



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
CAMPUS JURIQUILLA, QRO.

**ANÁLISIS DE LA RELEVANCIA FUNCIONAL DE LA
PROLACTINA Y VASOINHIBINAS PRESENTES EN EL
EPITELIO PIGMENTARIO RETINIANO**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
I.B.Q. GERMÁN BAEZA CRUZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. STEPHANIE THEBAULT
DRA. CARMEN CLAPP

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO.

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Germán Baeza Cruz cuyo título es: “Análisis de la relevancia funcional de la prolactina y vasoinhibinas presentes en el epitelio pigmentario retiniano” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. Gerarado Rojas Piloni

Secretario (Tutor)

Dra. Stéphanie Thebault

Vocal

Dr. María de la Luz Torner Aguilar

Suplente

Dr. Wendy Portillo Martínez

Suplente

Dr. Francisco Vázquez Cuevas

Aprobado por el Comité Académico

Coordinador del Programa
Dra. Teresa Morales Guzmán

Resumen

El epitelio pigmentario de la retina (EPR), es una de las capas celulares que conforman la retina. Esta presenta una resistencia paracelular diez veces más alta que su resistencia transcelular, que lo define como parte de la barrera hematoretiniana. Diversos factores secretados por el EPR participan en la regulación de su permeabilidad y así contribuyen en prevenir su deterioro, el cual se asocia con padecimientos como el edema retiniano y la degeneración macular asociada con la edad. En particular, algunas alteraciones del EPR son ocasionadas por la exposición crónica a la luz, y el subsecuente daño oxidativo a largo plazo. La hormona prolactina (PRL), así como fragmentos peptídicos N-terminales de la PRL, las vasoinhibinas, están presentes en una línea celular derivada del EPR humano (ARPE-19) y se ha reportado que estas proteínas regulan la permeabilidad de varios epitelios como el de la glándula mamaria, el del intestino y el endotelio vascular. Por lo tanto, en este estudio nosotros postulamos que la PRL y las vasoinhibinas (Vi) podrían regular la permeabilidad de las células ARPE-19. En un modelo *in vitro* determinamos que la PRL recombinante humana aumenta la permeabilidad paracelular a dosis de 1,10 y 100 nM en cultivos de células ARPE-19 a partir de los 30 min. También observamos que el daño oxidativo con H₂O₂ aumenta la permeabilidad paracelular y que este aumento no se ve afectado por la PRL. Además, encontramos que las Vi no modifican la permeabilidad paracelular de las células ARPE-19 en condiciones normales ni en condiciones de daño oxidativo. En un modelo *in vivo*, demostramos la presencia del RNA mensajero del receptor de la PRL por hibridación *in situ*, y de la PRL y de su receptor mediante inmunohistoquímica en el EPR de rata. En conclusión, nuestros datos muestran que la PRL incrementa la permeabilidad paracelular de monocapas de EPR humano en cultivo y que esta hormona y su receptor se expresan en el EPR de la rata *in situ*, lo cual, sugiere que la PRL puede regular de manera autócrina la permeabilidad del EPR *in vivo*, y por lo tanto que esta hormona tiene implicaciones fisiológicas y patológicas potenciales en la funcionalidad del EPR.

Summary

The retinal pigment epithelium (RPE) is the most external retina layer and has a paracellular resistance ten times higher than its transcellular resistance, which defines these cells as part of the blood-retina barrier essential for vision. Several factors secreted by the RPE are involved in regulating its permeability and thus contribute to prevent its destruction, associated with disorders such as retinal edema and age-related macular degeneration. The EPR deterioration can result from chronic exposure to light that relates to long-term oxidative damage. Prolactin (PRL) and N-terminal fragments of PRL, the vaso-inhibins, are present in a cell line derived from human RPE (ARPE-19). Additionally, these proteins are known to regulate the permeability of various epithelia including that of the mammary gland, the intestine, and the vascular endothelium. In this work we postulated that PRL and vaso-inhibins regulate the permeability of ARPE-19 cells. We determined that recombinant human PRL increases paracellular permeability of ARPE-19 cultures at doses of 1, 10 and 100 nM. We also observed that oxidative damage induced by hydrogen peroxide exposure increases paracellular permeability of ARPE-10 cells but that this increase was not affected by PRL. Moreover, we found that vaso-inhibins do not alter paracellular permeability in ARPE-19 cells under normal conditions or after oxidative damage. In order to assess the physiological relevance of these findings, we analyzed rat retina sections and detected the PRL receptor mRNA by in situ hybridization, and PRL and its receptor by immunohistochemistry in the RPE layer. In conclusion, our data show that PRL increases the paracellular permeability of human RPE monolayers, which, together with the evidence that rat RPE expresses both PRL and its receptor, suggests that PRL may regulate RPE permeability in an autocrine manner. This may have physiological and pathological implications.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Endocrinología Molecular del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Stéphanie Thebault y de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez.

A Dios por darme la sabiduría y la fortaleza necesaria para que cada día pueda enfrentarme a todos los obstáculos de la vida.

A mi mamá por todo el apoyo, cariño y comprensión durante estos años, ya que sin su esfuerzo jamás habría podido conseguir esta meta. Eres mi inspiración.

A mi papa, porque a pesar de la distancia y el tiempo se que siempre he contado con su apoyo.

Un hombre vale no por los triunfos que ha acumulado sino por las veces que se ha levantado de sus fracasos.

Agradecimientos

Al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado (Maestría). A la dirección general de Estudios de Posgrado de la UNAM (Cuenta No: 510001243) así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becario No: 234107) por el apoyo económico.

A la **Dra. Carmen Clapp** por haberme brindado la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo y darme la confianza para realizar este proyecto. De la misma forma agradezco a la **Dra. Stéphanie Thebault** por el desarrollo de este proyecto, por la constante asesoría y por sus consejos.

Al comité tutorial por sus observaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo, además de que durante la maestría se preocuparon por mi formación académica y profesional aportando ideas en cada uno de mis tutorales y mis escritos: Dra. Carmen Clapp Jiménez Labora, Dra. Stephanie Thebault, Dra. Wendy Portillo Martínez y el Dr. Alfredo Varela

Igualmente a cada uno de mi jurado de examen que corrigió mi tesis mejorando la forma, estilo e ideas que contiene esta tesis: Dr. Gerardo Rojas Piloni, Dra. Stephanie Thebault, Dra. Luz Torner Aguilar, Dra. Wendy Portillo Martínez y el Dr. Francisco Vázquez Cuevas

Al **Dr. Juan Riesgo Escobar** por su apoyo técnico en la hibridaciones *in situ*, ya que su participación fue parte fundamental en el desarrollo del proyecto.

Reconozco el apoyo técnico del Nut. Fernando López Barrera, ISC. Elsa Nydia Hernandez Río (Microscopía confocal), Biol. Lorena Lopez Sanchez (Histología); de los laboratoristas Daniel Mondragón Huerta y Antonio Prado Galán que ayudaron de forma fundamental a realizar el proyecto.

También agradezco la ayuda y atención de la unidad de posgrado en especial la atención de la M.C Leonor Casanova Rico; en la biblioteca a Román Pacheco Barrita y al personal del bioterio a cargo del MVZ Martín García Servín.

A **Candy**, porque tu compañía y apoyo durante este proceso no tienen precio, gracias por escucharme, ayudarme, entenderme, consolarme, inspirarme, gracias por estar en todo momento a mi lado, eres única. Gracias totales.

A mis hermanos: *Seidy*, porque siempre serás mi inspiración a pesar de que nos separe un continente y porque siempre me has apoyado y *Mario*, quien en todo momento a estado conmigo y me ha apoyado en todas mis decisiones. Gracias por todos sus consejos.

A **Elena, Irma, Ximena, Angie, David, Hugo, Mayda, Nundi, Xaru, Norma y Lupita**; a todos y cada uno les agradezco todo su apoyo y cariño, todas las pláticas y momentos que compartimos durante el posgrado.

Índice

Resumen	iii
Summary	iv
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 El epitelio pigmentario retiniano	3
2.1.1 Generalidades sobre la retina en relación con el EPR	3
2.1.2 Características estructurales del EPR que permiten el transporte transepitelial	4
2.1.3 Regulación fisiológica del transporte transepitelial por el EPR	5
2.1.4 Implicación de la desregulación del transporte transepitelial por el EPR	6
2.2. Prolactina y vasoinhibinas	7
2.2.1 Relevancia en el ojo	7
2.2.2 Antecedentes inmediatos sobre la regulación de la permeabilidad epitelial por la PRL y las vasoinhibinas	8
3. Planteamiento del problema	10
4. Hipótesis	10
5. Objetivos	10
5.1 Objetivo general	10
5.2 Objetivos específicos	10
6. Materiales y métodos	11
6.1 Cultivos celular	11
6.2 Ensayo de permeabilidad paracelular	11
6.3 Animales	12
6.4 Hibridación <i>in situ</i>	12
6.5 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	13

6.6 Análisis estadístico	14
7. Resultados	15
7.1 Análisis del efecto de la PRL y de las vasoinhibinas sobre la vía paracelular en el EPR	15
7.1.1 La PRL aumenta el nivel basal de permeabilidad paracelular en las ARPE-19	15
7.1.2 En condiciones de daño oxidativo, la PRL no modifica la permeabilidad paracelular de las células ARPE-19.	16
7.1.3 Las vasoinhibinas no regulan la permeabilidad paracelular en las células ARPE-19	18
7.2 Detección de la PRL y su receptor en el EPR de rata	19
7.2.1 El EPR de rata expresa el ARN mensajero del receptor de prolactina	19
7.2.2 Las proteínas PRL y su receptor están presentes en el EPR de rata	20
8. Discusión	24
9. Conclusiones	28
10. Referencias	29
11. Índice de figuras	35
12. Lista de abreviaturas	36

1. INTRODUCCIÓN

El epitelio pigmentario retiniano (EPR) es una monocapa de células pigmentadas situada entre la neuroretina y la coroides. Por su lado apical, la membrana del EPR hace frente a los segmentos externos de los fotorreceptores y del lado basolateral a la membrana de Bruch's, la cual separa el EPR del endotelio fenestrado de los coriocapilares de la coroides (**Figura 1**). El EPR constituye a la barrera hemoretiniana externa. La barrera interna se compone principalmente de células endoteliales. Las uniones estrechas que se encuentran entre las células adyacentes del EPR o entre las células endoteliales adyacentes son esenciales para el control de los fluidos y solutos que atraviesan la barrera hemoretiniana, así como para prevenir la entrada de moléculas tóxicas o componentes plasmáticos hacia la retina. Por lo tanto, la capacidad de “sello” o “cierre” de la barrera hemoretiniana es crucial para la integridad de la retina (Strauss O 2005).

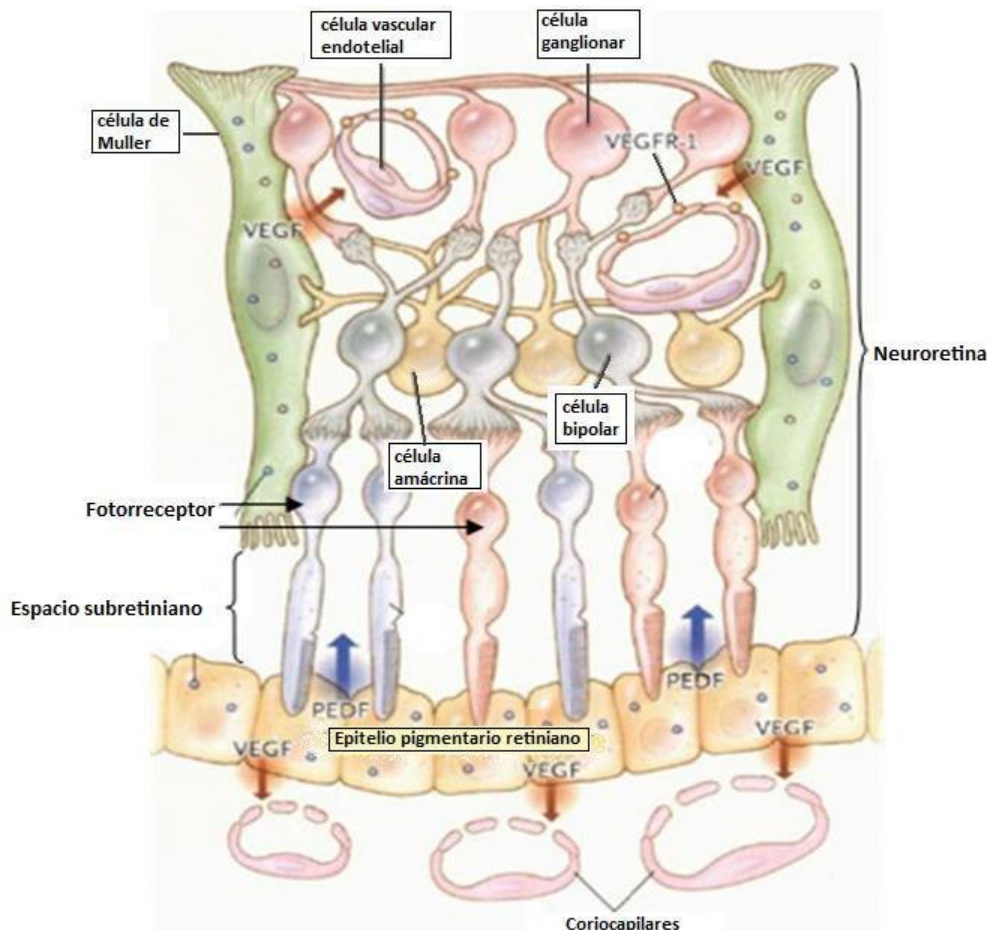


Figura 1. Representación esquemática de la retina. EPR, epitelio pigmentario retiniano; VEGF, Factor de crecimiento endotelial vascular; PEDF, factor derivado del epitelio pigmentario.

