652.
- Cerasola, G. A., Donatelli, M., Sinagra, D., Russo, V., Amico, L. M., & Lodato, G. (1981). Study of pituitary secretion in relation to retinopathy in patients with juvenile diabetes mellitus. *Acta Diabetol Lat*, 18(4), 319-328.

- Clapp, C., Aranda, J., Gonzalez, C., Jeziorski, M. C., & Martinez de la Escalera, G. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab*, *17*(8), 301-307.
- Clapp, C., Gonzalez, C., Macotela, Y., Aranda, J., Rivera, J. C., Garcia, C., et al. (2006). Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function. *Front Horm Res*, *35*, 64-73.
- Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delure, F., & Weiner, R. I. (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*, *133*(3), 1292-1299.
- Clapp, C., Thebault, S., Arnold, E., Garcia, C., Rivera, J. C., & de la Escalera, G. M. (2008). Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *295*(4), E772-778.
- Clapp, C., & Weiner, R. I. (1992). A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology*, *130*(3), 1380-1386.
- Clevenger, C. V. (2004). Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol*, *165*(5), 1449-1460.
- Clevenger, C. V., Furth, P. A., Hankinson, S. E., & Schuler, L. A. (2003). The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr Rev*, *24*(1), 1-27.
- Corbacho, A. M., Macotela, Y., Nava, G., Eiserich, J. P., Cross, C. E., Martinez de la Escalera, G., et al. (2003). Cytokine induction of prolactin receptors mediates prolactin inhibition of nitric oxide synthesis in pulmonary fibroblasts. *FEBS Lett*, *544*(1-3), 171-175.
- Crim, J. W. (1975a). Prolactin-induced modification on visual pigments in the eastern red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens*. *Gen Comp Endocrinol*, *26*(2), 233-242.
- Crim, J. W. (1975b). Prolactin-thyroxine antagonism and the metamorphosis of visual pigments in *Rana catesbeiana* tadpoles. *J Exp Zool*, *192*(3), 355-362.
- Cunha-Vaz, J. G. (1997). The blood-ocular barriers: past, present, and future. *Doc Ophthalmol*, *93*(1-2), 149-157.

- Chaum, E. (2003). Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. *J Cell Biochem*, 88(1), 57-75.
- Chen, J., & Smith, L. E. (2007). Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis*, 10(2), 133-140.
- Cheung, N., Mitchell, P., & Wong, T. Y. (2010). Diabetic retinopathy. *Lancet*, 376(9735), 124-136.
- D'Angelo, G., Martini, J. F., Iiri, T., Fantl, W. J., Martial, J., & Weiner, R. I. (1999). 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol Endocrinol*, 13(5), 692-704.
- De Luca Brunori, I., Moggi, G., Fornaro, P., Teti, G., Murru, S., Gadducci, A., et al. (1985). Evaluation of the central dopaminergic activity in gestational hyperprolactinaemia by means of the electroretinographic technique. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 12(1-2), 13-15.
- Diabetes Control and Complications Trial Research, G. (2000). Effect of pregnancy on microvascular complications in the diabetes control and complications trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes Care*, 23(8), 1084-1091. doi: 10.2337/diacare.23.8.1084
- Donovan, M., Carmody, R. J., & Cotter, T. G. (2001). Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent. *J Biol Chem*, 276(25), 23000-23008.
- Duenas, Z., Rivera, J. C., Quiroz-Mercado, H., Aranda, J., Macotela, Y., Montes de Oca, P., et al. (2004). Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(7), 2049-2055.
- Duenas, Z., Torner, L., Corbacho, A. M., Ochoa, A., Gutierrez-Ospina, G., Lopez-Barrera, F., et al. (1999). Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(11), 2498-2505.
- Eckstein, A. K., Reichenbach, A., Jacobi, P., Weber, P., Gregor, M., & Zrenner, E. (1997). Hepatic retinopathy. Changes in retinal function. *Vision Res*, 37(12), 1699-1706.
- Ferrara, N., Houck, K. A., Jakeman, L. B., Winer, J., & Leung, D. W. (1991). The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem*, 47(3), 211-218.

- Fletcher, E. L., Phipps, J. A., Ward, M. M., Puthussery, T., & Wilkinson-Berka, J. L. (2007). Neuronal and glial cell abnormality as predictors of progression of diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des*, 13(26), 2699-2712.
- Fox, S. R., Jong, M. T., Casanova, J., Ye, Z. S., Stanley, F., & Samuels, H. H. (1990). The homeodomain protein, Pit-1/GHF-1, is capable of binding to and activating cell-specific elements of both the growth hormone and prolactin gene promoters. *Mol Endocrinol*, 4(7), 1069-1080.
- Froland, A., Hagen, C., & Lauritzen, E. (1977). Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet*, 1(8001), 45.
- Fujinaka, Y., Takane, K., Yamashita, H., & Vasavada, R. C. (2007). Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *J Biol Chem*, 282(42), 30707-30717.
- Fulton, A. B., Greenwood, V., Hansen, R. M., McGill, M. G., Russell, R. M., Deuster, P. A., et al. (1989). Dark adaptation in hyperprolactinemic women. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 30(6), 1177-1180.
- Funatsu, H., Yamashita, H., Noma, H., Mimura, T., Nakamura, S., Sakata, K., et al. (2005). Aqueous humor levels of cytokines are related to vitreous levels and progression of diabetic retinopathy in diabetic patients. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 243(1), 3-8.
- Ganong, W. (1993). *Fisiología médica* (14a. edición ed.). México: Manual Moderno.
- Gao, B. B., Clermont, A., Rook, S., Fonda, S. J., Srinivasan, V. J., Wojtkowski, M., et al. (2007). Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med*, 13(2), 181-188.
- Garcia, C., Aranda, J., Arnold, E., Thebault, S., Macotela, Y., Lopez-Casillas, F., et al. (2008). Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest*, 118(6), 2291-2300.
- Gardner, T. W., Abcouwer, S. F., Barber, A. J., & Jackson, G. R. (2011). An integrated approach to diabetic retinopathy research. *Arch Ophthalmol*, 129(2), 230-235.
- Gariano, R. F., & Gardner, T. W. (2005). Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*, 438(7070), 960-966.

- Ge, G., Fernandez, C. A., Moses, M. A., & Greenspan, D. S. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(24), 10010-10015.
- Gehring, W. J. (2004). Historical perspective on the development and evolution of eyes and photoreceptors. *Int J Dev Biol*, *48*(8-9), 707-717.
- Goffin, V., & Kelly, P. A. (1997). The prolactin/growth hormone receptor family: structure/function relationships. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *2*(1), 7-17.
- Gonzalez, C., Corbacho, A. M., Eiserich, J. P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., et al. (2004). 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*, *145*(12), 5714-5722.
- Gouras, P., & Hoff, M. (1970). Retinal function in an isolated, perfused mammalian eye. *Invest Ophthalmol*, *9*(5), 388-399.
- Granit, R. (1950). Physiology of vision. *Annu Rev Physiol*, *12*, 485-502.
- Green, D. G. (1973). Scotopic and photopic components of the rat electroretinogram. *J Physiol*, *228*(3), 781-797.
- Gregg, C., Shikar, V., Larsen, P., Mak, G., Chojnacki, A., Yong, V. W., et al. (2007). White matter plasticity and enhanced remyelination in the maternal CNS. *J Neurosci*, *27*(8), 1812-1823.
- Haddad, P. M., & Wieck, A. (2004). Antipsychotic-induced hyperprolactinaemia: mechanisms, clinical features and management. *Drugs*, *64*(20), 2291-2314.
- Hamel, C. P. (2007). Cone rod dystrophies. *Orphanet J Rare Dis*, *2*, 7.
- Harada, C., Harada, T., Quah, H. M., Maekawa, F., Yoshida, K., Ohno, S., et al. (2003). Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Muller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience*, *122*(1), 229-235.
- Harada, T., Harada, C., Nakayama, N., Okuyama, S., Yoshida, K., Kohsaka, S., et al. (2000). Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron*, *26*(2), 533-541.

