



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM campus Juriquilla**

**“Estudio sobre la generación de vasoinhibina en la retina durante el desarrollo postnatal temprano del ratón”**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

**Francisco Freinet Núñez Ramírez**

**TUTOR**

**Dra. María del Carmen Clapp Jiménez-L. (INB)  
Dra. Lourdes Montserrat Siqueiros Márquez (INB)**

**COMITÉ TUTOR**

**Dr. Lenin David Ochoa de la Paz (FPSI)  
Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno (INB)**

**JURIQUILLA, QUERÉTARO  
AGOSTO, 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Francisco Freinet Núñez Ramírez, cuyo título es: “Estudio sobre la generación de vasoinhibina en la retina durante el desarrollo postnatal temprano del ratón” 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.

Presidente:

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

---

Secretario:

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez-L.

---

Vocal:

Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra

---

Suplente:

Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno

---

Suplente:

Dra. Rebeca Corona García-Cabral

---

Aprobado por el comité académico

---

Dra. Maricela Luna Muñoz  
Coordinadora del programa de Maestría en Ciencias  
(Neurobiología)

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. María del Carmen Clapp Jiménez-L. y la Dra. Lourdes Montserrat Siqueiros Márquez. Trabajo financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto 289568 y número de becario 923115.

*Todo gran científico en la  
historia comenzó como nada  
más que lo somos ahora:  
estudiantes*

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización de este proyecto de Maestría.

Muchas gracias también al Instituto de Neurobiología de la UNAM, por las prestaciones de recursos y equipos necesarios para la realización de este trabajo.

Gracias, al Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) de la UNAM, por las enseñanzas y apoyo brindado; así como a la Dra. Nuri Aranda López, en la Unidad de Enseñanza del posgrado, por su asistencia continua.

A mi tutora, la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez-L., directora de este proyecto, guía, consejera y apoyo constante durante su realización. ¡Muchas gracias por tanto, Doctora Clapp!

A la Dra. Lourdes Montserrat Siqueiros Márquez, co-tutora de este trabajo, mentora y amiga. ¡Lo logramos! No hay palabras para agradecerle tanto.

Al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo, muchas gracias por su revisión y comentarios críticos del proyecto, así como sus buenos consejos. Siempre se llevan presentes.

Gracias también a la Dra. Edith Arnold Hernández por su apoyo, revisión y comentarios críticos durante todo el desarrollo del proyecto.

Gracias a la Dra. Yazmín Macotela Guzmán por su retroalimentación constante del proyecto.

Agradezco mucho, al Dr. Lenin David Ochoa de la Paz y al Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno, miembros de mi comité tutorial, quienes siguieron el desarrollo de este proyecto desde el día 1 y aportaron siempre valiosos comentarios para mi persona y el rumbo del proyecto.

Al Lic. Fernando López Barrera, técnico académico del Laboratorio de endocrinología molecular, por su soporte técnico. ¡Muchas gracias!

A la Dra. Xarubet Ruíz Herrera, técnico académico del Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción, por su soporte técnico y asesoramiento. ¡Muchas gracias!

De igual manera, agradezco infinitamente a toda la Unidad del Bioterio, en especial a la Dra. Alejandra Castilla León, a la Dra. María Antonieta Carbajo Mata y al MVZ. José Martín García Servín, por su asistencia técnica en el manejo y cuidado de los animales de experimentación.

A María de Lourdes Lara Ayala, en la Unidad de Videoconferencia del Instituto de Neurobiología, muchas gracias por su asistencia técnica cada semestre.

Y a los laboratoristas Daniel Mondragón y Antonio Prado, les agradezco por toda su ayuda en el proceso de desarrollo de este trabajo.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Estoy en deuda con cada uno de mis compañeros de laboratorio del A14-A15 porque cada uno de ellos contribuyó de una u otra forma y es parte de este proyecto.

Gracias **Daniel Mondragón** y **Don Toño**, por toda su ayuda en el desarrollo de este trabajo. **Fernando López**, gracias también por el apoyo técnico. **Xarubet Ruíz**, gracias por tu apoyo técnico y ser un ejemplo como profesional.

Muchas gracias también **Juan Pablo Robles** y **Magdalena Zamora**, por sus consejos y su apoyo; aprendo mucho de ustedes. Una gratificación muy especial para la **Dra. Edith Arnold**, por todo el apoyo brindado, los consejos y su confianza; ¡gracias!