Las principales funciones que desempeña el EPR son: permitir el transporte de nutrientes, iones y agua; absorber el exceso de luz con el fin de proteger de la fotooxidación; re-isomerizar el trans-retinal en 11-cis-retinal, que es indispensable para la fototransducción; fagocitar la extremidad de los segmentos externos de los fotorreceptores; secretar múltiples factores esenciales para conservar la integridad estructural de la retina (Cao W et al. 1999) y de la coroides (Witmer AN et al. 2003); estabilizar la composición iónica en el espacio subretiniano (**Figura 1**), necesaria para mantener la foto-excitabilidad de los fotorreceptores (Steinberg RH 1985); además regula al sistema inmune del ojo a través de formar la barrera hematorretiniana y de secretar factores inmunosupresores dentro del ojo tales como el factor de crecimiento transformante (TGF-beta), la hormona estimuladora de los melanocitos alpha (alpha-MSH) o el péptido relativo al gen de la calcitonina, los cuales actúan a través de reducir la producción de óxido nítrico por los macrófagos (Taylor AW 2007).

Por lo anterior, resulta claro que el EPR es esencial para el proceso de la visión. Una falla en estas funciones puede causar degeneración retiniana, pérdida de la agudeza visual o hasta de la visión. Las retinopatías tales como la retinopatía diabética, el edema macular diabético y la degeneración macular asociada con la edad, se asocian a alteraciones de la barrera hematorretiniana. La mayoría de las investigaciones reportan disfunciones en la neuroretina y la barrera hematorretiniana interna. En contraste, pocos estudios se enfocan en las alteraciones del EPR, a pesar de un gran número de evidencias que apuntan al EPR como un epitelio secretor activo, su relevancia funcional se desconoce.

Por otra parte, estudios del laboratorio sugieren que la hormona prolactina (PRL) puede tener funciones en el ojo dado que está presente en los fluidos oculares (humor acuoso y líquido subretiniano) (Aranda J et al. 2005; Ochoa A et al. 2001) y en la retina, en donde también se detectó a su receptor (Rivera JC et al. 2008). En la retina también se encuentran las vasoinhibinas (Aranda J et al. 2005; Arnold E et al. 2010), una familia de péptidos derivados de la PRL (Clapp C et al. 2006). En este proyecto proponemos investigar si entre los efectos retinianos de la PRL y de las vasoinhibinas se encuentra la regulación de la permeabilidad del EPR.

A continuación se revisaran aspectos generales sobre la relevancia funcional del EPR dentro de la retina, y la información que nos llevó a plantear a la PRL y las vasoinhibinas como posibles reguladores de la función del EPR.

2. ANTECEDENTES

2.1 El epitelio pigmentario retiniano

2.1.1 Generalidades sobre la retina en relación con el EPR

El ojo se divide en tres capas que son: 1) la capa externa (esclera y córnea), 2) la capa intermedia que se subdivide en una parte anterior (iris y cuerpo ciliar) y una posterior (coroides); y 3) la capa interna que corresponde a la retina, la cual tiene una función sensorial. Esta última posee las neuronas sensoriales que responden a la luz y los circuitos neuronales complejos que llevan a cabo las primeras etapas de procesamiento de imágenes, para posteriormente enviar la información visual vía el nervio óptico al cerebro para su procesamiento (**Figura 2**).

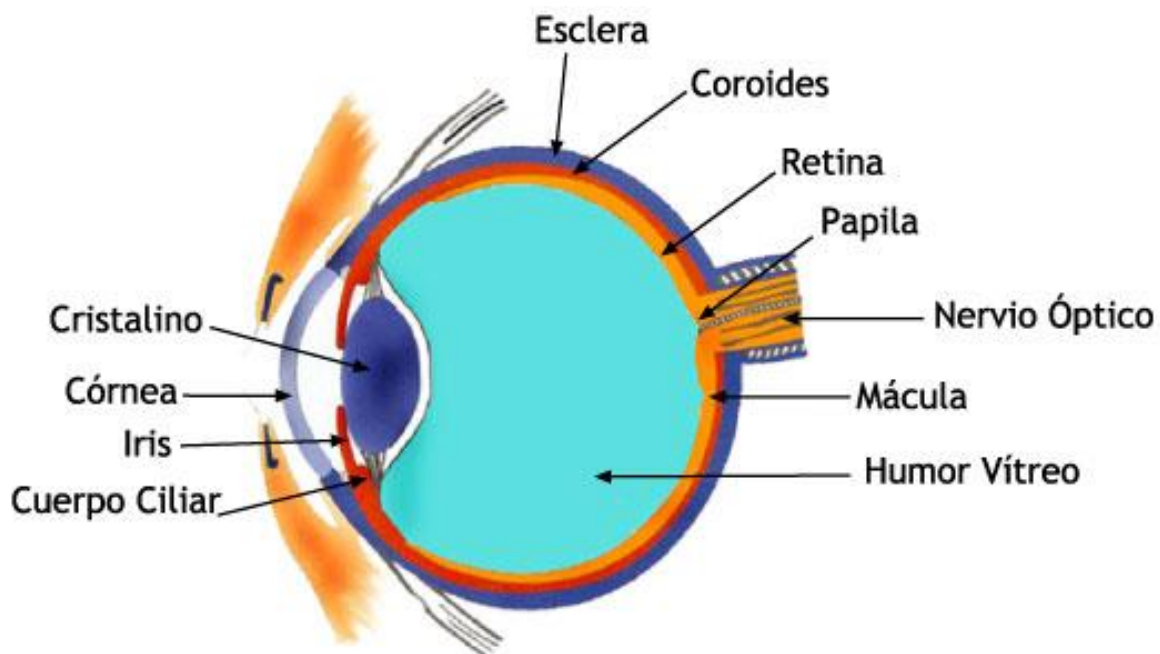


Figura 2. Representación esquemática del ojo.

La retina procede de una evaginación bilateral de la vesícula óptica primaria derivada del ectodermo; esta vesícula óptica tras una invaginación local se transforma en copa óptica. En el adulto, los derivados de la copa óptica están formados por una monocapa epitelial pigmentada externa formada por el EPR y una lámina interna; y la retina neural la cual se conforma de 9 capas: la membrana limitante interna, la capa de fibras del nervio óptico, la capa de células ganglionares, las capas plexiforme y nuclear interna, las capas plexiforme y nuclear externa, la membrana limitante externa, y la capa de los segmentos externos de los fotorreceptores. A nivel celular, la retina está compuesta por células epiteliales pigmentadas,

neuronas (de tipo ganglionar, interplexiforme, amacrina, bipolar, horizontal y fotorreceptor), células de sostén (astrocitos, microgliocitos, y células de Müller) y escasas células endoteliales.

La fototransducción procede en 4 etapas: la excitación de los fotorreceptores, la amplificación de la señal, la recuperación y la adaptación. El pigmento visual susceptible a la excitación luminosa es la rodopsina; se compone de la opsina y del 11-cis-retinal, y está acumulado en discos, los cuales forman los segmentos externos de los fotorreceptores. Con la penetración de los fotones se isomeriza el 11-cis-retinal en trans-retinal. De manera específica, el EPR está involucrado en proveer 11-cis-retinal a los fotorreceptores, y re-isomeriza el trans-retinal en 11-cis-retinal. Por otra parte, la exposición directa y frecuente de la retina a la luz favorece la fotooxidación de los lípidos membranales y proteínas, los cuales se vuelven tóxicos para las neuronas retinianas, especialmente para los propios fotorreceptores (Beatty S et al. 2000). Al respecto, el EPR fagocita la extremidad de los segmentos externos de los fotorreceptores lo cual no permite la acumulación de metabolitos tóxicos producto de la regeneración de la rodopsina (Bosch E et al. 1993).

Por otro lado, la mitad externa de la retina es avascular, razón por la cual su actividad metabólica depende de la difusión de oxígeno y metabolitos procedentes de los vasos sanguíneos de la coroides, a través del EPR. Así, resulta claro que el EPR ejerce papeles esenciales en la retina.

2.1.2 Características estructurales del EPR que permiten el transporte transepitelial

El EPR es una monocapa de células cúbicas pigmentadas, cuya cohesión se debe a la presencia de uniones estrechas (tipo “tight”) y adherentes (tipo “gap”) entre cada célula vecina (Nobeschi L et al. 2006). Las uniones estrechas se caracterizan por ser impermeables a la difusión de moléculas hidrosolubles entre las células y se constituyen por proteínas transmembranales como son la zona ocludens-1, las ocludinas y las claudinas. Éstas forman una zona ocludens y se anclan a los microfilamentos de actina, lo cual permite regular el grado de permeabilidad de las uniones estrechas de manera dinámica (Stevenson BR 1998). Las uniones adherentes se ubican por debajo de la zona ocludens y se forman por la unión de cadherinas clásicas (E, P, y N) que se asocian a los microfilamentos del citoesqueleto por cateninas. Es importante enfatizar que por unirse a los microfilamentos de actina, cuyo estado de polimerización puede variar en función de las necesidades de la célula, ambos tipos de unión permiten al EPR formar una barrera semipermeable. Sin embargo, el EPR presenta una

resistencia paracelular diez veces más alta que su resistencia transcelular (Miller SS y Steinberg RH 1977), lo cual lo clasifica como epitelio estrecho ó cerrado. Cabe señalar que existe un acoplamiento eléctrico en el EPR debido a la presencia de conexinas tipo 43 y 45 así como de uniones adherentes (Janssen-Bienhold U et al. 1998; Malfait M et al. 2001; Rogojina AT et al. 2003).

De manera notable, las uniones estrechas y adherentes delimitan dominios en la membrana plasmática, y por lo tanto, confieren polaridad celular al EPR. Así, ocasionan el paso unidireccional de las moléculas tanto por la vía paracelular como por la vía transcelular. A grandes rasgos, el EPR permite el paso de electrolitos y agua del espacio subretiniano a la coroides, además de transportar glucosa y nutrientes (retinol, ácido ascórbico y ácidos grasos) de las vasos sanguíneos de la coroides hacia los fotorreceptores. La especificidad del transporte se debe a la presencia en las invaginaciones de la membrana basolateral y las microvellosidades de la membrana apical de transportadores de agua o acuaporinas de tipo 1 y 4, transportadores de glucosa (GLUT-3) (Rizzolo LJ 2000), de ácido ascórbico (Bird AC 2003) y de ácido docosahexanoico (Bazan NG et al. 1992) entre otros. Es importante mencionar la alta producción de agua por la neuroretina, es el resultado en parte de la hiperactividad metabólica de los fotorreceptores. El agua se acumula en el espacio subretiniano (Hamann S 2002) y causa una dilución local relativa en la concentración de los componentes que necesitan ser transportados hacia la coroides, lo cual implica una demanda energética alta. La presencia específica de la bomba Na/K+ ATPasa en la membrana apical del EPR ayuda a la eliminación constante del agua acumulada por el EPR (Frambach DA et al. 1989). Asimismo existe el transporte de macromoléculas como la insulina, lípidos, factores de crecimiento y hormonas por transcitosis, es decir mediante vesículas que dependen de energía para atravesar el EPR (Komarova Y y Malik AB 2010).

Por todo lo anterior, resulta claro que si bien la vía transcelular regula la especificidad del tipo de moléculas que atraviesan el EPR, cambios en la permeabilidad paracelular pueden tener consecuencias funcionales muy importantes.