- Harter, M., Balarac, N., Pourcher, P., Koslowski, J. M., Krebs, B., & Ramaioli, A. (1976). Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet*, 2(7992), 961-962.
- Haurigot, V., Villacampa, P., Ribera, A., Llombart, C., Bosch, A., Nacher, V., et al. (2009). Increased intraocular insulin-like growth factor-I triggers blood-retinal barrier breakdown. *J Biol Chem*, 284(34), 22961-22969.
- Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Podewski, E., Bonda, T., Schaefer, A., Sliwa, K., et al. (2007). A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell*, 128(3), 589-600.
- Holder, G. E., Robson, A. G., Pavesio, C., & Graham, E. M. (2005). Electrophysiological characterisation and monitoring in the management of birdshot chorioretinopathy. *Br J Ophthalmol*, 89(6), 709-718.
- Huang, X., Hui, M. N., Liu, Y., Yuen, D. S., Zhang, Y., Chan, W. Y., et al. (2009). Discovery of a novel prolactin in non-mammalian vertebrates: evolutionary perspectives and its involvement in teleost retina development. *PLoS One*, 4(7), e6163.
- Hunter, P. R., Anderson, J., Lunn, T. A., Horrobin, D. F., Boyns, A. R., & Cole, E. N. (1974). Letter: Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet*, 1(7868), 1237.
- Ikeda, K., Tanihara, H., Tatsuno, T., Noguchi, H., & Nakayama, C. (2003). Brain-derived neurotrophic factor shows a protective effect and improves recovery of the ERG b-wave response in light-damage. *J Neurochem*, 87(2), 290-296.
- Jardeleza, M. S., & Miller, J. W. (2009). Review of anti-VEGF therapy in proliferative diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol*, 24(2), 87-92.
- 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(3), 199-212.
- Kaur, C., Foulds, W. S., & Ling, E. A. (2008). Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Prog Retin Eye Res*, 27(6), 622-647.
- Kochendoerfer, S. K., Krishnan, N., Buckley, D. J., & Buckley, A. R. (2003). Prolactin regulation of Bcl-2 family members: increased expression of bcl-xL but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *J Endocrinol*, 178(2), 265-273.

- Krishnan, N., Thellin, O., Buckley, D. J., Horseman, N. D., & Buckley, A. R. (2003). Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology*, *144*(5), 2102-2110.
- Larinkari, J., Laatikainen, L., Ranta, T., Moronen, P., Pesonen, K., & Laatikainen, T. (1982). Metabolic control and serum hormone levels in relation to retinopathy in diabetic pregnancy. *Diabetologia*, *22*(5), 327-332.
- Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J., & Weiner, R. I. (1998). Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology*, *139*(9), 3696-3703.
- Lee, S. H., Kunz, J., Lin, S. H., & Yu-Lee, L. Y. (2007). 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Res*, *67*(22), 11045-11053.
- Leff, M. A., Buckley, D. J., Krumenacker, J. S., Reed, J. C., Miyashita, T., & Buckley, A. R. (1996). Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, bcl-2 and bax by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology*, *137*(12), 5456-5462.
- Levin, L., Di Polo, A. (2003). *Ocular neuroprotection*. New York: M. Dekker.
- Liu, C., Peng, M., Laties, A. M., & Wen, R. (1998). Preconditioning with bright light evokes a protective response against light damage in the rat retina. *J Neurosci*, *18*(4), 1337-1344.
- Lorenz, B., Gyurus, P., Preising, M., Bremser, D., Gu, S., Andrassi, M., et al. (2000). Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *41*(9), 2735-2742.
- Macotela, Y., Aguilar, M. B., Guzman-Morales, J., Rivera, J. C., Zermeno, C., Lopez-Barrera, F., et al. (2006). Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci*, *119*(Pt 9), 1790-1800.
- Machida, S., Tanaka, M., Ishii, T., Ohtaka, K., Takahashi, T., & Tazawa, Y. (2004). Neuroprotective effect of hepatocyte growth factor against photoreceptor degeneration in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *45*(11), 4174-4182.
- Maeda, A., Maeda, T., Golczak, M., Imanishi, Y., Leahy, P., Kubota, R., et al. (2006). Effects of potent inhibitors of the retinoid cycle on visual function and photoreceptor protection from light damage in mice. *Mol Pharmacol*, *70*(4), 1220-1229.

- Mangurian, L. P., Walsh, R. J., & Posner, B. I. (1992). Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology*, *131*(2), 698-702.
- Martini, J. F., Piot, C., Humeau, L. M., Struman, I., Martial, J. A., & Weiner, R. I. (2000). The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol*, *14*(10), 1536-1549.
- Masuzawa, K., Jesmin, S., Maeda, S., Zaedi, S., Shimojo, N., Miyauchi, T., et al. (2006). Effect of endothelin dual receptor antagonist on VEGF levels in streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Exp Biol Med (Maywood)*, *231*(6), 1090-1094.
- Merimee, T. J., Zapf, J., & Froesch, E. R. (1983). Insulin-like growth factors. Studies in diabetics with and without retinopathy. *N Engl J Med*, *309*(9), 527-530.
- Moloney, J. B., & Drury, M. I. (1982). The effect of pregnancy on the natural course of diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*, *93*(6), 745-756.
- Mooradian, A. D., Morley, J. E., Billington, C. J., Slag, M. F., Elson, M. K., & Shafer, R. B. (1985). Hyperprolactinaemia in male diabetics. *Postgrad Med J*, *61*(711), 11-14.
- Nakazawa, T., Shimura, M., Tomita, H., Akiyama, H., Yoshioka, Y., Kudou, H., et al. (2003). Intrinsic activation of PI3K/Akt signaling pathway and its neuroprotective effect against retinal injury. *Curr Eye Res*, *26*(1), 55-63.
- Navaratna, D., McGuire, P. G., Menicucci, G., & Das, A. (2007). Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes*, *56*(9), 2380-2387.
- Nebbioso, M., Grenga, R., & Karavitis, P. (2009). Early detection of macular changes with multifocal ERG in patients on antimalarial drug therapy. *J Ocul Pharmacol Ther*, *25*(3), 249-258.
- Nickla, D. L., & Wallman, J. (2010). The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res*, *29*(2), 144-168.
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. (2009). Quantitation of protein. *Methods Enzymol*, *463*, 73-95.
- Noell, W. K., Walker, V. S., Kang, B. S., & Berman, S. (1966). Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol*, *5*(5), 450-473.

- Nusinowitz, S., Hood, D. C., & Birch, D. G. (1995). Rod transduction parameters from the a wave of local receptor populations. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*, 12(10), 2259-2266.
- O'Driscoll, C., O'Connor, J., O'Brien, C. J., & Cotter, T. G. (2008). Basic fibroblast growth factor-induced protection from light damage in the mouse retina in vivo. *J Neurochem*, 105(2), 524-536.
- O'Steen, W. K., & Kraeer, S. L. (1977). Effects of hypophysectomy, pituitary gland homogenates and transplants, and prolactin on photoreceptor destruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 16(10), 940-946.
- O'Steen, W. K., & Sundberg, D. K. (1982). Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic Res*, 14(1), 54-62.
- Obal, F., Jr., Kacsoh, B., Bredow, S., Guha-Thakurta, N., & Krueger, J. M. (1997). Sleep in rats rendered chronically hyperprolactinemic with anterior pituitary grafts. *Brain Res*, 755(1), 130-136.
- Olaiz-Fernández G, R.-D. J., Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. (2006). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006*. Cuernava, México.: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Organisciak, D. T., & Vaughan, D. K. (2010). Retinal light damage: Mechanisms and protection. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(2), 113-134.
- Ormandy, C. J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B., Buteau, H., et al. (1997). Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev*, 11(2), 167-178.
- Oyster, C. (1999). *The human eye: structure and function*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- Pan, H., Nguyen, N. Q., Yoshida, H., Bentzien, F., Shaw, L. C., Rentier-Delrue, F., et al. (2004). Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(7), 2413-2419.
- Penn, J. S., & Williams, T. P. (1986). Photostasis: regulation of daily photon-catch by rat retinas in response to various cyclic illuminances. *Exp Eye Res*, 43(6), 915-928.