**Fernando Macías**, **José García**, **Miriam Ulloa**, **Georgina Ortiz**, **Josué Rivera**, **Rodrigo Aroña**, **Jocelyn Salas**, gracias por su amistad, su apoyo y consejos, así como esas buenas pláticas que me permitieron sobrellevar un día largo en más de una ocasión; los aprecio muchísimo y el laboratorio sin duda no hubiera sido el mismo sin su compañía. **José García**, gracias también por ser mi compañero de generación, por todo el apoyo brindado a lo largo de estos dos años de maestría; fue un placer compartir esta experiencia contigo, amigo.

**Miguel Vázquez**, te estimo mucho, he aprendido; gracias por tu apoyo incondicional, por enseñarme tanto, espero poder seguir teniendo la oportunidad de trabajar contigo en un futuro. Tampoco los días habrían sido los mismos sin una vecina como tú, **Elva Adán**; gracias por tu amistad, tus consejos, tu apoyo (y tus galletas, claro). **Gabriela Ramírez**, también gracias por tanto, eres un ejemplo para mí, créeme. Y no te podías quedar atrás, **Daniela Granados**, es un placer compartir el laboratorio contigo, gracias por tantas risas y apoyo.

**Katia Olmos**, aprendimos juntos y crecimos juntos, gracias por tus pláticas y tu apoyo; siéntete orgullosa porque este es tu trabajo también, te echamos de menos.

**Montserrat Siqueiros**, no sé por dónde empezar contigo... Gracias por tu paciencia, por tu entusiasmo que contagia, por tu apoyo constante. Crecí profesionalmente con tu tutoría, pero también personalmente con tu amistad. Es un honor compartir el laboratorio contigo. ¡Gracias!.

Por último, pero no así menos importante, quiero agradecerle muy especialmente a la **Dra. Carmen Clapp** por su confianza y apoyo en todo momento en la realización de esta tesis; ¡es un honor ser su estudiante y aprender de usted Doctora! Asimismo, agradezco al **Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera** por todo el apoyo y enseñanzas brindadas.



A ustedes, Maritere, Francisco y Alvar, por guiarme hasta donde estoy hoy.

A ti, Paola, por siempre estar conmigo.

## ÍNDICE

1. LISTA DE FIGURAS.....	1
2. LISTA DE TABLAS.....	2
3. RESUMEN.....	3
2.1 Abstract.....	4
4. INTRODUCCIÓN.....	5
5. ANTECEDENTES.....	6
5.1 El eje prolactina/vasoinhibina.....	6
5.2 Generación, distribución y tejidos blanco de la vasoinhibina.....	6
5.3 El eje prolactina/vasoinhibina y la retina.....	8
5.4 Participación de la PRL y la vasoinhibina en la retinopatía del prematuro.....	9
6. JUSTIFICACIÓN.....	14
7. HIPÓTESIS.....	15
8. OBJETIVO.....	15
8.1 Objetivos particulares.....	15
9. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
9.1 Animales y modelo experimental.....	16
9.2 Enucleación, disección y homogenado de retinas.....	16
9.3 Corte de PRL y Western blot.....	16
9.4 PRL de suero.....	17
9.5 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario.....	17
9.6 PCR cuantitativa.....	17
9.7 Análisis estadístico.....	17
10. RESULTADOS.....	19
10.1 Proteasas ácidas de extractos de retina de ratones adultos procesan a la PRL hacia vasoinhibina.....	19
10.2 Las proteasas ácidas generan menos vasoinhibina en las retinas de ratones neonatos que en las de ratones adultos.....	19
10.3 La catepsina D es la proteasa ácida que genera vasoinhibina en los extractos de retina.....	20

10.4 La vasoinhibina generada por la catepsina D se reduce aún más en las retinas de ratones recién nacidos sometidos a condiciones de hiperoxia.....	21
10.5 La PRL no es detectable en la circulación en P8 cuando la retina expresa el ARN mensajero de la hormona y de su receptor.....	22
11. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	24
12. LITERATURA CITADA.....	28