2.1.3 Regulación fisiológica del transporte transepitelial por el EPR

Se ha reportado que la permeabilidad y la selectividad del EPR se establecen de manera progresiva durante el desarrollo y son reguladas en el adulto por factores secretados tanto por el EPR como por los tejidos adyacentes en condiciones fisiológicas (Marmorstein AD 2001). Los factores producidos por el EPR incluyen al factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, lado apical), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, lado

basolateral), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-1, FGF-2 y FGF-5), factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento tipo insulina-1, factor de crecimiento neural, factor de crecimiento derivado del cerebro, neurotropina-3, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento derivado de plaquetas, interleucinas (factor de necrosis tumoral- α , IL-1, IL-6), e inhibidores tisulares de metaloproteasas de la matriz extracelular (Simo R et al. 2010). La mayoría de ellos son esenciales para mantener la integridad de la retina y de los capilares de la coroides, y pueden participar en regular la permeabilidad del EPR.

De manera clásica, se puede evaluar la permeabilidad paracelular midiendo la resistencia eléctrica transepitelial o la permeabilidad de marcadores iónicos (como el ácido *N*-acetilneuramínico) o no iónicos (como el manitol, la peroxidasa de rábano o el FITC-dextran) a través del epitelio. Las dificultades para obtener y mantener cultivos primarios de EPR diferenciados favorecieron el uso de líneas celulares de EPR, entre las cuales se destaca la línea ARPE-19 la cual es una línea de células inmortalizadas. Esta línea se obtuvo de manera espontánea a partir de un cultivo primario de un donador humano sano (Dunn K et al. 1996). De hecho, la mayor parte de la información acerca de la regulación fisiológica del transporte transepitelial en la retina proviene de investigaciones en modelos *in vitro*. Particularmente en las células ARPE-19, por ejemplo, se ha reportado que el VEGF reduce la resistencia del EPR a través de su unión a los receptores a VEGF de tipo 2 presentes del lado apical del EPR (Ablonczy Z y Crosson CE 2007). En contraste, se ha identificado al PEDF como un potente factor inhibitorio de los efectos del VEGF sobre la resistencia del EPR (Kyoko Ohno-Matsui et al. 2003).

2.1.4 Implicación de la desregulación del transporte transepitelial por el EPR

Se ha reportado que el incremento excesivo de la permeabilidad del EPR se asocia con el desarrollo del edema retiniano y la degeneración macular asociada con la edad (Marmor MF 1999). Varias evidencias relacionadas con procesos degenerativos apuntan a un exceso de VEGF del lado apical del EPR, en donde se observó una secreción atípica del VEGF del lado apical y no del basolateral, así como una reducción en el proceso de transcitosis del VEGF a través del EPR, del espacio subretiniano hacia la coroides (Hartnett ME et al. 2003). Como una consecuencia tardía, se puede liberar del EPR y causar neovascularización coroidal (Zayit-Soudry S et al. 2007). Al respecto, la delección del gen que codifica al PEDF induce ruptura del EPR y la neovascularización coroidal (Kyoko Ohno-Matsui et al. 2003). Asimismo, células ARPE-19 cultivadas en presencia de alta glucosa presentan una disminución en la producción de PEDF (Yao Y et al. 2003).

Se conoce poco de la regulación de la permeabilidad del EPR, ya que la mayoría de los estudios se enfocan en la neuroretina donde se manifiestan las lesiones relacionadas con el desarrollo del edema retiniano y la degeneración macular asociada con la edad. Sin embargo, la identificación y la caracterización funcional de los factores secretados por el EPR podrían contribuir a la prevención de su deterioro y tener implicaciones clínicas importantes. En este sentido, se revisarán a continuación los datos que apuntan a la PRL y sus derivados, las vasoinhibinas, como posibles reguladores del EPR.

2.2 Prolactina y las vasoinhibinas

2.2.1 Relevancia en el ojo

De forma general, la PRL es una proteína que opera como hormona y citocina en más de 300 funciones fisiológicas que incluyen la lactancia, la angiogénesis y la osmoregulación (Ben-Jonathan N et al. 2008). La mayor proporción de la PRL circulante proviene de la adenohipofisis. Sin embargo, se ha demostrado que la hormona también se produce en numerosos tejidos extra-pituitarios incluyendo la glándula mamaria, el endotelio vascular, y el ojo (Ben-Jonathan N et al. 2008) entre otros. La PRL está presente en fluidos oculares como el humor acuoso, el líquido subretiniano (Duenas Z et al. 2004), y en varias células retinianas incluyendo a los fotorreceptores, interneuronas, células ganglionares, células de Müller y astrocitos (Rivera JC et al. 2008). La PRL media sus acciones a través de su unión a receptores específicos que pertenecen a la familia de los receptores a citocinas clase I, los cuales existen en 4 isoformas en función de la extensión de su dominio intracitoplásmico (Pacual Mathey LI et al. 2009). Se ha detectado principalmente a la isoforma larga del receptor de PRL, la cual media la señalización intracelular de la PRL en la mayoría de las células (Schuler LA et al. 2001), en la capa nuclear externa e interna, así como en la capa de células ganglionares de la retina (Rivera JC et al. 2008).

Por otra parte, a partir de la PRL se puede obtener fragmentos N-terminales llamados vasoinhibinas (Clapp C et al. 2006). Se producen mediante su proteólisis por enzimas como la catepsina D o algunas metaloproteasas de matriz extracelular (Macotela Y et al. 2006), las cuales por tener diferentes sitios de corte generan péptidos de diferentes tamaños. Hasta la fecha se han reportado fragmentos de 14, 15, 16, 17.2 y 18 kDa (Clapp C et al. 2009). Las vasoinhibinas actúan principalmente como inhibidores de la formación de nuevos vasos sanguíneos (o angiogénesis), ya que impiden la proliferación, permeabilidad y migración endotelial, además de promover su apoptosis (Clapp C et al. 2006). Se desconoce la

naturaleza de su receptor, sin embargo se ha reportado que no se unen al receptor de la PRL (Clapp C y Weiner RI 1992).

Las vasoinhibinas han sido detectadas en la córnea y retina de ratas y humanos (Arnold E et al. 2010; Duenas Z et al. 2004; Duenas Z et al. 1999). En el ojo, se ha reportado que la PRL promueve la modificación de los pigmentos visuales en los teleósteos (Allen DM y Cristy M 1978) y anfibios (Crim JW 1975), mientras que en la rata, la PRL disminuye el nivel de apoptosis de los fotorreceptores expuestos a un daño luminoso (O'Steen WK y Kraer SL 1977). Por otra parte las vasoinhibinas regulan la angiogénesis ocular (Aranda J et al. 2005; Arnold E et al. 2010; Garcia C et al. 2008; Pan H et al. 2004), específicamente participan de manera endógena en la inhibición de la angiogénesis en la retina (Aranda J et al. 2005), bloquean la angiogénesis de la córnea inducida por el FGF (Duenas Z et al. 1999), promueven la regresión vascular en un modelo de retinopatía del prematuro (Duenas Z et al. 2004), y previenen el incremento de la vasopermeabilidad retiniana asociado con la diabetes (Garcia C et al. 2008) y en respuesta al VEGF (Garcia C et al. 2008).

Aún se desconoce la relevancia funcional de la PRL y se conoce poco acerca del papel de las vasoinhibinas en la retina. Al considerar los efectos osmoreguladores clásicos de la PRL (sobre todo en la lactancia), los efectos de las vasoinhibinas sobre la vasopermeabilidad retiniana, y la importancia del control de la permeabilidad del EPR, nos interesó dilucidar como primer paso si el EPR expresa a la PRL, su receptor, y/o a las vasoinhibinas.

2.2.2 Antecedentes inmediatos sobre la regulación de la permeabilidad epitelial por la PRL y las vasoinhibinas

Por las razones expuestas anteriormente, adquirimos en el laboratorio líneas de células de EPR de rata (RPE-J) y de humano (ARPE-19). En esta última se detectaron a la PRL y las vasoinhibinas, mediante la técnica de Western-blot y por inmunocitoquímica para localizar a la PRL directamente en las células. Es importante mencionar que en los estudios de inmunohistoquímica se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido contra PRL, el cual detecta también a las vasoinhibinas. Asimismo, se ha evaluado la presencia del receptor de la PRL (RPRL) en lisados de células ARPE-19. Se encontraron tres isoformas: la larga de 64 kDa, la intermedia de 49 kDa, y la corta de 37 kDa, con una predominancia de las bandas inmunoreactivas de peso molecular aparente de 49 y 37 kDa. Las tres isoformas comparten los dominios extracelular y transmembranal, difiriendo entre sí únicamente en la longitud de su dominio intracelular, además de que presentan diferencias en su vía de señalización (Ben-Jonathan N et al. 2008). De la misma forma se realizó una inmunocitoquímica para el RPRL

utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido en contra de dicho receptor (Okamura H et al. 1989).

Varios epitelios incluyendo el de la glándula mamaria (Nguyen DA y Neville MC 1998), la glándula lacrimal (Wood RL et al. 1999), el epitelio del intestino (Kraidith K et al. 2009), y el epitelio renal (Nishimura H 1985) producen PRL, la cual puede modular su permeabilidad. Durante la lactancia, la PRL estimula la formación y el mantenimiento de las uniones estrechas del epitelio mamario, lo cual reduce su permeabilidad paracelular (Stelwagen K et al. 1999). En consecuencia, la vía transcelular se vuelve la vía principal, y la PRL, indirectamente, conduce a modificar la permeabilidad de iones y pequeñas moléculas como la lactosa a través del epitelio mamario, lo que provoca un cambio en la composición de la fase acuosa de la leche. Por otra parte, la PRL aumenta la reabsorción de calcio en el cecum de la rata, a través de incrementar tanto la selectividad transepitelial como la permeabilidad paracelular al calcio. El aumento de la permeabilidad paracelular se lleva a cabo mediante la activación de las cinasas PI3K y ROCK (Kraidith K et al. 2009), lo cual resulta en la depolimerización de la F-actina, y por ende, en la desestabilización de las uniones estrechas (Kraidith K et al. 2009). Hallazgos semejantes se han descrito en donde la PRL actúa de manera similar en el epitelio duodenal (Walailuk Jantarajit et al. 2007).

En cuanto a las vasoinhibinas, estas previenen el incremento de la permeabilidad inducido por el VEGF en cultivos de células endoteliales y asociado a la diabetes en la retina de la rata (Garcia C et al. 2008). Estudios *in vitro* indicaron que dicho efecto se debe a la inhibición de la producción endotelial de óxido nítrico (Garcia C et al. 2008).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células de EPR humano en cultivo expresan al receptor de PRL, a la PRL y a las vasoinhibinas. Por otra parte, se sabe que la PRL y las vasoinhibinas pueden regular la permeabilidad de varios epitelios. Por lo tanto, en este trabajo evaluamos si el EPR es un tejido blanco de la PRL y las vasoinhibinas. En particular estudiamos si la PRL y las vasoinhibinas regulan la permeabilidad paracelular de células de EPR en cultivo, e investigamos si la PRL y su receptor se expresan en el EPR de la rata.

4. HIPÓTESIS

La PRL y las vasoinhibinas regulan la permeabilidad paracelular del epitelio pigmentario retiniano.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Dilucidar si la PRL y las vasoinhibinas modifican la permeabilidad paracelular de las células de EPR en cultivo y estudiar su posible relevancia *in vivo*, por medio del análisis de su expresión y de la de su receptor en el EPR de la rata.