- Perks, C. M., Newcomb, P. V., Grohmann, M., Wright, R. J., Mason, H. D., & Holly, J. M. (2003). Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide-induced apoptosis in human granulosa cells. *Hum Reprod*, 18(12), 2672-2677.
- Peterson, W. M., Wang, Q., Tzekova, R., & Wiegand, S. J. (2000). Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia. *J Neurosci*, 20(11), 4081-4090.
- Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., Clapp, C., et al. (2004). Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Mol Endocrinol*, 18(10), 2522-2542.
- Qaum, T., Xu, Q., Jousen, A. M., Clemens, M. W., Qin, W., Miyamoto, K., et al. (2001). VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(10), 2408-2413.
- Rivera, J. C., Aranda, J., Riesgo, J., Nava, G., Thebault, S., Lopez-Barrera, F., et al. (2008). Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Exp Eye Res*, 86(2), 314-321.
- Rivera López, J. C. (2008). *Análisis de la participación de la prolactina y de las vaso-inhíbitoras en la fisiopatología de las retinopatías vasoproliferativas*. Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro.
- Rosolen, S. G., Rigaudiere, F., Le Gargasson, J. F., & Brigell, M. G. (2005). Recommendations for a toxicological screening ERG procedure in laboratory animals. *Doc Ophthalmol*, 110(1), 57-66.
- Sandberg, M. A., Weigel-DiFranco, C., Rosner, B., & Berson, E. L. (1996). The relationship between visual field size and electroretinogram amplitude in retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(8), 1693-1698.
- Sapieha, P., Hamel, D., Shao, Z., Rivera, J. C., Zaniolo, K., Joyal, J. S., et al. (2010). Proliferative retinopathies: angiogenesis that blinds. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(1), 5-12.
- Sato, F., Aoki, H., Nakamura, K., Taguchi, M., Aoki, T., & Yasuda, N. (1997). Suppressive effects of chronic hyperprolactinemia on penile erection and yawning following administration of apomorphine to pituitary-transplanted rats. *J Androl*, 18(1), 21-25.

- Scholl, H. P., & Zrenner, E. (2000). Electrophysiology in the investigation of acquired retinal disorders. *Surv Ophthalmol*, 45(1), 29-47.
- Seddiki, T., Delpal, S., Aubourg, A., Durand, G., & Ollivier-Bousquet, M. (2002). Endocytic prolactin routes to the secretory pathway in lactating mammary epithelial cells. *Biol Cell*, 94(3), 173-185.
- Sharif, N. A. (1988). Chronic prolactin, gonadal and thyroid hormone treatments in vivo alter levels of TRH and muscarinic receptors in male and female rat tissues. *Brain Res*, 449(1-2), 364-368.
- Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., et al. (2003). Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science*, 299(5603), 117-120.
- Simo, R., & Hernandez, C. (2008). Intravitreal anti-VEGF for diabetic retinopathy: hopes and fears for a new therapeutic strategy. *Diabetologia*, 51(9), 1574-1580.
- Sinha, Y. N. (1995). Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*, 16(3), 354-369.
- Smith, M. S. (2004). Anterior pituitary hormones: development of a bioassay leading to the discovery of prolactin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287(5), E813-814.
- Sosula, L., Beaumont, P., Hollows, F. C., & Jonson, K. M. (1972). Dilatation and endothelial proliferation of retinal capillaries in streptozotocin-diabetic rats: quantitative electron microscopy. *Invest Ophthalmol*, 11(11), 926-935.
- Stockton, R. A., & Slaughter, M. M. (1989). B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J Gen Physiol*, 93(1), 101-122.
- Sun, Y., Lu, X., & Gershengorn, M. C. (2003). Thyrotropin-releasing hormone receptors - similarities and differences. *J Mol Endocrinol*, 30(2), 87-97.
- Sung, C. H., & Chuang, J. Z. (2010). The cell biology of vision. *J Cell Biol*, 190(6), 953-963.
- Sustar, M., Stirn-Kranjc, B., Hawlina, M., & Breclj, J. (2008). Photopic ON- and OFF-responses in complete type of congenital stationary night blindness in relation to stimulus intensity. *Doc Ophthalmol*, 117(1), 37-46.

- Swaminathan, G., Varghese, B., & Fuchs, S. Y. (2008). Regulation of prolactin receptor levels and activity in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, *13*(1), 81-91.
- Tabruyn, S. P., Sorlet, C. M., Rentier-Delrue, F., Bours, V., Weiner, R. I., Martial, J. A., et al. (2003). The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol*, *17*(9), 1815-1823.
- Tafreshi, A., Racette, L., Weinreb, R. N., Sample, P. A., Zangwill, L. M., Medeiros, F. A., et al. (2010). Pattern electroretinogram and psychophysical tests of visual function for discriminating between healthy and glaucoma eyes. *Am J Ophthalmol*, *149*(3), 488-495.
- Tanaka, T., Shiu, R. P., Gout, P. W., Beer, C. T., Noble, R. L., & Friesen, H. G. (1980). A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab*, *51*(5), 1058-1063.
- Tessier, C., Prigent-Tessier, A., Ferguson-Gottschall, S., Gu, Y., & Gibori, G. (2001). PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology*, *142*(9), 4086-4094.
- Torre, D. L., & Falorni, A. (2007). Pharmacological causes of hyperprolactinemia. *Ther Clin Risk Manag*, *3*(5), 929-951.
- Tortora, G., Grabowski SR. (2002). *Principios de anatomía y fisiología*. (R. Sanchez, Trans. 9a. edición ed.). México, D.F.: Oxford University Press México, S.A. de C.V.
- Triebel, J., Huefner, M., & Ramadori, G. (2009). Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol*, *161*(2), 345-353.
- Tzekov, R., & Arden, G. B. (1999). The electroretinogram in diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol*, *44*(1), 53-60.
- Ueki, Y., Wang, J., Chollangi, S., & Ash, J. D. (2008). STAT3 activation in photoreceptors by leukemia inhibitory factor is associated with protection from light damage. *J Neurochem*, *105*(3), 784-796.

- Viridi, P. S., & Hayreh, S. S. (1982). Ocular neovascularization with retinal vascular occlusion. I. Association with experimental retinal vein occlusion. *Arch Ophthalmol*, *100*(2), 331-341.
- Wachtmeister, L. (1998). Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res*, *17*(4), 485-521.
- Watanabe, D., Suzuma, K., Matsui, S., Kurimoto, M., Kiryu, J., Kita, M., et al. (2005). Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, *353*(8), 782-792.
- Watt, S. M., Athanassopoulos, A., Harris, A. L., & Tsaknakis, G. (2010). Human endothelial stem/progenitor cells, angiogenic factors and vascular repair. *J R Soc Interface*, *7 Suppl 6*, S731-751.
- Weidner, C. (1976). The c-wave in the ERG of albino rat. *Vision Res*, *16*(7), 753-763.
- Wen, R., Song, Y., Cheng, T., Matthes, M. T., Yasumura, D., LaVail, M. M., et al. (1995). Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina. *J Neurosci*, *15*(11), 7377-7385.
- Wenzel, A., Grimm, C., Samardzija, M., & Reme, C. E. (2005). Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*, *24*(2), 275-306.
- Weymouth, A. E., & Vingrys, A. J. (2008). Rodent electroretinography: methods for extraction and interpretation of rod and cone responses. *Prog Retin Eye Res*, *27*(1), 1-44.
- Wilson, R. B., Kunchithapautham, K., & Rohrer, B. (2007). Paradoxical role of BDNF: BDNF+/- retinas are protected against light damage-mediated stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *48*(6), 2877-2886.
- Wirostko, B., Wong, T. Y., & Simo, R. (2008). Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog Retin Eye Res*, *27*(6), 608-621.
- Wright, A. D., Kohner, E. M., Oakley, N. W., Hartog, M., Joplin, G. F., & Fraser, T. R. (1969). Serum growth hormone levels and the response of diabetic retinopathy to pituitary ablation. *Br Med J*, *2*(5653), 346-348.