## 1. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. La prolactina y la vasoinhibina poseen efectos antagónicos sobre la angiogénesis.....	7
Figura 2. La hiperprolactinemia revierte la vasopermeabilidad retiniana inducida por la diabetes en ratas.....	8
Figura 3. La vasoinhibina es un regulador endógeno de la angiogénesis.....	9
Figura 4. Los niveles circulantes de prolactina se encuentran más elevados en pacientes que desarrollan retinopatía del prematuro.....	10
Figura 5. Patogénesis de la retinopatía del prematuro.....	10
Figura 6. Desarrollo vascular de la retina del ratón.....	11
Figura 7. La prolactina reduce el arresto de la angiogénesis retiniana inducido por la hiperoxia.....	13
Figura 8. Sólo proteasas ácidas participan en la generación de vasoinhibina en extractos de retina de ratones adulto.....	19
Figura 9. Niveles menores de vasoinhibina son generados por extractos de retina de ratones neonatos en comparación con el adulto.....	20
Figura 10. La catepsina D es la proteasa responsable de la generación de vasoinhibina en la retina del ratón.....	21
Figura 11. La hiperoxia favorece la generación de menos vasoinhibina en la retina por acción de la catepsina D.....	22
Figura 12. La prolactina parece ser un regulador local de la angiogénesis durante el desarrollo vascular de la retina.....	23

## **2. LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Lista de iniciadores utilizados para la PCR cuantitativa.....	18
--	----

### 3. RESUMEN

El eje prolactina (PRL)/vaso-inhibina está emergiendo como un importante regulador de la vasculatura ocular. La PRL estimula el crecimiento de los vasos sanguíneos (angiogénesis) pero también posee efectos antiangiogénicos e inhibidores de la vasopermeabilidad al sufrir un corte proteolítico hacia vaso-inhibina, el fragmento N-terminal de la PRL. Altos niveles de PRL circulante (hiperprolactinemia) elevan la concentración intraocular de la vaso-inhibina, lo que conduce a la inhibición de la vasopermeabilidad retiniana en ratas diabéticas adultas. Sin embargo, la hiperprolactinemia también promueve el crecimiento de la vasculatura retiniana durante el desarrollo postnatal temprano del ratón, sugiriendo una disminución en la conversión retiniana de PRL a vaso-inhibina durante esta etapa del desarrollo. En este trabajo se investigó y comparó la capacidad de la retina de ratones neonatos, en el día postnatal (P) 8, y de adultos de 3 meses de edad de generar vaso-inhibina mediante el análisis de las proteasas de PRL presentes en homogenados de retina. Doscientos ng de PRL recombinante de ratón se incubaron durante 24 horas a pH 5 y 37 °C con diferentes concentraciones de proteína de extractos de retina, y los productos de la proteólisis de la PRL se evaluaron mediante Western blot. La incubación de la PRL resultó en su conversión parcial a vaso-inhibina y la generación de vaso-inhibina fue significativamente menor cuando se utilizó el extracto proveniente de retina de neonato, comparado con el obtenido de ratones adultos. El corte de PRL hacia vaso-inhibina se inhibió mediante la inactivación por calor del extracto y mediante la adición del inhibidor de la catepsina D, pepstatina A, a la mezcla de incubación. Estos resultados indican que la proteasa ácida, catepsina D, es responsable del procesamiento de PRL hacia vaso-inhibina en la retina de ratones neonatos y ratones adultos. Además, se encontró que el corte de PRL a vaso-inhibina mediado por catepsina D se reduce significativamente cuando se utilizan extractos de retina de ratones neonatos expuestos a hiperoxia (75% de oxígeno), una condición que promueve la neovascularización inducida por isquemia de la retina neonatal. Asimismo, encontramos que la PRL está ausente en la circulación del ratón en P8 cuando la retina expresa el ARN mensajero tanto de la PRL como de su receptor. Estos hallazgos sugieren que la PRL promueve localmente la vascularización de la retina postnatal, cuando se favorece su efecto pro-angiogénico gracias a su menor conversión a vaso-inhibina vía catepsina D. La determinación de los niveles de PRL y vaso-inhibina en la retina y el uso de animales nulos para el receptor de PRL permitirá evaluar esta posibilidad.