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar si la PRL y las vasoinhibinas regulan la permeabilidad paracelular del EPR humano (ARPE-19) a través del ensayo de permeabilidad paracelular monitoreando la movilidad del trazador FITC-dextrán de 40 kDa. Examinar dicho proceso tanto en condiciones basales como en una condición de daño oxidativo.
2. Detectar a la PRL y a su receptor en el EPR, mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica en cortes de ojo completo de rata.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 *Cultivo celular* - Se utilizó una línea de células epiteliales pigmentadas de retina (EPR) humana normal (ARPE-19, ATCC: CRL-2302), la cual se obtuvo a partir de un cultivo primario de EPR aislado de ojos extraídos de un donador humano (sexo masculino, 19 años de edad, sano (Calcagno AM et al. 2005). Brevemente, dicho cultivo se distinguió por tener una alta tasa de proliferación espontánea, un cariotipo normal y zonas de células pigmentadas poligonales (Dunn K et al. 1996), las cuales fueron seleccionadas mediante la eliminación de los fibroblastos y de las células poco adherentes por tripsinización, hasta obtener una monocapa de células pigmentadas poligonales denominadas ARPE-19. Las células ARPE-19 se sembraron a una densidad inicial de 1.6×10^5 células por cm^2 , y se cultivaron en medio DMEM-F12 con 4% de suero fetal bovino, 1% de penicilina (10,000 unidades/mL) y estreptomicina (10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y los suplementos de cultivo N2 y B27 (1X). Se mantuvieron a una temperatura de 37°C con una atmósfera de CO_2 al 5%, y se les cambió el medio cada 2 días. Después de 4 semanas de cultivo en soportes semipermeables (poros de $4.0 \mu\text{m}$ con colágeno, “Transwell culture plates”, 12 pozos, Corning Life Sciences) tratados con laminina (incubación de 1-3 hrs a 37°C a $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, diluido en PBS), las células ARPE-19 forman una monocapa polarizada, la cual se caracteriza por una alta resistencia transepitelial ($100 \Omega \cdot \text{cm}^2$), una permeabilidad baja, y un fenotipo epitelial y no mesenquimal (Dunn K et al. 1996). La monocapa de células ARPE-19 se puede mantener en cultivo hasta 30 pasajes pero su resistencia va disminuyendo a partir de los pasajes 15-17 (Geisen P et al. 2006), es por eso que las células se utilizaron a en pasajes no mayores al 15.

6.2 *Ensayo de permeabilidad paracelular*- Se usó el trazador no iónico FITC-dextran de 40 kDa, para medir *in vitro* la permeabilidad por la vía paracelular (Huang AJ et al. 1989). Como se ha mencionado previamente, las células ARPE-19 se cultivaron hasta formar una monocapa diferenciada durante 4 semanas (Dunn K et al. 1996) y se sincronizan en medio de cultivo DMEM-F-12 con 0.5% de suero fetal bovino (suplementado con 1/100 penicilina/estreptomicina) durante 12 hrs (Dunn K et al. 1996). El día de la medición de la permeabilidad, se añadieron 1.5 ml de medio de cultivo fresco en una nueva placa de 12 pozos (lado basolateral) y se transfirieron los insertos de los filtros con los diferentes tratamientos recién preparados (lado apical) en presencia del FITC-dextrán ($25 \mu\text{g}/\text{ml}$). Los tratamientos consistieron en: medio de cultivo (control), PRL recombinante humana (1, 10 y 100 nM), vasoinhibinas recombinantes (Galfione M et al. 2003); 10 y 20 nM en presencia o

ausencia de H₂O₂ (10 µM) por 15 minutos. El uso del H₂O₂ a esta dosis y por este tiempo se justifica por estudios previos que reportan que reduce la resistencia transepitelial de las células ARPE-19 (Li GY et al. 2010) sin afectar su viabilidad (Alizadeh M et al. 2001). Se colectaron muestras del medio condicionado (50 µl) del compartimiento inferior por duplicado a 3, 30, 45, 60, y 90 minutos tras la adición del FITC-dextrán en una placa de 96 pozos. La fluorescencia presente en el medio colectado se midió a 512 nm tras una excitación a 488 nm con el BioTek plate reader (BioTek Instruments, Inc.). Dicha medición reflejó la cantidad de fluorescencia emitida. Por cada condición experimental dicha fluorescencia emitida (F) se expresó en función de la fluorescencia máxima (F_{max}), la cual se obtuvo mediante la incubación de FITC-dextrán (25 µg/ml) en filtros sin células a los diferentes tiempos. Dado que el FITC-dextrán a 25 µg/ml se administra en exceso, la proporción F/F_{max} se interpreta de la manera siguiente: valores cerca de 0 reflejan una permeabilidad baja, y valores cerca de 1 reflejan una permeabilidad máxima.

6.3 *Animales* - El cuidado y tratamiento de los animales se sujetó a los criterios de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” publicada por el Instituto de Recursos Animales de Laboratorio, Comisión de Ciencias de la Vida, Consejo Nacional de Investigación, EUA (National Academy Press, Washington, D.C. 1996). Los estudios cumplen con las normas establecidas por la Norma Oficial Mexicana de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) clave NOM-062-ZOO-1999.

6.4 *Hibridación in situ (HIS)*- Las sondas sentido y anti-sentido de ARN para el receptor de la PRL marcadas con digoxigenina se sintetizaron, a partir de un plásmido conteniendo la región codificante del cDNA del receptor de la PRL. La HIS consistió en preparar el tejido, hibridar la sonda, lavar tras la hibridación, e inmunolocalizar la sonda. *Preparación de los tejidos*: Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación y se extrajeron los ojos. Los ojos se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS, pH 7.4 por 3 horas. Subsecuentemente, los ojos fueron crioprotectados en una solución de sacarosa al 15% en PBS libre de RNAsa durante 24 hrs a temperatura ambiente (TA). Posteriormente los tejidos fueron embebidos en Tissue-Tek (Tissue-Freezing Medium, Leica Instruments, Neussloch, Germany), congelados en nitrógeno líquido, seccionados en un criostato (14 µm) y montados en portaobjetos cargados eléctricamente (Superfrost plus slides). Las secciones fueron secadas por 15 min a 60°C y fijadas en paraformaldehído al 4%

durante 15 minutos en PBS. *Hibridación:* Las secciones se lavaron 2 veces con PBT (PBS + 0.1% Tween 20) por 10 min. Después, las secciones fueron incubadas con una solución 1:1 de PBT/mezcla de hibridación (5x SSC, 0.1% Tween 20, 50% de formamida desionizada, 100µg/ml de ADN de esperma de salmón sonicado) por 10 min, y prehibridizadas durante 1 hora a 55°C en una solución PBT/mezcla de hibridación. Las sondas fueron desnaturalizadas en solución de hibridación y la mezcla de hibridación con la sonda pre-absorbida se aplicó sobre las secciones a 55°C durante toda la noche. *Lavados post-hibridación:* Se realizaron 2 lavados de 10 min con la mezcla de hibridación sin sonda a 60°C, y posteriormente se lavaron en 2 ocasiones por 10 min con una solución de PBT. *Inmunolocalización de la sonda:* Posteriormente, las secciones se incubaron por 1 hora con la solución de bloqueo (Tris-NaCl-tween y 5% de suero de cabra) a temperatura ambiente. Subsecuentemente, se incubaron con el anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a la fosfatasa alcalina (Roche, Basel, Switzerland) a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBT. La señal fue detectada usando azul de tetrazolio y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil como sustrato en solución alcalina (Roche), hasta que se obtuvo la coloración deseada, a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 3 lavados de 5 minutos con PBT a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó el cubreobjetos y se selló para su posterior observación utilizando el ScanScope (SCAN–High-Quality, Ultra-Resolution Digital Scanning).

6.5 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia- Se utilizaron ratas Wistar macho (250-300 g de peso corporal) alimentadas *ad libitum* y mantenidas bajo un ciclo de 12/12 hrs de luz/oscuridad. El uso de ratas macho se debió a que en estos animales los niveles circulantes de PRL son bajos y constantes en comparación con los de las ratas hembra. Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación y los ojos se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS, pH 7.4 por 3 horas. Subsecuentemente, los ojos fueron crioprotectados en una solución de sacarosa al 15% en PBS durante 24 hrs a temperatura ambiente (TA). Posteriormente los tejidos fueron embebidos en Tissue-Tek, congelados con nitrógeno líquido, seccionados en un criostato (14 µm), montados en portaobjetos gelatinizados y almacenados a -70°C. El día de la inmunotinción, los cortes se lavaron 3 veces con PBS 0.1 M durante 5 minutos, seguido de un lavado con SDS al 1% en PBS durante 5 minutos y de nuevo 3 veces con PBS 0.1 M durante 5 minutos. Posteriormente las secciones se bloquearon con una solución de PBS-Tritón X-100 (0.1%)- suero de cabra (NGS-10%) durante 1 hora a TA. Los cortes se lavaron 3 veces con PBS 0.1 M durante 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo policlonal anti-PRL IC5 (1:500), con el anticuerpo monoclonal

anti-receptor de PRL T6 (1:500) o con el anticuerpo monoclonal anti-RPE65 (1:250) en PBS-Triton X-100 (0.1%)-NGS 3% durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día se realizaron 3 lavados con PBS 0.1 M y se incubaron 2 horas a TA con IgG anti-ratón acoplado a Alexa-594 (1:1000; Molecular Probes-Eugene, OR) para revelar los anticuerpos monoclonales o con IgG anti-conejo acoplado a Alexa-488 (1:1000) para revelar el anticuerpo policlonal. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS, seguido de un lavado con solución de negro de Sudan (0.05%) durante 5 minutos para evitar detectar la autofluorescencia de los segmentos externos de los fotorreceptores (Spaide R 2008) y finalmente se lavaron con etanol al 70% durante 1 minuto. Los cortes fueron cubiertos con PBS/glicerol (1:1), se les colocó un cubreobjetos y se sellaron con esmalte. Se dejaron secando en condiciones de oscuridad. Como control negativo, se omitió el anticuerpo primario. Cada sección fue barrida ópticamente con un objetivo EC Plan Neo-fluar 40X/1.30 Oil DIC M27.

Para llevar a cabo la doble inmunolocalización se realizaron los mismos pasos que la inmunohistoquímica simple, excepto que al momento de la incubación con los anticuerpos primarios, las secciones se incubaron simultáneamente con el anticuerpo policlonal anti-PRL IC5 (1:500) y el anticuerpo monoclonal anti-RPE65 (1:250), toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios respectivos fueron incubados 2 hrs a TA y luego que se lavaron, montaron etc.

6.6 Análisis estadístico- Los datos se presentan como promedios \pm error estándar de la media. La significancia estadística entre grupos para un mismo intervalo de tiempo fue determinada por el análisis de varianza (ANOVA) seguida de un test de Student pareado. Además, se realizó un análisis de ANOVA de medidas repetidas para determinar diferencias significativas entre un mismo grupo a lo largo del tiempo. El análisis estadístico se lleva a cabo usando el programa Sigma Stat 7.0 (Sigma Stat 7.0, Systat Software Inc., San José, CA). Las diferencias en el promedio se consideraron estadísticamente significativas bajo una $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis del efecto de la PRL y las vasoinhibinas sobre la vía paracelular en el EPR.

7.1.1 La PRL aumenta los niveles basales de permeabilidad paracelular en las células ARPE-19.

Inicialmente se corroboró la formación de una monocapa de células ARPE-19 después de 4 semanas de cultivo en filtros semipermeables. Para determinar el efecto de la PRL sobre estas células implementamos el ensayo de permeabilidad paracelular en condiciones basales, es decir sobre las células cultivadas sin tratamientos previos. Determinamos que 3 minutos después de la adición del trazador, la proporción F/F_{max} fue cercana a cero. A los 30 minutos este valor subió hasta 0.25 ± 0.06 y se mantuvo constante de los 30 a los 60 minutos. A los 90 minutos, aumentó hasta 0.60 ± 0.10 (**Figura 3**). Estas mediciones indican que de 3 a 60 minutos, la monocapa es estable y poco permeable al trazador. Sin embargo, de los 60 a los 90 minutos, la monocapa pierde su estabilidad.

Bajo dosis crecientes (1, 10, y 100 nM) de la PRL humana recombinante se observó un aumento de la permeabilidad en comparación con las células sin tratamiento (**Figura 3**). En detalle, la dosis de 1 nM aumenta significativamente la permeabilidad a partir de los 60 minutos. Las dosis de 10 y 100 nM indujeron un incremento significativo en la permeabilidad, en factores de 2.6 ± 0.24 y 3.6 ± 0.05 , respectivamente, a partir de los 30 minutos. No hubo diferencias significativas por una misma dosis a los distintos tiempos excepto por la dosis de 100 nM, la cual ejerció un efecto mayor a los 60 minutos que a los 30 minutos. No hubo diferencias significativas entre las distintas dosis de PRL para un mismo tiempo.