- Wu, J., Peachey, N. S., & Marmorstein, A. D. (2004). Light-evoked responses of the mouse retinal pigment epithelium. *J Neurophysiol*, *91*(3), 1134-1142.
- Yin, P., & Arita, J. (2000). Differential regulation of prolactin release and lactotrope proliferation during pregnancy, lactation and the estrous cycle. *Neuroendocrinology*, *72*(2), 72-79.
- Yu, D. Y., Cringle, S. J., Su, E. N., Yu, P. K., Jerums, G., & Cooper, M. E. (2001). Pathogenesis and intervention strategies in diabetic retinopathy. *Clin Experiment Ophthalmol*, *29*(3), 164-166.
- Yu, X., Rajala, R. V., McGinnis, J. F., Li, F., Anderson, R. E., Yan, X., et al. (2004). Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection. *J Biol Chem*, *279*(13), 13086-13094.
- Zermeño, C., Guzman-Morales, J., Macotela, Y., Nava, G., Lopez-Barrera, F., Kouri, J. B., et al. (2006). Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J Endocrinol*, *189*(2), R1-8.

## IX. ANEXO: PUBLICACIÓN

## BRIEF REPORT

## High Levels of Serum Prolactin Protect Against Diabetic Retinopathy by Increasing Ocular Vasoinhibins

Edith Arnold,<sup>1</sup> José C. Rivera,<sup>1</sup> Stéphanie Thebault,<sup>1</sup> Daniel Moreno-Páramo,<sup>2</sup> Hugo Quiroz-Mercado,<sup>2,3,4</sup> Andrés Quintanar-Stéphano,<sup>5</sup> Nadine Binart,<sup>6</sup> Gonzalo Martínez de la Escalera,<sup>1</sup> and Carmen Clapp<sup>1</sup>

**OBJECTIVE**—Increased retinal vasopermeability (RVP) occurs early in diabetes and is crucial for the development of sight-threatening proliferative diabetic retinopathy (DR). The hormone prolactin (PRL) is proteolytically processed to vasoinhibins, a family of peptides that inhibit the excessive RVP related to DR. Here, we investigate the circulating levels of PRL in association with DR in men and test whether increased circulating PRL, by serving as a source of ocular vasoinhibins, can reduce the pathological RVP in diabetes.

**RESEARCH DESIGN AND METHODS**—Serum PRL was evaluated in 40 nondiabetic and 181 diabetic men at various stages of DR. Retinal vasoinhibins were measured in rats rendered hyperprolactinemic by placing two anterior pituitary grafts under the kidney capsule and in PRL receptor–null mice. RVP was determined in hyperprolactinemic rats subjected to the intraocular injection of vascular endothelial growth factor (VEGF) or made diabetic with streptozotocin.

**RESULTS**—The circulating levels of PRL increased in diabetes and were higher in diabetic patients without retinopathy than in those with proliferative DR. In rodents, hyperprolactinemia led to vasoinhibin accumulation within the retina; genetic deletion of the PRL receptor prevented this effect, indicating receptor-mediated incorporation of systemic PRL into the eye. Hyperprolactinemia reduced both VEGF-induced and diabetes-induced increase of RVP. This reduction was blocked by bromocriptine, an inhibitor of pituitary PRL secretion, which lowers the levels of circulating PRL and retinal vasoinhibins.

**CONCLUSIONS**—Circulating PRL influences the progression of DR after its intraocular conversion to vasoinhibins. Inducing hyperprolactinemia may represent a novel therapy against DR. *Diabetes* 59:3192–3197, 2010

**D**iabetic retinopathy (DR) develops from a microangiopathy, in which the loss of pericytes and endothelial cells results in abnormally permeable retinal capillaries. In its early stages, elevated retinal vasopermeability causes intraretinal hemorrhages and exudates that, together with capillary closure, create nonperfusion areas. Over time, the resulting hypoxia stimulates the local production of proangiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF); the newly formed blood vessels extend and bleed into the vitreous, eventually causing detachment of the retina from the accompanying fibrous tissue as well as loss of vision (1). The current treatments for DR, laser photocoagulation and vitrectomy, are often effective but can be destructive and only treat the advanced disease (2). Thus, developing new strategies to oppose both excessive retinal vasopermeability and angiogenic responses has become a major research focus.

Vasoinhibins are a family of antiangiogenic prolactin (PRL) fragments (3) that inhibit ischemia-induced retinal angiogenesis (4) and prevent excessive retinal vasopermeability associated with diabetes (5). Vasoinhibins are present in the retina (6), and because radioactive PRL injected intracardially is incorporated into ocular tissues (ciliary body, choroid, and retina) (7), we reasoned that a portion of ocular vasoinhibins could originate from the intraocular cleavage of PRL coming from the circulation; therefore, high levels of serum PRL in diabetic patients may restrain DR progression.

### RESEARCH DESIGN AND METHODS

The Institutional Review Board of the Hospital “Dr. Luis Sánchez Bulnes” approved the protocol for blood sample collection. All subjects were recruited in this hospital, provided written informed consent before collection of samples, and were treated in accord with the tenets of the Declaration of Helsinki. The cohort consisted of 181 male mestizo patients with type 1 or type 2 diabetes and an estimated mean time from disease onset of  $13.6 \pm 0.7$  years. Forty healthy male, mestizo volunteers without diabetes served as control subjects. The mean age of the diabetic patients was  $61.3 \pm 1.2$  years, and that of the control group was  $57.0 \pm 1.7$  years. All participants underwent clinical evaluation and a comprehensive ophthalmologic examination including visual field testing, intraocular pressure evaluation, slit-lamp biomicroscopy, and indirect ophthalmoscopy. Also, fluorescein angiography was performed in all patients with DR. Patients with diabetes were under glycemic control and receiving either insulin or oral antidiabetic agents and an appropriate diet. Exclusion criteria included the treatment with common medications causing hyperprolactinemia (major tranquilizers and antipsychotics [chlorpromazine, haloperidol, risperidone, and amisulpride], prokinetics [metoclopramide and domperidone], or antihypertensive drugs [ $\alpha$ -methyl dopa, reserpine, and verapamil]), and having renal dysfunction (serum creatinine  $>1.5$  mg/dl). Based on the international clinical DR severity scale (8), patients with diabetes were classified as having no DR (NDR) ( $n = 37$ ), nonproliferative DR (NPDR) ( $n = 92$ ), or proliferative DR (PDR) ( $n = 72$ ). Table 1 summarizes the demographics and attributes of all patients studied. Blood samples were obtained by

From the <sup>1</sup>Neurobiology Institute, National University of Mexico (UNAM), Campus UNAM-Juriquilla, Juriquilla, Queretaro, Mexico; the <sup>2</sup>Association for the Prevention of Blindness (APEC), Hospital “Dr. Luis Sánchez Bulnes,” Mexico City, Mexico; the <sup>3</sup>Denver Health Medical Center, Denver, Colorado; the <sup>4</sup>Department of Ophthalmology, School of Medicine, University of Colorado, Denver, Colorado; the <sup>5</sup>Center for Basic Sciences, University of Aguascalientes, Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico; <sup>6</sup>INSERM U845, University Paris-Descartes, Faculty of Medicine, Paris, France.

Corresponding author: Carmen Clapp, clapp@unam.mx.

Received 22 June 2010 and accepted 24 August 2010. Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 7 September 2010. DOI: 10.2337/db10-0873.

E.A. and J.C.R. contributed equally to this work.