### 3.1 ABSTRACT

The prolactin (PRL)/vasoinhibin axis is emerging as an important regulator of the ocular vasculature. PRL stimulates the growth of blood vessels (angiogenesis) but acquires antiangiogenic properties upon its proteolytic cleavage to the PRL fragment, vasoinhibin. High levels of circulating PRL raise the intraocular concentration of vasoinhibin, which leads to the inhibition of retinal vasopermeability in adult diabetic rats. However, hyperprolactinemia also promotes the growth of the retinal vasculature during the early postnatal development of the mouse, suggesting a decrease in the retinal conversion of PRL to vasoinhibin during this stage of development. In this work, we investigated and compared the ability of the neonatal mice retina, at postnatal day (P) 8, and 3 months old adult mice to generate vasoinhibin by analyzing the PRL proteases present in retinal homogenates. Two hundred ng of recombinant PRL were incubated with different protein concentrations of retinal extracts for 24 hours at pH 5 and 37 ° C and PRL proteolytic products were evaluated by Western blot. The incubation of PRL resulted in its partial conversion to vasoinhibin, which was reduced when extracts were harvested from neonate than adult mouse retinas. The conversion of PRL to vasoinhibin was inhibited by the heat-inactivation of the extract or by the addition of cathepsin D inhibitor, pepstatin A. These results indicate that the acid protease, cathepsin D, cleaves PRL to generate vasoinhibin in the retina from newborn and adult mice. In addition, cathepsin D cleavage of PRL was further reduced in retinal extracts of neonatal mice exposed to hyperoxia (75% oxygen), a condition that promotes ischemia-induced retinal neovascularization. Furthermore, we found that PRL is undetectable in the circulation of mice at P8 when the retina expresses the mRNA of PRL and the PRL receptor. These findings suggest that PRL acts locally to promote the vascularization of the newborn mouse retina when its proangiogenic effect is reinforced by its reduced cathepsin-D mediated conversion to vasoinhibin. The levels of PRL and vasoinhibin in the newborn mouse retina and the use of knockout mice for the PRL receptor will help validate this possibility.

#### 4. INTRODUCCIÓN

La hormona prolactina (PRL) es capaz tanto de estimular como de inhibir la función vascular. Estos efectos contrarios residen en la estructura molecular de la hormona, mientras que la PRL completa promueve la angiogénesis, el fragmento N-terminal resultante de su procesamiento por enzimas proteolíticas, la vasoinhibina, ejerce acciones antiangiogénicas e inhibitoras de la permeabilidad y constricción vascular (Clapp *et al.*, 2006). Se conocen tres tipos de proteasas endógenas que generan a la vasoinhibina: la catepsina D, las metaloproteasas de matriz (MMPs) y la proteína morfogenética ósea 1 (BMP-1) (Piwnica *et al.*, 2004; Macotela *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2007).

Estudios recientes indican que la retina, un tejido donde la angiogénesis se encuentra altamente restringida, es tanto fuente como blanco de la vasoinhibina (Clapp *et al.*, 2015; Triebel *et al.*, 2015). Zepeda-Romero y colaboradores (2017) reportan un desequilibrio temporal del eje PRL/vasoinhibina en pacientes que desarrollan retinopatía del prematuro (ROP), un trastorno vasoproliferativo de la retina que es la principal causa de ceguera en la niñez (Friddle, 2013). Los autores proponen que la elevación en los niveles sistémicos de la PRL modifica la producción retiniana de vasoinhibina e influye sobre la progresión de la ROP a través de favorecer la neovascularización de la retina. En apoyo a estas observaciones, recientemente se demostró que el tratamiento sistémico con PRL promueve la supervivencia y angiogénesis de la retina en ratones neonatos bajo condiciones de hiperoxia (Vázquez-Membrillo *et al.*, 2020).

Con base en estas observaciones, se planteó la posibilidad de que la actividad de las proteasas que convierten PRL a vasoinhibina se modifique en estadios tempranos del desarrollo neonatal y bajo hiperoxia ambiental, una condición que mimetiza la suplementación de oxígeno administrado a neonatos prematuros con fines terapéuticos y que puede conducir a la neovascularización excesiva de la retina que caracteriza a la ROP (Hellstrom *et al.*, 2013). El presente trabajo evalúa esta posibilidad a través de investigar la actividad de las proteasas capaces de procesar a la PRL a vasoinhibina en la retina de ratones neonatos en el día postnatal (P) 8, mantenidos bajo normoxia o hiperoxia, y compararla con la de las proteasas de la retina de ratones adultos. El origen de la PRL susceptible a ser modificada por las proteasas retinianas se analizó a través de determinar los niveles circulantes de la PRL y la producción de esta hormona y de su receptor en la retina. A continuación, se describen brevemente los antecedentes y el marco conceptual de este estudio.