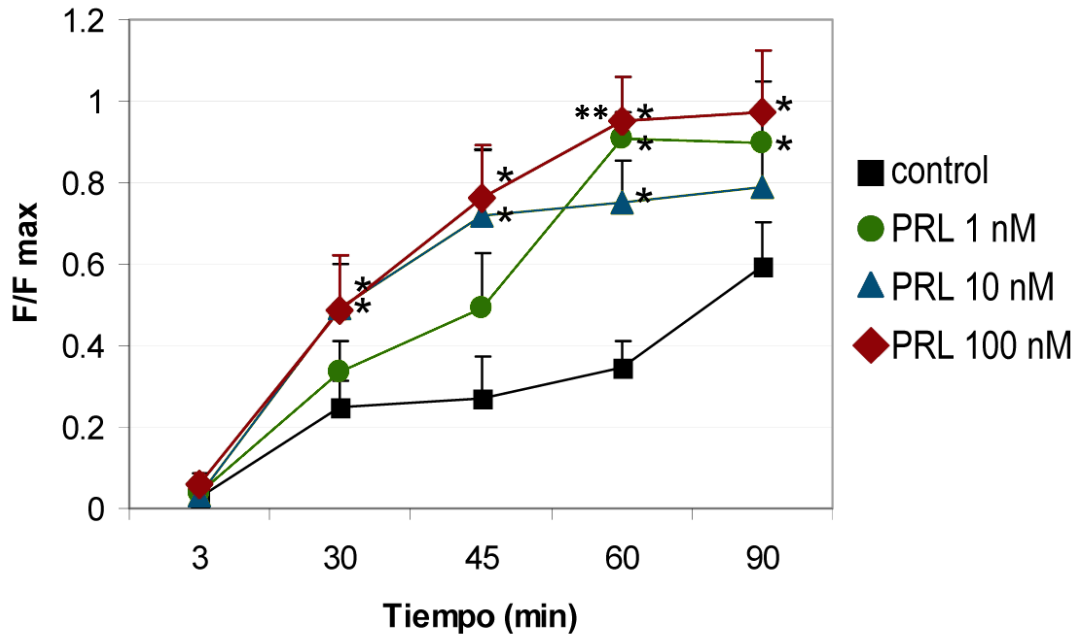


Figura 3. Curso temporal de los niveles de permeabilidad paracelular al FITC-dextran en cultivos polarizados de células ARPE-19 tratadas o no (control) con 1, 10, y 100 nM de PRL recombinante humana en condiciones basales. n=3 para triplicados en 3 experimentos independientes. *P< 0.05 comparado con el control (ANOVA). **P< 0.05 comparado con la medida a los 30 min (ANOVA de medidas repetidas).

Notablemente, a los 60 minutos la PRL a la dosis de 10 y 100 nM estimuló a niveles máximos la permeabilidad paracelular. En relación con nuestra interpretación previa, 90 minutos después de la adición del trazador, la proporción F/Fmax promedio fue casi igual a 1, e idéntica entre las condiciones sin o con PRL, lo cual muestra que a dicho tiempo, la integridad de la monocapa está muy alterada y en consecuencia nuestras mediciones son poco confiables. Por lo tanto, hemos decidido estudiar principalmente el periodo de 3 a 60 minutos en el análisis e interpretación de nuestras mediciones.

7.1.2 En condiciones de daño oxidativo, la PRL no modifica la permeabilidad paracelular de las células ARPE-19.

Estudiamos si la PRL puede modificar la permeabilidad paracelular en condiciones de daño oxidativo a través de tratar los cultivos con H₂O₂ a la dosis de 10 μM (**Figura 4**). De esta forma, observamos un incremento significativo de la proporción F/Fmax a los 30 y 45

minutos de haber aplicado el trazador, en comparación con la condición sin H₂O₂. A los 60 minutos de incubación con H₂O₂, la proporción F/F_{max} superó el valor 1. Aunque, dicha proporción tiende a aumentar en condiciones control de los 45 a los 60 minutos (0.34±0.08 a 0.55±0.10: factor 1.6), esta diferencia no fue significativa. En su conjunto, estos datos muestran que el daño oxidativo provoca la disrupción de la monocapa del EPR a los 60 minutos. Por otra parte, en presencia de PRL a las dosis de 10 o 100 nM, el efecto del H₂O₂ sobre la permeabilidad paracelular a los 30 y 45 minutos no se modificó (**Figura 4**). No hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos para un mismo tiempo.

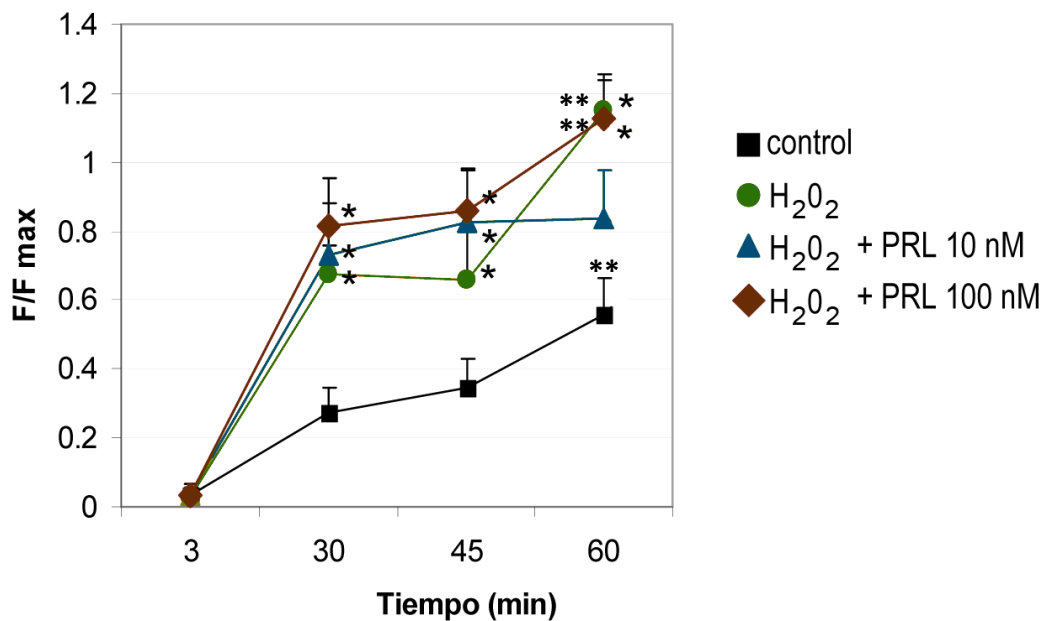


Figura 4. Curso temporal de los niveles de permeabilidad paracelular al FITC-dextran en cultivos polarizados de células ARPE-19 tratadas o no (control) con 10 y 100 nM de PRL recombinante humana en condiciones de daño oxidativo, H₂O₂ a 10 μM. n=3 para triplicados en 3 experimentos independientes. *P< 0.05 en comparación con el control. **P< 0.05 comparado con la medida a los 30 y 45 min (ANOVA de medidas repetidas).

Dado que la PRL es capaz de regular la permeabilidad paracelular de las células ARPE-19 y que resultados preliminares del laboratorio mostraron la presencia de las vasoinhibinas en estas células, nos interesó examinar si las mismas pueden regular dicho proceso.

7.1.3 Las vasoinhibinas no regulan la permeabilidad paracelular en las células ARPE-19.

El tratamiento con vasoinhibinas de 16 kDa a las dosis de 10 o 20 nM (dosis usada en estudios previos en el laboratorio, (Garcia C et al. 2008; Gonzalez C et al. 2004) no cambió la permeabilidad paracelular de las células ARPE-19 en comparación con la condición control (Figura 5).

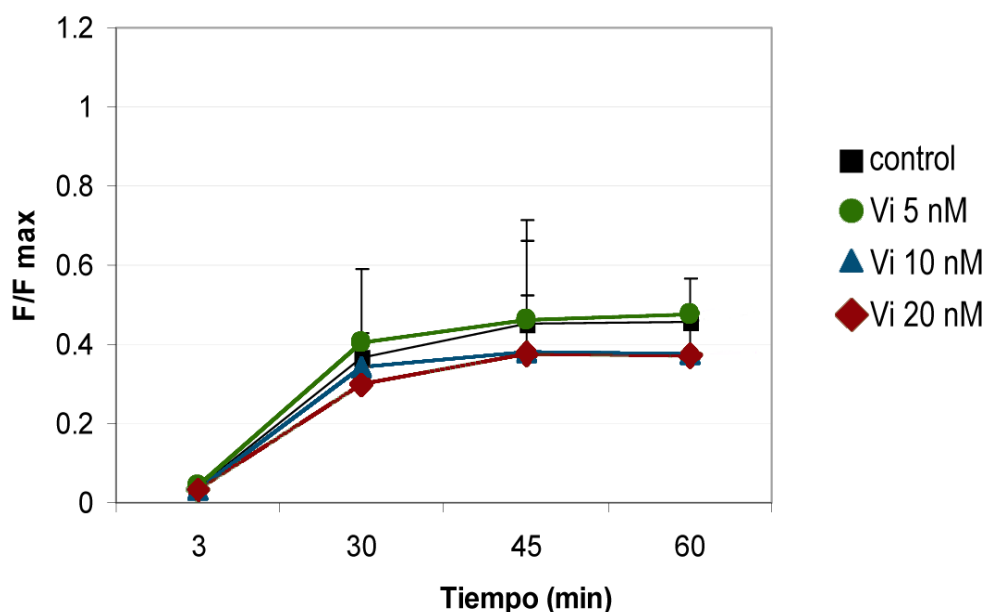


Figura 5. Curso temporal de los niveles de permeabilidad paracelular al FITC-dextran en cultivos polarizados de células ARPE-19 tratadas o no (control) con 5, 10, y 20 nM de vasoinhibinas en condiciones basales. n=3 para triplicados en 3 experimentos independientes.

De manera similar a lo que hemos reportado en la sección anterior, el peróxido de hidrógeno a la dosis de 10 μ M aumentó la permeabilidad paracelular, pero las vasoinhibinas no modificaron dicho efecto (Figura 6).

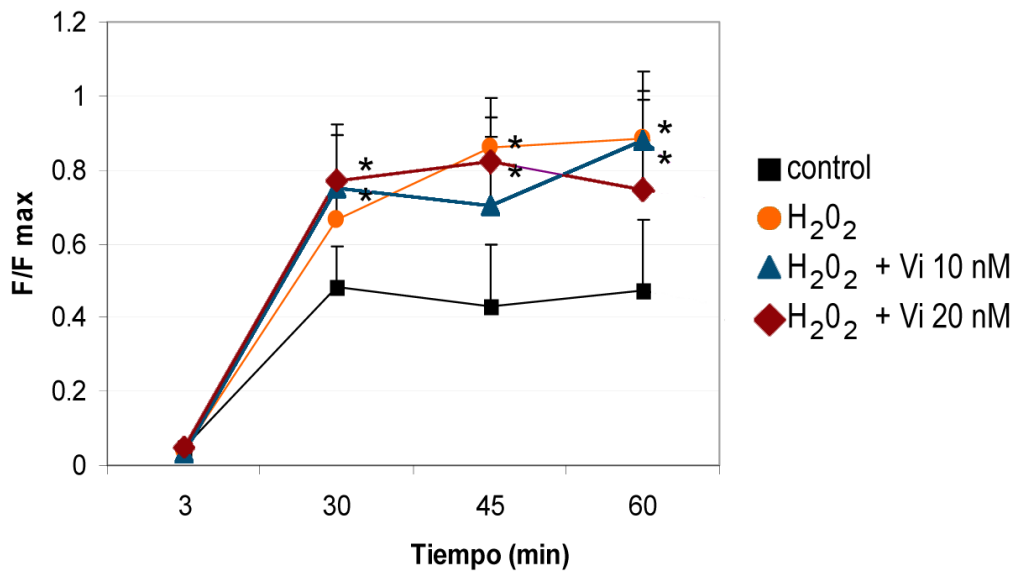


Figura 6. Curso temporal de los niveles de permeabilidad paracelular al FITC-dextran en cultivos polarizados de células ARPE-19 tratadas o no (control) con 10 y 20 nM de vasoinhabinas en condiciones de daño oxidativo, H₂O₂ a 10 μM. n=3 para triplicados en 3 experimentos independientes. *P< 0.05 versus control.

Al haber encontrado un aumento de la permeabilidad paracelular del EPR inducido por la PRL mediante ensayos *in vitro*, nos interesó examinar si este resultado pudiera reflejar una posible acción *in vivo* de la PRL. Para esto evaluamos si la PRL y su receptor están presentes en el EPR de la rata.

7.2 Detección de la PRL y su receptor en el EPR de rata

7.2.1 El EPR de rata expresa el ARN mensajero del receptor de prolactina

Con el fin de corroborar la presencia del receptor de PRL en el EPR de rata, secciones de retina, fueron evaluadas para detectar la expresión del ARNm del receptor de PRL por hibridación *in situ*. Las secciones fueron incubadas con la sonda anti-sentido y presentaron tinción a nivel del EPR así como de otras capas de la retina como la capa nuclear interna y la capa de células ganglionares (**Figura 7A**). Como control negativo las secciones fueron incubadas con la sonda sentido. En esta condición no se presentó tinción en ninguna capa de la retina (**Figura 7B**).