© 2010 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

TABLE 1  
Characteristics of the male subjects studied

	Control subjects*	Diabetic patients			Comparison among the three diabetic groups <i>P</i>
		NDR	NPDR	PDR	
Age (years)	57.7 ± 1.7	61.9 ± 1.8	61.8 ± 1.8	61.2 ± 1.0	NS
<i>n</i>	40	37	92	72	
Type 1 diabetes ( <i>n</i> )	NA	0	16	7	NA
Type 2 diabetes ( <i>n</i> )	NA	37	76	65	NA
Diabetes duration (years)	NA	14.3 ± 0.9	14.0 ± 0.6	13.9 ± 0.7	NS
<i>n</i>		37	92	50	
Glucose (mg/dl)	86.6 ± 3.2	156.9 ± 16.1†	177.7 ± 14.4†	165.6 ± 24.0†	NS
<i>n</i>	7	26	39	23	
Hb1Ac (%)	—	8.3 ± 0.5	9.8 ± 0.6	9.2 ± 1.4	NS
<i>n</i>		14	19	5	
Cholesterol (mg/dl)	—	194.8 ± 10.6	195.3 ± 9.8	235.3 ± 11.2	‡<0.05
<i>n</i>		23	35	20	
Creatinine (mg/dl)	—	0.85 ± 0.04	0.90 ± 0.03	0.84 ± 0.03	NS
<i>n</i>		37	92	52	
Systolic BP (mmHg)	120.6 ± 1.3	127.5 ± 3.3	126.6 ± 3.3	134.3 ± 4.1†	‡<0.05
<i>n</i>	40	25	36	29	
Diastolic BP (mmHg)	78.2 ± 0.7	74.4 ± 1.7	76.0 ± 2.1	79.0 ± 2.0	‡<0.05
<i>n</i>	40	25	36	29	
Prolactin (ng/ml)	16.3 ± 1.7	34.1 ± 3.6	32.8 ± 4.9	26.7 ± 2.7	§<0.005;   <0.05
<i>n</i>	40	37	92	72	

Data are means ± SEM or *n*. Diabetic patients were without diabetic retinopathy (NDR); with nonproliferative diabetic retinopathy (NPDR), and with proliferative diabetic retinopathy (PDR). \*Volunteers with no diabetes-related disorders. †vs. control subjects  $P < 0.001$ . ‡NDR = NPDR < PDR. §Control subject < NDR. ||NDR = NPDR > PDR. BP, blood pressure; NA, not applicable. NS,  $P > 0.05$ ; —, not determined.

venipuncture from a peripheral vein after overnight fasting and prior to any treatment. Serum was collected and kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use.

Male Wistar rats (250–300 g) and PRL receptor-null and age-matched wild-type mice (9 weeks, 129SvJ background) were maintained and treated in accord with the guidelines of the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The Bioethics Committee of the Institute of Neurobiology from the National University of Mexico (UNAM) approved all animal experiments. Hyperprolactinemia was induced by the implantation of two anterior pituitary glands (APs) under the kidney capsule as previously described (9), and sham rats were subjected to similar surgery without implantation. Ten days after surgery, AP-implanted and nonimplanted rats received a daily, intraperitoneal (i.p.) injection of vehicle or bromocriptine (5 mg/kg body wt); 5 days later, all animals were killed and the sera and retinas collected to evaluate PRL and vasoinhibin levels, respectively. In other experiments, rats with or without AP implants for 15 days were anesthetized with 70% ketamine and 30% xylazine (1  $\mu\text{l}/\text{kg}$  body wt, i.p.) and injected intravitreally with PBS or 9  $\mu\text{mol}/\text{l}$  recombinant human VEGF (rhVEGF<sub>165</sub>; gift from Genentech, South San Francisco, CA) as described (5). After 24 h, retinal vasopermeability was evaluated by fluorescein angiography and the Evans blue method. Finally, to induce a diabetic state, rats with or without AP implants for 15 days were injected or not with a single i.p. dose of streptozotocin (60 mg/kg in 10 mmol/l citrate buffer, pH 4.5) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) after overnight fasting. Rats with a blood glucose concentration  $\geq 250$  mg/dl were considered diabetic. After 75 days, animals were killed to determine the levels of serum PRL and retinal vasoinhibins or to evaluate the level of retinal vasopermeability by the Evans blue method. Some groups of diabetic and nondiabetic rats, with or without AP implants, were injected daily with bromocriptine 5 days before being killed.

**Serum PRL.** Serum PRL was measured in human subjects by a commercial ELISA kit (Genzyme Diagnostics, San Carlos, CA) or in rats and mice by the Nb2 cell bioassay, a standard procedure based on the proliferative response of the Nb2 lymphoma cells to PRL (10).

**Western blot.** Pools of rat or mouse retinas (four or six, respectively) were homogenized in 0.5% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 50 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin (pH 7) and centrifuged (9,600g for 10 min). Supernatant protein (50  $\mu\text{g}$ ) was resolved by 15% SDS-polyacrylamide gels under reducing conditions, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with 1:500 monoclonal antibody INN-1 to rat PRL that reacts with the NH<sub>2</sub>-terminus of PRL (6), or with 1:500 antiserum to mouse PRL (APP-131078; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD). Secondary antibodies conjugated to alkaline

phosphatase (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) were used. Optical density values were determined using the Quantity One, 1-D analysis software (Bio-Rad, Hercules, CA).

**Immunohistochemistry.** Rat eyes were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Twelve-micrometer paraffin sections were then processed for immunohistochemistry using 1:100 monoclonal anti-PRL receptor U-5 antibody (Novus Biologicals, Littleton, CO) and an avidin-biotin-peroxidase reaction (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

**Fluorescein isothiocyanate-dextran angiography.** Fluorescein isothiocyanate (FITC) angiography was carried out as reported (11). Blood vessel network was delineated and its area quantified using the Image Pro-Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

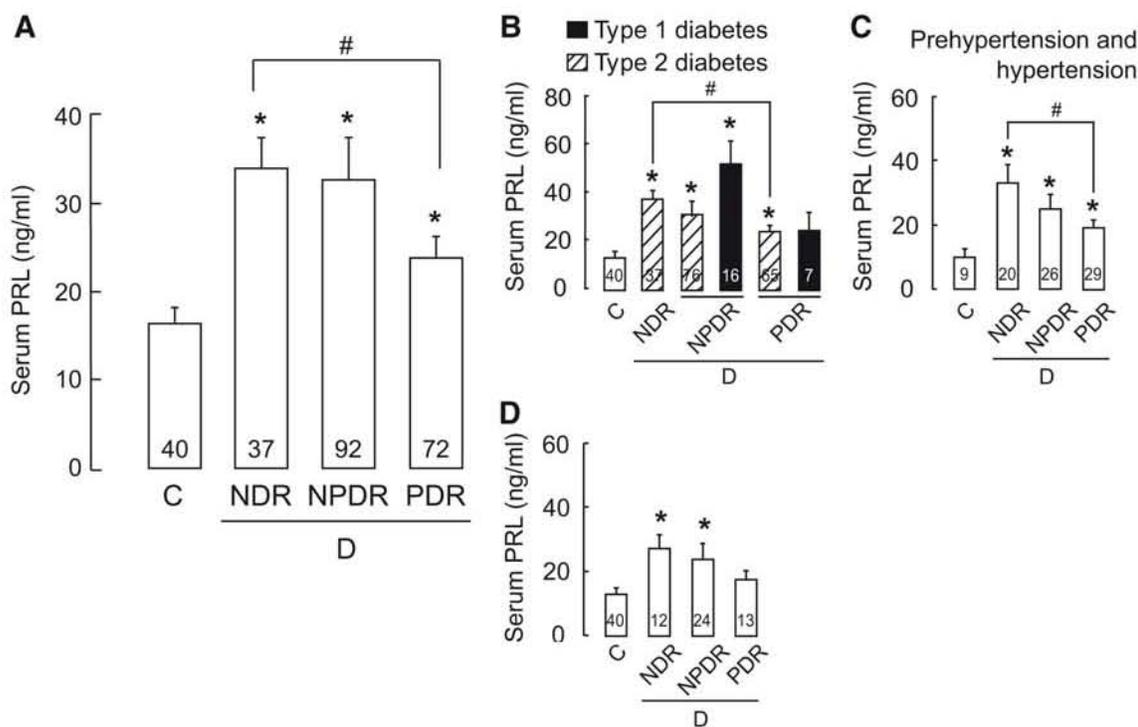
**Retinal vasopermeability.** Retinal vasopermeability was measured using a modification of the Evans blue assay as previously described (5).