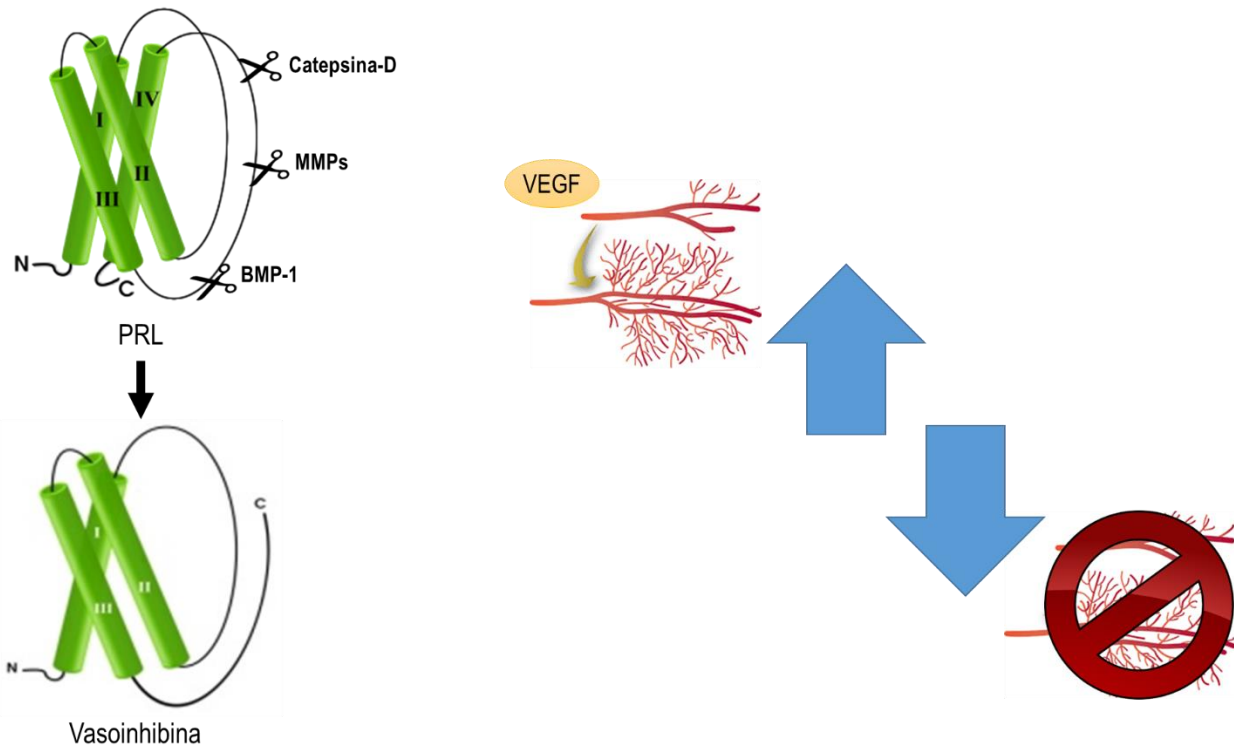
## 5. ANTECEDENTES

### 5.1 El eje PRL/vasoinhibina

La PRL es una hormona pituitaria perteneciente estructuralmente a la familia de citocinas helicoidales de clase 1 de cadena larga que se pliegan en cuatro hélices  $\alpha$ . La versatilidad de sus funciones se ve reflejada en sus efectos sobre la reproducción, osmoregulación, metabolismo, respuesta inmune, neuroregulación, comportamiento y angiogénesis (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Ben-Jonathan *et al.*, 2006; Clapp *et al.*, 2009). Los efectos de la PRL sobre los vasos sanguíneos han sido extensamente estudiados. Se sabe que la PRL promueve el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, tanto a través de acciones directas sobre la proliferación de células endoteliales, como indirectas, induciendo la expresión de factores proangiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Clapp *et al.*, 2006, Clapp *et al.*, 2008, Clapp *et al.*, 2015). Sin embargo, la PRL también es capaz de inhibir la proliferación, dilatación, permeabilidad y regresión de los vasos sanguíneos. Estos efectos antagónicos los ejerce a través de su conversión proteolítica a su metabolito, la vasoinhibina, una familia de fragmentos de la PRL que contienen el extremo N-terminal de la hormona y que poseen efectos antiangiogénicos e inhibidores de la supervivencia, permeabilidad y dilatación de los vasos sanguíneos (Figura 1) (Triebel *et al.*, 2015).