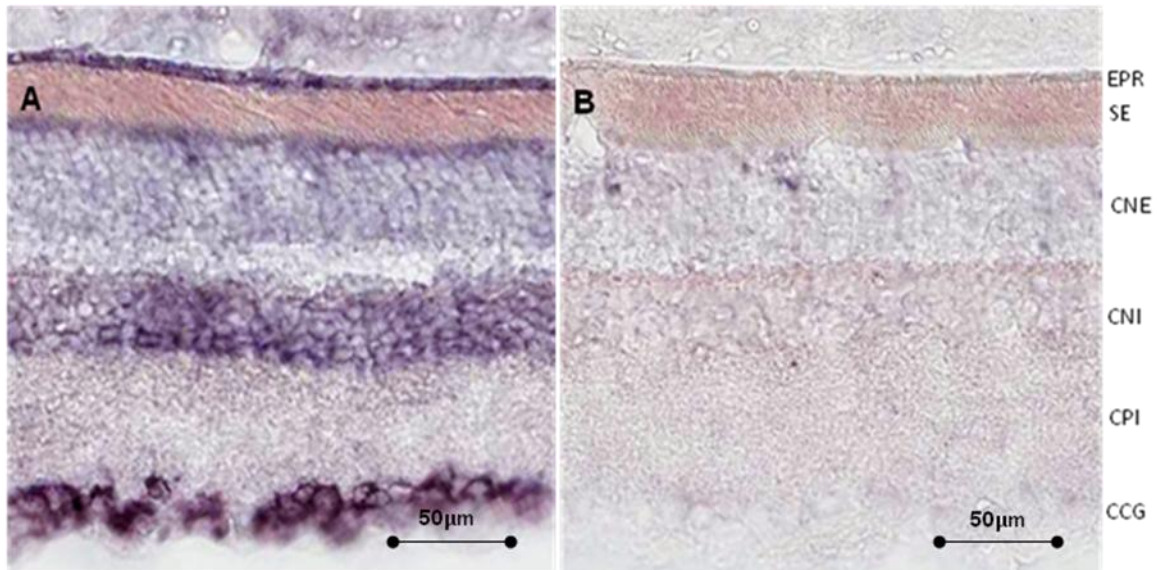


Figura 7. Detección de la presencia del receptor de PRL mediante HIS en retina de ratas Wistar con la sonda anti-sentido (A) y con la sonda sentido (B). Scan-Scope (SCAN–High-Quality, Ultra-Resolution Digital Scanning), Objetivo 20x/0.75 Plan Apo. CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CNE, capa nuclear externa; SE, segmentos externos; EPR, epitelio pigmentario retiniano.

Una vez identificado el ARNm del receptor de PRL en el EPR de la rata, procedimos a la detección del mismo y de su ligando mediante inmunohistoquímica.

7.2.2 Las proteínas PRL y su receptor están presentes en el EPR de rata

Para corroborar la presencia de la PRL en EPR, primero ubicamos anatómicamente dicho epitelio utilizando el anticuerpo monoclonal contra una proteína específica del EPR, la RPE-65 (retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa) (Pang JJ et al. 2006) (**Figura 8A**). En las secciones retinianas que no fueron incubadas con el anticuerpo primario (control negativo) no se observó tinción en el EPR, ni en ninguna de las demás capas retinianas (**Figura 8B**).

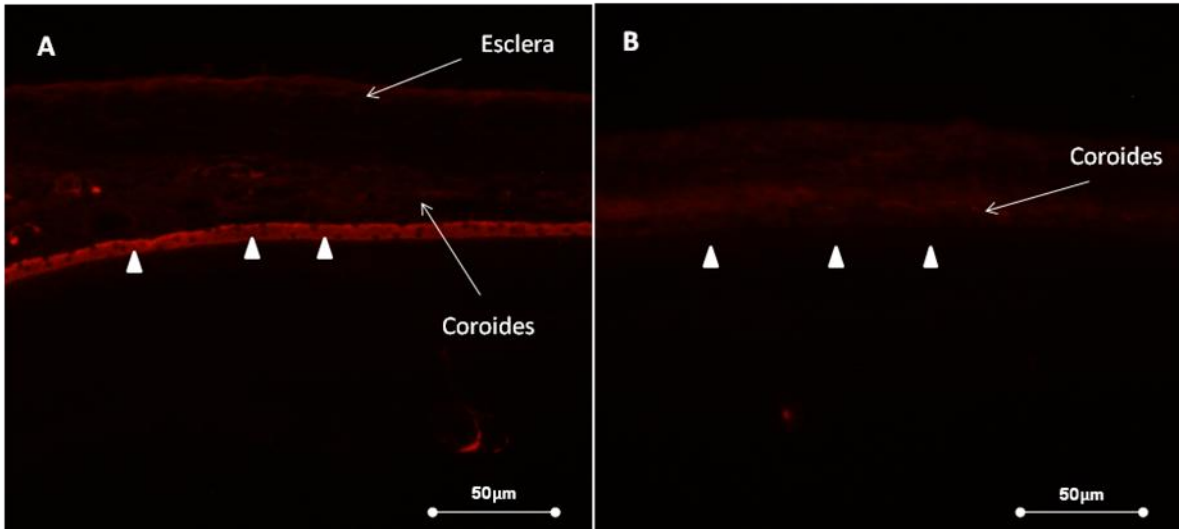


Figura 8. Detección de la presencia de RPE-65 en retina de ratas Wistar con (A) y sin (B) anticuerpo policlonal anti-RPE-65 (IC5 1:250). Objetivo (20X). EPR, epitelio pigmentario retiniano. Los símbolos \triangle indican el EPR.

Posteriormente las secciones retinianas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-PRL y mostraron una tinción positiva en la capa del EPR, la capa nuclear externa, las capas plexiforme externa e interna y la capa de las células ganglionares además de la coroides (**Figura 9A**). En ausencia del anticuerpo primario (control negativo), no se observó tinción en ninguna de las capas de la retina y tampoco en la coroides (**Figura 9B**).

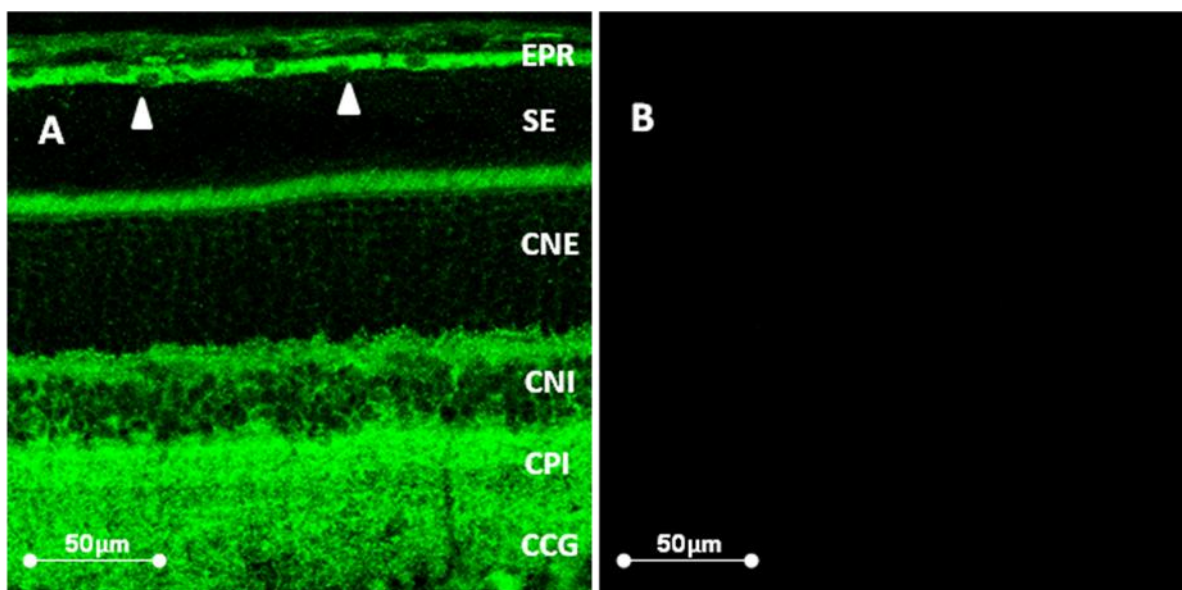


Figura 9. Detección de la presencia de PRL en retina de ratas Wistar con (A) y sin (B) anticuerpo policlonal anti-PRL (IC5 1:500). Objetivo EC Plan Neo-fluar 40X/1.30 Oil DIC M27. CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CNE, capa nuclear externa; SE, segmentos externos; EPR, epitelio pigmentario retiniano. Δ : EPR

Al incubar las secciones con ambos anticuerpos (anti-PRL y anti-RPE 65) (**Figura 10A y B**) y empalmar las fotografías de cada tinción, se observó la colocalización de las proteínas en el EPR (**Figura 10C**). Además, en ausencia de los dos anticuerpos primarios (control negativo), no se detectó tinción (**Figura 10D**).

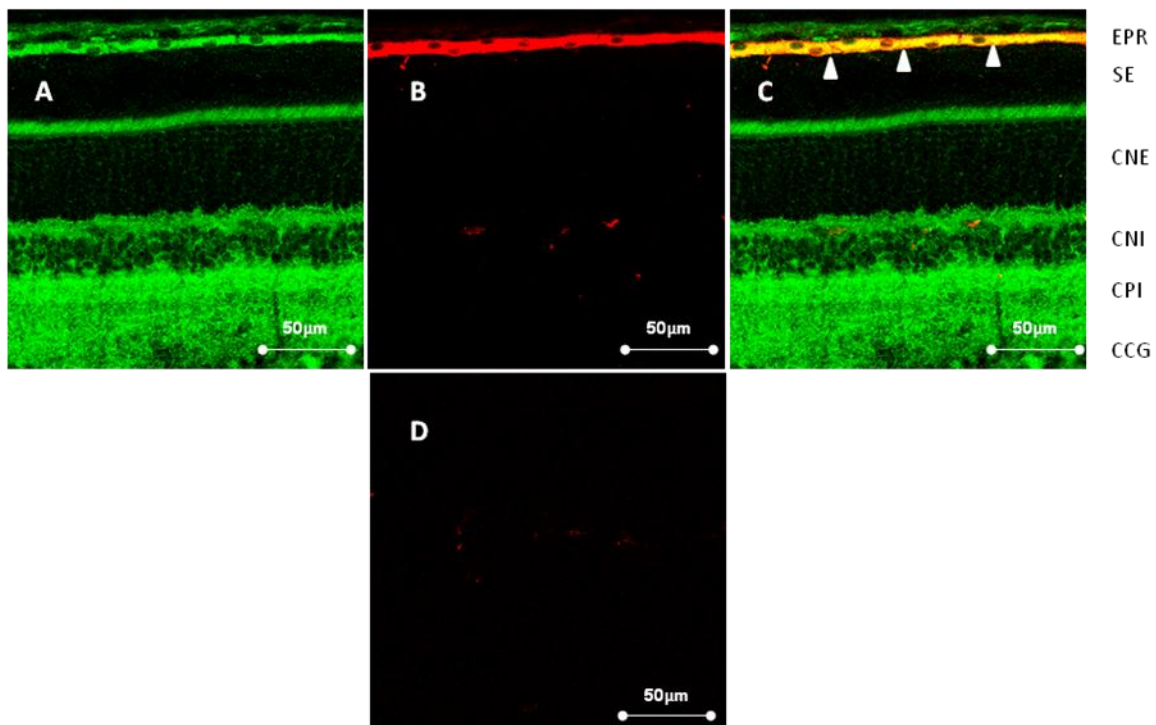


Figura 10. Detección de la presencia de PRL en el EPR por doble inmunohistoquímica en la retina de ratas Wistar con (A, C) o sin (D) anticuerpo policlonal anti-PRL (IC5 1:500) y con (B, C) o sin (D) anticuerpo monoclonal anti-RPE-65 (1:250). Objetivo EC Plan Neo-fluar 40X/1.30 Oil DIC M27. CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CNE, capa nuclear externa; SE, segmentos externos; EPR, epitelio pigmentario retiniano. Los símbolos Δ muestran el EPR.

Por último examinamos la presencia del receptor de la prolactina en el EPR de rata. Secciones retinianas fueron incubadas con el anticuerpo monoclonal primario anti-PRLR, en donde se observó una tinción a nivel del EPR y de la capa de células ganglionares (**Figura 11A**). En el control negativo no se observó tinción en ninguna de las capas de la retina (**Figura 11B**) ya que las secciones fueron incubadas sin el anticuerpo primario.