**Statistical analysis.** Data are given as means ± SEM. The unpaired Student *t* test was used for all comparisons except for data with multiple groups using ANOVA.

## RESULTS

**Serum PRL levels are higher in diabetic patients with no retinopathy than in those with PDR.** All diabetic patients showed higher levels of PRL than the control subjects ( $32.8 \pm 4.9$  vs.  $16.3 \pm 1.7$  ng/ml,  $P < 0.005$ ). However, patients with PDR had a reduced concentration of PRL ( $26.7 \pm 2.7$  ng/ml,  $P < 0.05$ ) compared with diabetic patients without retinopathy ( $34.1 \pm 3.6$  ng/ml) (Fig. 1A). The pattern of circulating PRL levels (higher in diabetic patients with no retinopathy than in those with PDR) did not depend on the type of diabetes (Fig. 1B) or on other systemic complications associated with diabetes (hypertension and nephropathy). An inverse relationship between PRL levels and the progression of DR was observed when comparing only individuals having prehypertension ( $\geq 120/80$  mmHg) or hypertension ( $\geq 140/90$  mmHg) (Fig. 1C) and when a subset of all diabetic patients were matched for diabetes duration, glycemia, glycosylated hemoglobin, cholesterol, creatinine, and blood pressure (Fig. 1D).

## PROLACTIN AND DIABETIC RETINOPATHY

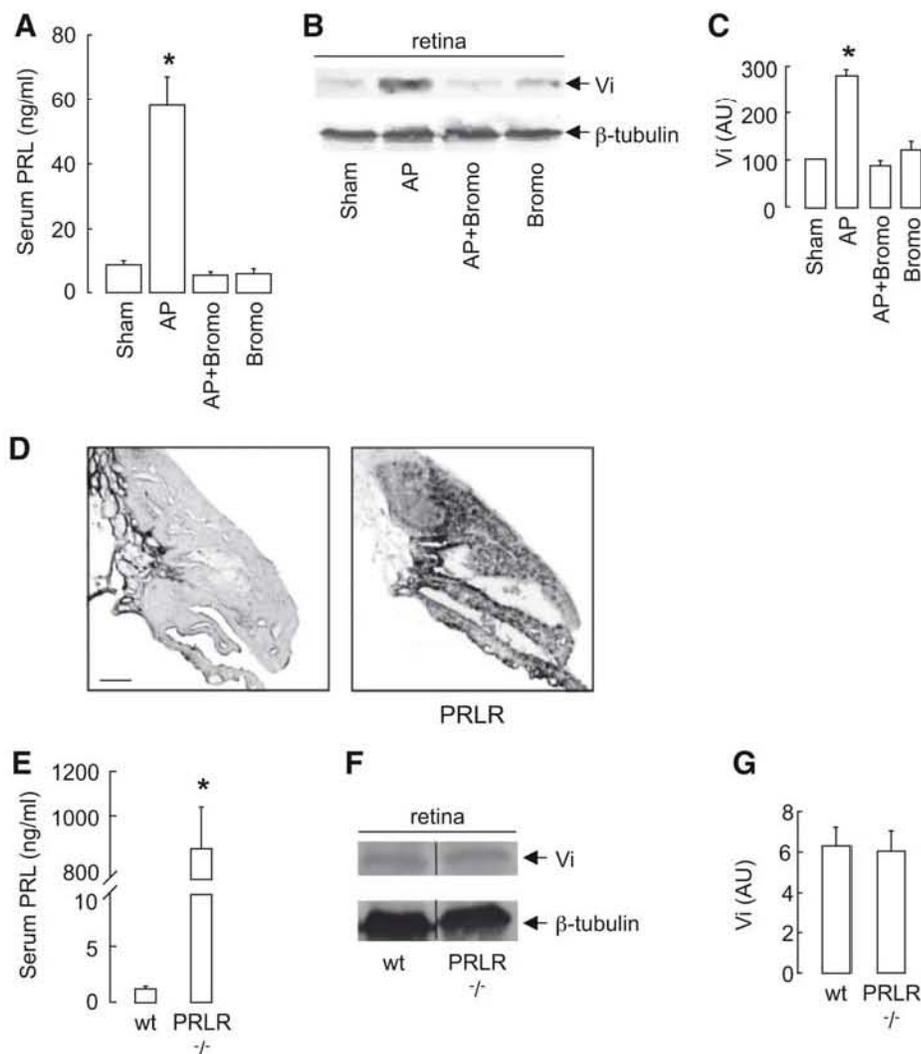


**FIG. 1.** Circulating levels of PRL are higher in diabetic patients than in nondiabetic control subjects and higher in diabetic subjects with no retinopathy than in those with PDR. *A–C:* Serum PRL levels measured by ELISA in the whole cohort of nondiabetic control subjects and diabetic patients with NDR, NPDR, or PDR (*A*); control subjects and patients having type 1 or type 2 diabetes (*B*); diabetic patients and control subjects having prehypertension ( $\geq 120/80$  mmHg) or hypertension ( $\geq 140/90$  mmHg) (*C*). *D:* Diabetic groups matched for diabetes duration (NDR,  $14.1 \pm 2.3$  years; NPDR,  $14.1 \pm 1.3$  years; and PDR,  $15 \pm 1.4$  years), glycemia (NDR,  $161.2 \pm 20.5$  mg/dl; NPDR,  $176.3 \pm 18.7$  mg/dl; and PDR,  $210.5 \pm 34.7$  mg/dl), glycosylated hemoglobin (NDR,  $8.1 \pm 0.5\%$ ; NPDR,  $9.8 \pm 0.8\%$ ; and PDR,  $10.2 \pm 1.05\%$ ), cholesterol (NDR,  $176.9 \pm 16.1$  mg/dl; NPDR,  $181.8 \pm 9.3$  mg/dl; and PDR,  $208.8 \pm 10.5$  mg/dl), creatinine (NDR,  $1 \pm 0.04$  mg/dl; NPDR,  $0.9 \pm 0.05$  mg/dl; and PDR,  $1.1 \pm 0.1$  mg/dl), and systolic blood pressure (NDR,  $128.2 \pm 4.7$  mmHg; NPDR,  $122.5 \pm 3.5$  mmHg; and PDR,  $130 \pm 4.8$  mmHg). Data are means  $\pm$  SEM. Numbers inside bars correspond to *n* values. \* $P \leq 0.001$  vs. control; # $P < 0.05$  vs. NDR. C, control subjects; D, diabetic subjects.

Serum PRL is incorporated into the eye and converted to vasoinhibins. To investigate whether serum PRL could serve as a source of retinal vasoinhibins we used a rat model of hyperprolactinemia induced by placing two AP grafts under the kidney capsule for 15 days (9). As demonstrated by the Nb2 cell bioassay and Western blot, AP-grafted rats showed a sixfold increase of serum PRL (Fig. 2A,  $n = 20$ ) and threefold higher levels of vasoinhibins in the retina (Fig. 2B and C,  $n = 3$ ) compared with the nongrafted controls. Injection of grafted rats with the dopamine D2 receptor agonist bromocriptine, an inhibitor of PRL secretion (12), reduced both PRL in the circulation and vasoinhibins in the retina to basal levels (Fig. 2A–C).

The ciliary body is responsible for the active transport of plasma proteins to intraocular fluids (13), and we detected that the PRL receptor is localized in this structure (Fig. 2D,  $n = 3$ ). To examine if the PRL receptor in the ciliary body could mediate uptake of circulating PRL and its transfer into the vitreous, we analyzed retinal vasoinhibins in PRL receptor-null mice, which are known to be hyperprolactinemic (12). The mice displayed 700-fold higher levels of circulating PRL (Fig. 2E,  $n = 8$ ), but the levels of retinal vasoinhibins were similar to those of their wild-type littermates (Fig. 2F and G,  $n = 3$ ).

**High levels of circulating prolactin mitigate increased retinal vasopermeability in diabetic rats.** We next investigated whether hyperprolactinemia, by raising intraocular vasoinhibins, could lower diabetes-induced retinal hypervasopermeability. To examine this issue, AP-grafted rats were challenged or not with intravitreally injected VEGF, which is one of the prominent vasopermeability factors in DR (1). VEGF caused multiple hemorrhage areas (Fig. 3A and B,  $n = 3$ ) and increased vasopermeability (Fig. 3C,  $n = 3$ ) in the retina. These VEGF-induced vascular alterations in the retina were greatly diminished in hyperprolactinemic animals (Fig. 3). Next, retinal vasopermeability was assessed in nongrafted and AP-grafted rats made diabetic by streptozotocin injection. Serum PRL levels were similar in diabetic rats compared with nondiabetic controls (Fig. 3D,  $n = 4$ ). Hyperprolactinemia was higher in nondiabetic than in diabetic animals (13-fold vs. 8.5-fold, respectively) and was blocked by treatment with bromocriptine (Fig. 3D). Consistent with these changes, the levels of vasoinhibins were elevated in the retina of grafted rats, and bromocriptine reduced this increase (Fig. 3E), supporting that hyperprolactinemia raises vasoinhibins in the retina. Then, we confirmed that retinal vasopermeability increases in dia-



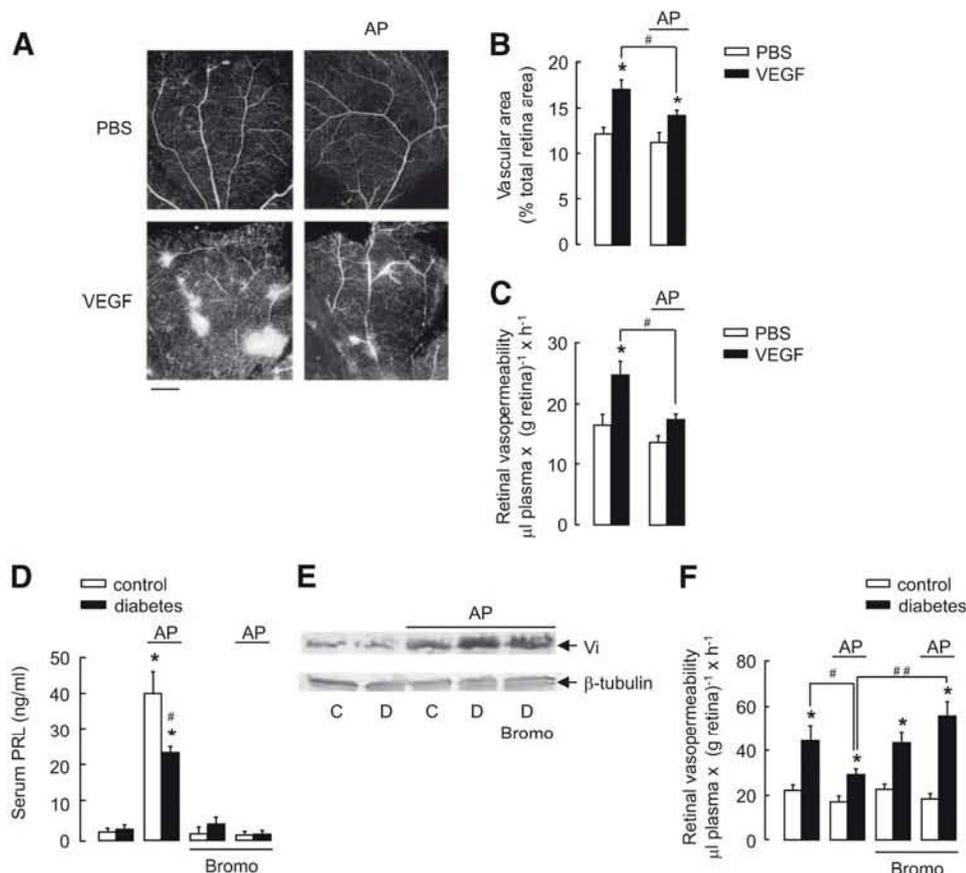
**FIG. 2.** Hyperprolactinemia results in higher levels of retinal vasoinhibins via PRL receptor-mediated PRL internalization into the eye. **A–C:** Rats implanted (AP) or not (Sham) with two APs under the renal capsule for 15 days were injected (Bromo) or not with bromocriptine. **A:** Serum PRL levels as measured by the Nb2 cell bioassay. \* $P < 0.05$  vs. Sham ( $n = 20$  rats per group). **B:** Western blot analysis of vasoinhibin levels in the retina and corresponding densitometric analysis normalized to  $\beta$ -tubulin (**C**). \* $P < 0.05$  vs. Sham ( $n = 3$ , each a pool of four retinas). **D:** Representative immunohistochemistry of rat ciliary body sections stained with monoclonal anti-PRL receptor (PRLR) antibody or without primary antibody (*left*) ( $n = 3$  independent experiments). Scale bar, 50  $\mu$ m. **E:** Serum PRL levels assessed with the Nb2 cell bioassay in wild-type (wt) and PRLR-null (PRLR<sup>-/-</sup>) mice. \* $P < 0.05$  vs. wild-type mice ( $n = 8$  mice per group). **F:** Representative Western blot analysis of retinal vasoinhibins in wild-type and PRLR<sup>-/-</sup> mice (different lanes from the same gel) (**F**) and corresponding evaluation of retinal vasoinhibins by densitometry normalized to  $\beta$ -tubulin (**G**) ( $n = 3$ , each a pool of six retinas). Data in **A**, **C**, **E**, and **G** are means  $\pm$  SEM. Vi, vasoinhibins.

betic animals ( $P \leq 0.011$ ) and found that the magnitude of this increase was significantly smaller ( $P \leq 0.05$ ) in hyperprolactinemic diabetic rats compared with the normoprolactinemic counterparts (Fig. 3F,  $n = 4$ ). Reduced retinal vasopermeability is likely due to the hyperprolactinemia-induced elevation of intraocular vasoinhibins because it was prevented by bromocriptine (Fig. 3F). In the absence of diabetes, neither hyperprolactinemia nor administration of bromocriptine affected retinal vasopermeability compared with untreated animals (Fig. 3F).

## DISCUSSION

The association between circulating PRL levels and DR has long been controversial. Studies performed over 2 decades ago reported increased (14), decreased (15), or normal (16,17) PRL levels in patients with DR. Here, we show that the circulating concentration of PRL is higher in diabetic patients without retinopathy than in those with PDR. These findings indicate an inverse relationship between systemic PRL and the severity of DR and suggest that previous contradictory findings are due to the lack of DR grading and the small number of patients reported (14–17).

## PROLACTIN AND DIABETIC RETINOPATHY



**FIG. 3.** Hyperprolactinemia mitigates excessive retinal vasopermeability in VEGF-treated or diabetic rats. *A–C:* Rats implanted (AP) or not with two APs under the kidney capsule were injected intravitreally with PBS or 9  $\mu\text{mol/l}$  VEGF and examined 24 h later. *A:* Representative images of fluorescein-labeled retinas. *B:* Quantification of vascular area from 10 flat-mounted retinas in each group. Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ . *C:* Retinal vasopermeability determined by the Evans blue assay.  $^*P < 0.05$  vs. PBS,  $\#P < 0.05$  vs. VEGF-treated nonimplanted rats ( $n = 3$  independent experiments). *D–F:* Nonimplanted and AP-implanted rats made diabetic for 75 days by streptozotocin were injected (Bromo) or not with bromocriptine and evaluated for serum PRL levels using the Nb2 cell bioassay ( $^*P < 0.05$  vs. nondiabetic control and nonimplanted control and diabetic rats;  $n = 4$  rats per group) (*D*), retinal vaso-inhibins by Western blot (pool from four retinas) (*E*), and retinal vasopermeability by the Evans blue method ( $n = 4$  rats per group) (*F*).  $^*P < 0.05$  vs. nondiabetic control,  $\#P < 0.05$  vs. diabetic nonimplanted control, and  $\#\#\#P < 0.05$  vs. AP diabetic without bromocriptine. Data in *B–D* and *F* are means  $\pm$  SEM. Vi, vaso-inhibins.