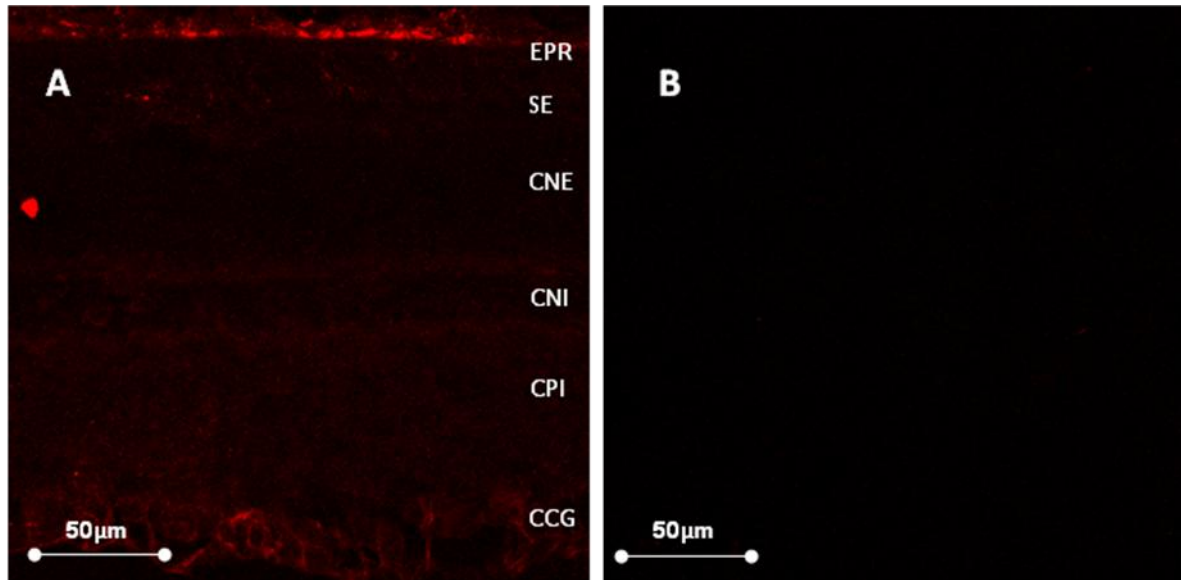


Figura 11. Detección de la presencia del receptor de PRL en retina de ratas Wistar con (A) y sin (B) anticuerpo policlonal anti-RPRL (T6 1:500). Objetivo EC Plan Neo-fluar 40X/1.30 Oil DIC M27. CCG, capa de células ganglionares; CPI, capa plexiforme interna; CNI, capa nuclear interna; CNE, capa nuclear externa; SE, segmentos externos; EPR, epitelio pigmentario retiniano.

9. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos demostrado que la capa más externa de la retina, el EPR, el cual forma parte de la barrera hemoretiniana externa, expresa al receptor de la hormona PRL y a su ligando. Para permitir el proceso de la visión, la retina produce múltiples factores que actúan de manera autócrina y/o paracrina para regular la actividad de las diversas neuronas, células gliales, endoteliales y epiteliales de la retina. Dentro de sus funciones, la PRL ejerce un efecto estimulador sobre la permeabilidad paracelular del EPR. De manera notable, los fragmentos amino-terminales derivados de la proteólisis de la PRL o vasoinhibinas no modifican la permeabilidad del EPR. Cabe resaltar que la estructura y la función de la retina dependen de la integridad de la barrera hemoretiniana y en particular de la capacidad de cierre selectivo del EPR. La importancia del mismo ha sido reconocida en las últimas décadas dado que alteraciones en la función del EPR se han asociado con retinopatías como son la degeneración macular asociada con la edad o el edema macular diabético (Simo R et al. 2010). Sin embargo, se conoce poco acerca de los factores endógenos capaces de regular su permeabilidad, y por lo tanto, es deseable desarrollar y profundizar nuestro conocimiento acerca de los factores que se han detectado en la retina y se ha reportado que regulan la permeabilidad de otros epitelios como es el caso de la PRL.

Nuestro estudio inmunohistoquímico mostró la presencia de la proteína PRL y de su receptor en la capa del EPR de la retina de rata. La ausencia de tinción cuando se omiten los anticuerpos policlonales anti-PRL y anti-receptor de PRL así como la colocalización de la tinción para PRL con el marcador de EPR RPE-65 (Dunn K 1996), corrobora la especificidad de la inmunodetección y muestra por primera vez la presencia de la PRL endógena en el EPR *in situ*. La detección del receptor de PRL en los fotorreceptores (Rivera JC et al. 2008) en conjunto con la presencia de PRL en el EPR sugiere que esta hormona puede actuar de manera paracrina sobre los fotorreceptores retinianos. Al respecto, estudios del laboratorio han mostrado que el aumento en los niveles de la PRL circulante inhibe la apoptosis de los fotorreceptores y previene alteraciones del electroretinograma debidas a daño luminoso (Arnold Hernández E México, 2011). Además encontramos que estos efectos protectores también tienen lugar en respuesta a la PRL endógena, dado que la delección parcial o total del gen que codifica al receptor de la PRL (en ratones RPRL^{+/-} y RPRL^{-/-}, respectivamente) minora la respuesta eléctrica de la retina. Por otra parte, si bien queda por realizar una doble-inmunohistoquímica del receptor de PRL con un marcador específico del EPR, la presencia del receptor de PRL en el EPR se correlaciona con la detección de su ARN mensajero por

hibridación *in situ*. Estos hallazgos indican que la PRL puede actuar de manera autócrina en el EPR de rata. En paralelo, la detección previa de la PRL en los segmentos externos de los fotorreceptores (Rivera JC et al. 2008) hace posible que los receptores de PRL que hemos detectado en el EPR sean estimulados por la PRL de origen neuronal y no del EPR. En conjunto estas evidencias inmunohistoquímicas apuntan al EPR como blanco de la PRL.

Existen varias isoformas del receptor de PRL, las cuales difieren principalmente en el tamaño de su dominio intracelular (Bole-Feysot C et al. 1998). En la retina de rata se ha reportado la isoforma larga (Rivera JC et al. 2008), la cual media los efectos celulares clásicos de la PRL que incluyen la promoción de la supervivencia, proliferación, secreción y diferenciación celular (Schuler LA et al. 2001). En este trabajo, la sonda usada para detectar el ARNm del receptor de PRL mediante hibridación *in situ* fue diseñada en contra de la secuencia que codifica por el dominio de unión al ligando y por ende, no permite discriminar entre las diferentes isoformas (Ben-Jonathan N et al. 2008). De manera similar, el anticuerpo monoclonal anti-receptor de PRL T6 está dirigido en contra del sitio de unión a la PRL (Okamura H et al. 1989). Sin embargo, su uso en el método de Western-blot nos ha permitido detectar en células humanas de EPR (ARPE-19) en cultivo la presencia de las isoformas largas, intermedias y cortas del receptor de PRL.

Independientemente de sus isoformas, la estimulación del receptor de PRL por su ligando activa principalmente la vía de la cinasa JAK2 y del factor transductor de señal y activador de transcripción STAT5 (Teglund S et al. 1998), cuya fosforilación ha sido involucrada recientemente en la promoción de la absorción intestinal de calcio inducida por la PRL (Ajibade DV et al. 2010). Este efecto sobre el movimiento iónico también reportado en la glándula mamaria (Charoenphandhu N et al. 2009), se debe a dos mecanismos: la PRL promueve la expresión epitelial de canales de calcio, lo cual corresponde a la estimulación de la vía transcelular, y también incrementa la permeabilidad paracelular al calcio (Charoenphandhu N et al. 2009; Kraidth K et al. 2009). Estas evidencias nos llevaron a proponer que la PRL es capaz de regular la permeabilidad del EPR y observamos que la PRL aumenta la permeabilidad al FITC-dextran de 40 kDa, es decir que estimula el transporte paracelular de este epitelio. El efecto de la PRL tiende a ser dosis-dependiente y se observa a partir de los 30 minutos, lo cual correlaciona con efectos clásicos de la PRL mediados por unión a su receptor (Ben-Jonathan N et al. 2008). También el hecho de que las vasoinhíbinas no afectan la permeabilidad de la monocapa de células ARPE-19 apunta a una acción específica de la PRL. De manera similar a lo que ocurre en el epitelio intestinal, la PRL podría mediar este efecto no genómico al activar a la cinasa de fosfoinosítido PI3K, la

proteína cinasa C y la cinasa asociada a Rho, por lo que la PRL podría estar regulando la permeabilidad (Kraidith K et al. 2009). Además de las vías de señalización queda por determinar si (Ablonczy Z 2007), la PRL disminuye la resistencia del EPR, de forma similar al VEGF.

Por otra parte, se he reportado que la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) producen lesiones en el EPR. En particular se genera el peróxido de oxígeno (H_2O_2), este compuesto se usa comúnmente *in vitro* como modelo de estrés oxidativo. En este trabajo usamos la concentración de 10 μM de H_2O_2 durante 15 min, lo cual reduce de manera progresiva la resistencia transepitelial al provocar el deterioro de la membrana plasmática (Guang-Yu Li et al. 2010) y en concordancia observamos un aumento en la permeabilidad paracelular. Sin embargo, en estas condiciones, no observamos cambios significativos al añadir PRL. Dado que es posible que el daño producido por el H_2O_2 sea irreversible y máximo, proponemos analizar el efecto de concentraciones y duraciones menores del mismo tratamiento en estudios posteriores. Otra propuesta sería mimetizar en el modelo de células ARPE-19, alteraciones que ocurren en la diabetes como es el aumento en la concentración de glucosa y la hipoxia (Villarroel M et al. 2009). De esta manera sería posible evaluar si al igual que la eritropoietina, la PRL tiene la capacidad de proteger las células ARPE-19 en contra del incremento de la permeabilidad inducido por una alta concentración de glucosa (25 mM) a través de estimular la vía JAK2 y PI3K/AKT (Garcia-Ramirez M et al. 2011).

El control y la regulación de la permeabilidad epitelial son esenciales para el buen funcionamiento del ojo, tanto a nivel de la homeostasis del agua como a nivel de la homeostasis iónica y de las pequeñas moléculas. Nuestros hallazgos apoyan el que la PRL pudiera ejercer efectos semejantes sobre la permeabilidad de otros epitelios oculares como es el de cornea donde se ha detectado el receptor de PRL (Duenas Z et al. 1999). Asimismo, la similitud en la distribución de la PRL y su receptor en las células gliales de Müller, y la detección de la PRL en fluidos oculares como el humor acuoso y el líquido subretiniano (Aranda J et al. 2005; Ochoa A et al. 2001) refuerzan la posibilidad de que la PRL contribuya a la regulación homeostática ocular. El estudio de los efectos propios de la PRL en el ojo se complementa con sus acciones sobre la vascularización ocular vía su procesamiento proteolítico hacia vasoinhibinas (Clapp C et al. 2008).

En este trabajo hemos demostrado que la PRL aumenta la permeabilidad paracelular basal de monocapas de células de EPR humano, pero no modifica el incremento de la misma inducido por daño oxidativo. También hemos observado que fragmentos N-terminales de la

PRL, las vasoinhibinas no parecen participar en regular la permeabilidad paracelular de las células ARPE-19 tanto en condiciones normales como en condiciones de daño oxidativo. Estos hallazgos *in vitro* en conjunto con la detección de la PRL y su receptor señalan a esta hormona como un posible factor involucrado en la fisiología del EPR y ayudarán a mejorar la comprensión que se tiene sobre los mecanismos endógenos de regulación de la barrera hemoretiniana externa. La mayor información de cómo factores producidos por la retina tales como la PRL modulan la función y la integridad del EPR como parte de la barrera hemoretiniana externa es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra patologías donde existe una alteración del EPR. Por ejemplo, es el caso de la neovascularización coroidea que ocurre en la degeneración macular asociada con la edad y en el edema retiniano. El hecho de que la PRL regula la función del EPR *in vitro* y que esta hormona está presente con su receptor en el EPR *in vivo* sugieren funciones autócrinas de la PRL sobre el EPR pero también parácrinas sobre la posible protección de los fotorreceptores. Este estudio complementa la caracterización de los efectos retinianos de la PRL y abre nuevas avenidas en cuanto a su papel como factor trófico en la retina.

9. CONCLUSIONES

- La prolactina aumenta la permeabilidad paracelular basal en cultivos de células ARPE-19, pero no modifica el incremento de la misma inducido por daño oxidativo.
- Las vasoinhibinas no participan en la regulación de la permeabilidad paracelular de las células ARPE-19 tanto en condiciones normales como en condiciones de daño oxidativo.
- La prolactina se localiza en el epitelio pigmentario retiniano de rata.
- El receptor de prolactina está expresado en el EPR así como en proyecciones de la capa de células ganglionares.

10. REFERENCIAS

Ablonczy Z. 2007. VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance. *Experimental Eye Research*.

Ablonczy Z and Crosson CE. 2007. VEGF modulation of retinal pigment epithelium resistance. *Exp. Eye Res.* 762-71.

Ajibade DV, et al. 2010. Evidence for a role of prolactin in calcium homeostasis: regulation of intestinal transient receptor potential vanilloid type 6, intestinal calcium absorption, and the 25-hydroxyvitamin D(3) 1alpha hydroxylase gene by prolactin. *Endocrinology* 2974-84.

Alizadeh M, et al. 2001. Downregulation of differentiation specific gene expression by oxidative stress in ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2706-13.

Allen DM and Cristy M. 1978. Thiourea does not block visual pigment responses to prolactin in trout. *Vis. Res.* 859-60.

Aranda J, et al. 2005. Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2947-53.

Arnold E, et al. 2010. High Levels of Serum Prolactin Protect against Diabetic Retinopathy by Increasing Ocular Vasoinhibins. *Diab.*

Arnold Hernández E. México, 2011. Análisis de efectos de la prolactina y las vasoinhibinas en la retina. Tesis Doctorado (Doctorado en Ciencias Biomédicas)-UNAM, Instituto de Neurobiología 88 p. : il., diagramas.

Bazan NG, et al. 1992. Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *Adv. Exp. Med. Biol.* 295-306.

Beatty S, et al. 2000. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 115-34.

Ben-Jonathan N, et al. 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr. Rev.* 1-41.

Ben-Jonathan N, et al. 2008. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 1-41.

Bird AC. 2003. Phenotype of retinitis pigmentosa associated with the Ser50Thr mutation in the NRL gene. *Arch Ophthalmol* 793-802.

Bole-Feysot C, et al. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 225-68.

- Bosch E, et al. 1993. Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *J. Histochem. Cytochem.* 253-63.
- Calcagno AM, et al. 2005. Modulation of cell adhesion molecules in various epithelial cell lines after treatment with PP2. *Mol. Pharm.* 170-84.
- Cao W, et al. 1999. Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death. *J Neurosci Res* 789-800.
- Clapp C, et al. 2006. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends. Endocrinol. Metab.* 301-7.
- Clapp C, et al. 2008. Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* E772-8.
- Clapp C, et al. 2009. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 1177-215.
- Clapp C and Weiner RI. 1992. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinol.* 1380-6.
- Crim JW. 1975. Prolactin-induced modification on visual pigments in the eastern red-spotted newt, *Notophthalmus viridescens*. *Gen Comp. Endocrinol.* 233-42.
- Charoenphandhu N, et al. 2009. Two-step stimulation of intestinal Ca(2+) absorption during lactation by long-term prolactin exposure and suckling-induced prolactin surge. *Am J Physiol Endocrinol Metab* E609-19.
- Duenas Z, et al. 2004. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2049-55.
- Duenas Z, et al. 1999. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2498-505.
- Duenas Z, et al. 1999. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2498-505.
- Dunn K. 1996. ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties. *Exp. Eye Res.*
- Dunn K, et al. 1996. ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties. *Exp. Eye Res.* 155-69.
- Frambach DA, et al. 1989. Precocious retinal adhesion is affected by furosemide and ouabain. *Curr Eye Res* 553-6.
- Galfione M, et al. 2003. Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expr Purif* 252-8.

- Garcia-Ramirez M, et al. 2011. Erythropoietin protects retinal pigment epithelial cells against the increase of permeability induced by diabetic conditions: Essential role of JAK2/ PI3K signaling. *Cell. Signal.*
- Garcia C, et al. 2008. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest* 2291-300.
- Garcia C, et al. 2008. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J. Clin. Invest.* 2291-300.
- Geisen P, et al. 2006. Characterization of barrier properties and inducible VEGF expression of several types of retinal pigment epithelium in medium-term culture. *Curr. Eye Res.* 739-48.
- Gonzalez C, et al. 2004. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* 5714-22.
- Guang-Yu Li, et al. 2010. Calcium Overload Is A Critical Step in Programmed Necrosis of ARPE-19 Cells Induced by High-Concentration H₂O₂. *Biomed. and Enviroment. Sci.* 371-377
- Hamann S. 2002. Molecular mechanisms of water transport in the eye. *Int. Rev. Cytol.* 395-431.
- Hartnett ME, et al. 2003. Retinal pigment epithelium and endothelial cell interaction causes retinal pigment epithelial barrier dysfunction via a soluble VEGF-dependent mechanism. *Exp. Eye Res.* 593-97.
- Huang AJ, et al. 1989. Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 684-9.
- Janssen-Bienhold U, et al. 1998. Distribution of connexin43 immunoreactivity in the retinas of different vertebrates. *J Comp Neurol* 310-21.
- Komarova Y and Malik AB. 2010. Regulation of Endothelial Permeability via Paracellular and Transcellular Transport Pathways. *Annu. Rev. Physiol.* 463-93.
- Kraidith K, et al. 2009. Direct stimulation of the transcellular and paracellular calcium transport in the rat cecum by prolactin. *Pflugers Arch* 993-1005.
- Kraidith K, et al. 2009. Direct stimulation of the transcellular and paracellular calcium transport in the rat cecum by prolactin. *Pflugers. Arch.* 993-1005.
- Kyoko Ohno-Matsui, et al. 2003. Vascular endothelial growth factor upregulates pigment epithelium-derived factor expression via VEGFR-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 962-67.

- Li GY, et al. 2010. Calcium overload is a critical step in programmed necrosis of ARPE-19 cells induced by high-concentration HO. *Biomed Environ Sci* 371-7.
- Macotella Y, et al. 2006. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J. Cell Sci.* 1790-800.
- Malfait M, et al. 2001. Effects of hyperglycemia and protein kinase C on connexin43 expression in cultured rat retinal pigment epithelial cells. *J Membr Biol* 31-40.
- Marmor MF. 1999. Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. *Doc. Ophthalmol.* 239-49.
- Marmorstein AD. 2001. The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traf.* 867-72.
- Miller SS and Steinberg RH. 1977. Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. *J. Membr. Biol.* 337-72.
- Nguyen DA and Neville MC. 1998. Tight junction regulation in the mammary gland. *J. Mamm. Gland Biol. Neopl.* 233-46.
- Nishimura H. 1985. Endocrine control of renal handling of solutes and water in vertebrates. *Ren. Physiol.* 279-300.
- Nobeschi L, et al. 2006. Intercellular junctions in rabbit eye ora serrata. *Anat Histol Embryol* 287-92.
- O'Steen WK and Kraeer SL. 1977. Effects of hypophysectomy, pituitary gland homogenates and transplants, and prolactin on photoreceptor destruction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 940-6.
- Ochoa A, et al. 2001. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1639-45.
- Okamura H, et al. 1989. Characterization and applications of monoclonal antibodies to the prolactin receptor. *Endocrinology* 2499-508.
- Pacual Mathey LI, et al. 2009. Prolactina: mecanismos intracelulares involucrados en la función prostática. *Rev. Med. UV.* 36-40.
- Pan H, et al. 2004. Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2413-9.
- Pang JJ, et al. 2006. Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis. *Mol. Ther.* 565-72.
- Rivera JC, et al. 2008. Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Exp Eye Res* 314-21.
- Rivera JC, et al. 2008. Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Exp. Eye Res.* 314-21.

- Rizzolo LJ. 2000. Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Brain Res Dev Brain Res* 89-95.
- Rogojina AT, et al. 2003. Comparing the use of Affymetrix to spotted oligonucleotide microarrays using two retinal pigment epithelium cell lines. *Mol Vis* 482-96.
- Schuler LA, et al. 2001. Prolactin receptor heterogeneity: processing and signalling of the long and short isoforms during development. *Biochem. Soc. Trans.* 52-6.
- Schuler LA, et al. 2001. Prolactin receptor heterogeneity: processing and signalling of the long and short isoforms during development. *Biochem Soc Trans* 52-6.
- Simo R, et al. 2010. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J. Biomed. Biotechnol.* 190724.
- Simo R, et al. 2010. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol* 190724.
- Spaide R. 2008. Autofluorescence from the outer retina and subretinal space: hypothesis and review. *Ret.* 5-35.
- Steinberg RH. 1985. Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Doc. Ophthalmol.* 327-46.
- Stelwagen K, et al. 1999. Prolactin, alone or in combination with glucocorticoids, enhances tight junction formation and expression of the tight junction protein occludin in mammary cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 55-61.
- Stevenson BR. 1998. The Tight Junction: Morphology to Molecules. *Cell Dev. Biol.* 89-109.
- Strauss O. 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* 845-81.
- Taylor AW. 2007. Ocular immunosuppressive microenvironment. *Chem Immunol Allergy* 71-85.
- Teglund S, et al. 1998. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 841-50.
- Villarroel M, et al. 2009. Effects of high glucose concentration on the barrier function and the expression of tight junction proteins in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 913-20.
- Walailuk Jantarajit, et al. 2007. Prolactin-stimulated transepithelial calcium transport in duodenum and Caco-2 monolayer are mediated by the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 372-84.
- Witmer AN, et al. 2003. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 1-29.

Wood RL, et al. 1999. Prolactin and prolactin receptors in the lacrimal gland. *Exp. Eye Res.* 213-26.

Yao Y, et al. 2003. Downregulation of the pigment epithelium derived factor by hypoxia and elevated glucose concentration in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 1989-92.

Zayit-Soudry S, et al. 2007. Variability among retina specialists in evaluating fluorescein angiograms of patients with neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 798-803.

11. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representación esquemática de la retina.	1
Figura 2	Representación esquemática del ojo.	3
Figura 3	Curso temporal de los niveles de permeabilidad paracelular al FITC-dextran en cultivos polarizados de células ARPE-19 tratadas o no (control) con 1, 10, y 100 nM de PRL recombinante humana en condiciones basales.	16
Figura 4	Curso temporal de los niveles de permeabilidad paracelular al FITC-dextran en cultivos polarizados de células ARPE-19 tratadas o no (control) con 10 y 100 nM de PRL recombinante humana en condiciones de daño oxidativo.	17
Figura 5	Curso temporal de los niveles de permeabilidad paracelular al FITC-dextran en cultivos polarizados de células ARPE-19 tratadas o no (control) con 5, 10, y 20 nM de vasoinhibinas en condiciones basales.	18
Figura 6	Curso temporal de los niveles de permeabilidad paracelular al FITC-dextran en cultivos polarizados de células ARPE-19 tratadas o no (control) con 10 y 20 nM de vasoinhibinas en condiciones de daño oxidativo.	19
Figura 7	Detección de la presencia del receptor de PRL mediante HIS en retina de ratas Wistar.	20
Figura 8	Detección de la presencia de RPE-65 en retina de ratas Wistar.	21
Figura 9	Detección de la presencia de PRL en retina de ratas Wistar	21
Figura 10	Detección de la presencia de PRL en el EPR por doble inmunohistoquímica en la retina de ratas Wistar	22
Figura 11	Detección de la presencia del receptor de PRL en retina de ratas Wistar	23

12. LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
ADNc	Acido desoxiribonucleico complementario
ARPE-19	Retinal Pigment Epithelium 19
CCG	Capa de células ganglionares
CNE	Capa nuclear externa
CNI	Capa nuclear interna
CPI	Capa plexiforme interna
CO ₂	Dióxido de carbono
EPR	Epitelio pigmentario retiniano
FITC	Por sus siglas en ingles Fluorescein Isothiocyanate
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
HIS	Hibridación <i>in situ</i>
JAK	Por sus siglas en ingles Janus Kinase
kDa	Kilodaltons
PBS	Por sus siglas en ingles: Phosphate buffered saline
P.C.	Peso corporal
PEDF	Factor derivado del epitelio pigmentario
PI3K	Por sus siglas en ingles: Phosphatidylinositol-3 Kinase
PRL	Prolactina
mRNA	Por sus siglas en ingles Ribonucleic acid messenger
NaCl	Cloruro de sodio
RPE-65	Por sus siglas en ingles: Retinal Pigment Epithelium-65
RNA	Por sus siglas en ingles: Ribonucleic acid
SE	Segmentos externos
STAT	Por sus siglas en ingles: Signal Transducers And Activators of Transcription
ROCK	Por sus siglas en ingles: RhoA-associated coiled-coil forming kinase
SDS	Por sus siglas en ingles: Sodium Dodecyl Sulfate
TA	Temperatura ambiente
VEGF	Por sus siglas en ingles: Vascular Endothelial Growth Factor
Vi	Vasoinhibinas