The inverse correlation between PRL and DR suggests that systemic PRL, after its conversion to vaso-inhibins, influences the progression of DR. It was reported recently that patients with DR have lower levels of circulating vaso-inhibins than nondiabetic patients (18). This result, together with our finding of higher circulating levels of PRL in diabetic patients without retinopathy, suggests that one way to upregulate intraocular vaso-inhibins would be to further increase the systemic levels of PRL, thereby favoring its ocular incorporation and cleavage. Supporting this notion, hyperprolactinemia led to the accumulation of vaso-inhibins within the retina of rodents. Notably, genetic deletion of the PRL receptor prevented this effect, indicating receptor-mediated incorporation of systemic PRL into the eye in a manner similar to that described for PRL transport across the choroid plexus to the cerebral spinal fluid (19) or across the mammary epithelium to the milk (20). These results suggest that the PRL receptor mediates the ocular incorporation of systemic PRL, which can then be cleaved to vaso-inhibins.

Furthermore, the observation that higher levels of serum PRL mitigate excessive retinal vasopermeability in diabetic and VEGF-injected rats is consistent with hyperprolactinemia producing higher levels of ocular vaso-inhibins and suggests hyperprolactinemia as a therapeutic strategy against diabetes-induced retinal hypervasopermeability. A broadly protective role of PRL in diabetes is supported by studies showing that PRL stimulates  $\beta$ -cell proliferation, insulin gene transcription, and insulin secretion in normal physiology and in pregnancy (21,22). Notably, the risk of DR development and progression increases during pregnancy, followed by a high regression rate during the postpartum period (23). The pathogenic mechanisms of DR in pregnancy are not fully understood, but PRL may play a protective role. There is evidence that PRL levels are lower in diabetic than in healthy pregnant women (24) and high, sustained PRL levels occur during lactation, when DR improves significantly (25). However, serum PRL levels showed no correlation with DR during pregnancy (24), and larger studies analyzing various stages

of retinopathy are required to evaluate this relationship conclusively.

Here, we reveal PRL to be an important systemic inhibitor of diabetes-induced retinal hypervasopermeability after its intraocular conversion to vaso-inhibins, which act directly on endothelial cells to block blood vessel growth, dilation, and permeability and to promote apoptosis-mediated vascular regression (5). Thus, we propose that PRL/vaso-inhibins are endogenous regulators of the development and progression of DR and that current medications known to induce hyperprolactinemia constitute novel therapeutic options to treat DR and other vasoproliferative retinopathies.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the National Council of Science and Technology of Mexico Grant SALUD-2008-C01-87015.

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

E.A. performed most experiments and contributed to postulating the hypothesis, designing the experiments, and writing the manuscript. J.C.R. performed measurements on human serum, participated in animal experiments, and contributed to postulating the hypothesis. S.T. analyzed patient data and contributed to designing the experiments and writing the manuscript. D.M.-P. and H.Q.-M. enrolled patients, collected human serum samples, and carried out the ophthalmologic examination. A.Q.-S. provided hyperprolactinemic rats. N.B. provided PRL receptor-null mice. G.M.E. gave scientific advice, supervised analysis, and edited the manuscript. C.C. conceived, coordinated, and supervised the study and contributed to postulating the hypothesis, designing the experiments, and writing the manuscript.

We thank C. García, F. López-Barrera, G. Nava, D. Mondragón, A. Prado, and M. García for their technical assistance, and D.D. Pless, Neurobiology Institute, UNAM, for critically editing the manuscript.

#### REFERENCES

- Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, El-Remessy AE, Al-Shabrawey M, Platt DH, Caldwell RW. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev* 2003;19:442-455
- Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA* 2007;298:902-916
- Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez De La Escalera G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 2009;89:1177-1215
- Pan H, Nguyen NQ, Yoshida H, Bentzien F, Shaw LC, Rentier-Delrue F, Martial JA, Weiner R, Struman I, Grant MB. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2413-2419
- García C, Aranda J, Arnold E, Thébault S, Macotela Y, López-Casillas F, Mendoza V, Quiroz-Mercado H, Hernández-Montiel HL, Lin SH, de la Escalera GM, Clapp C. Vaso-inhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest* 2008;118:2291-2300
- Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo-Escovar J, Nava G, López-Barrera F, Quiroz-Mercado H, Berger P, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:2947-2953
- O'Steen WK, Sundberg DK. Patterns of radioactivity in the eyes of rats after injection of iodinated prolactin. *Ophthalmic Res* 1982;14:54-62
- 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. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 2003;110:1677-1682
- Adler RA. The anterior pituitary-grafted rat: a valid model of chronic hyperprolactinemia. *Endocr Rev* 1986;7:302-313
- Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:1058-1063
- Li B, Zhang HQ, Shi Y, Min YB, Lin SF, Wu KL, Hu J, Tang SB. Overexpression of nuclear transport factor 2 may protect against diabetic retinopathy. *Mol Vis* 2009;15:861-869
- Schuff KG, Hentges ST, Kelly MA, Binart N, Kelly PA, Iuvone PM, Asa SL, Low MJ. Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest* 2002;110:973-981
- Mestriner AC, Haddad A. Horseradish peroxidase: a reliable or a misleading tool for the investigations on the origin of the proteins of the aqueous humor? *Cell Tissue Res* 1997;289:85-96
- Mooradian AD, Morley JE, Billington CJ, Slog MF, Elson MK, Shafer RB. Hyperprolactinaemia in male diabetics. *Postgrad Med J* 1985;61:11-14
- Harter M, Balarac N, Pourcher P, Koslowski JM, Krebs B, Ramaoli A. Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet* 1976;2:961-962
- Cerasola GA, Donatelli M, Sinagra D, Russo V, Amico LM, Lodato G. Study of pituitary secretion in relation to retinopathy in patients with juvenile diabetes mellitus. *Acta Diabetol Lat* 1981;18:319-328
- Froland A, Hagen C, Lauritzen E. Diabetic retinopathy and prolactin. *Lancet* 1977;1:45
- Triebel J, Huefner M, Ramadori G. Investigation of prolactin-related vaso-inhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol* 2009;161:345-353
- Mangurian LP, Walsh RJ, Posner BI. Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology* 1992;131:698-702
- Seddiki T, Delpal S, Aubourg A, Durand G, Ollivier-Bousquet M. Endocytic prolactin routes to the secretory pathway in lactating mammary epithelial cells. *Biol Cell* 2002;94:173-185
- Fleener DE, Freemark M. Prolactin induction of insulin gene transcription: roles of glucose and signal transducer and activator of transcription 5. *Endocrinology* 2001;142:2805-2810
- Huang C, Snider F, Cross JC. Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology* 2009;150:1618-1626
- Bhatnagar A, Ghauri AJ, Hope-Ross M, Lip PL. Diabetic retinopathy in pregnancy. *Curr Diabetes Rev* 2009;5:151-156
- Larinkari J, Laatikainen L, Ranta T, Mörönen P, Pesonen K, Laatikainen T. Metabolic control and serum hormone levels in relation to retinopathy in diabetic pregnancy. *Diabetologia* 1982;22:327-332
- Moloney JB, Drury MI. The effect of pregnancy on the natural course of diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1982;93:745-756