### 5.2 Generación, distribución y tejidos blanco de la vasoinhibina

La catepsina D, las MMPs y BMP-1 generan isoformas de la vasoinhibina de distintos tamaños que van desde los 11 hasta los 18 kDa y que resultan del corte de la PRL a diferentes niveles del asa que conecta las hélices- $\alpha$  tres y cuatro de la molécula. La catepsina D corta a la PRL de la rata y del ratón en una vasoinhibina de 16 kDa (Baldocchi *et al.*, 1993; Ishida *et al.*, 2014); a la PRL ovina en vasoinhibinas de 14 y 16 kDa (Erdmann *et al.*, 2007); a la PRL de búfalo en vasoinhibinas de 11, 14 y 18 kDa (Lee *et al.*, 2011) y a la PRL humana en vasoinhibinas de 11, 15, 16.5 y 17 kDa (Piwnica *et al.*, 2004). Por su parte, las MMPs cortan a la PRL humana y de rata generando vasoinhibinas de 16 y 17 kDa (Macotella *et al.*, 2006), mientras que la BMP-1 genera un único fragmento de 17 kDa a partir tanto de la PRL humana, como de la PRL de ratón (Ge *et al.*, 2007).

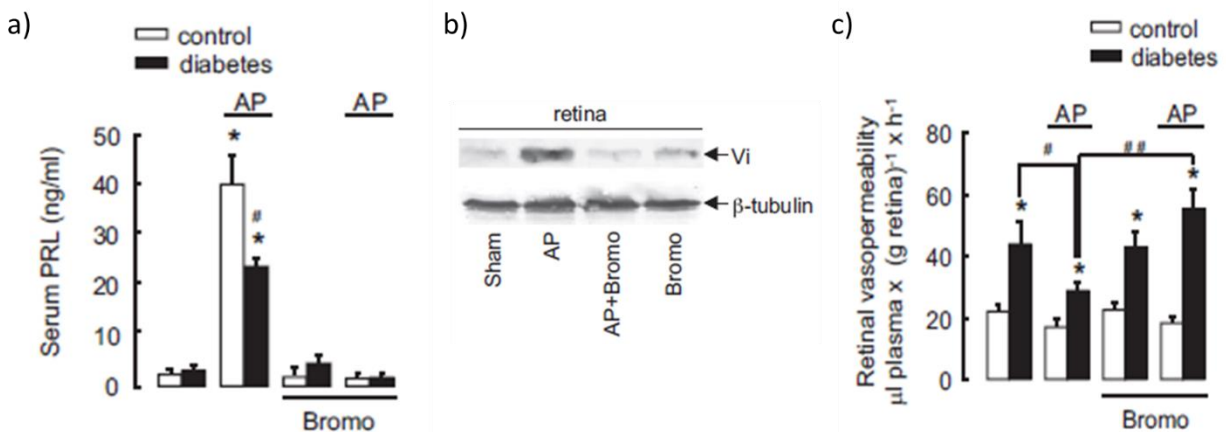


**Figura. 1. La prolactina (PRL) y la vasoinhibina poseen efectos antagónicos sobre la angiogénesis.** Las acciones proangiogénicas de la PRL pueden ser tanto directas promoviendo la proliferación de las células endoteliales, como indirectas, induciendo la expresión de factores proangiogénicos, como el VEGF. Sin embargo, la vasoinhibina generada mediante el procesamiento proteolítico de la hormona, inhibe la angiogénesis. MMPs, metaloproteasas de matriz; BMP-1, proteasa morfogenética de hueso 1; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular.

La capacidad de las proteasas para generar a la vasoinhibina se ha demostrado en diversos órganos, que incluyen a la glándula mamaria, el corazón y el hígado (Clapp, 1987; Baldocchi *et al.*, 1995; Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2007). Por otro lado, la vasoinhibina endógena ha sido reportada en la glándula pituitaria de la rata, el ratón y el humano (Sinha *et al.*, 1984; Sinha *et al.*, 1985; Cruz-Soto *et al.*, 2009); en el endotelio vascular humano (Corbacho *et al.*, 2000); en la placenta humana y de rata (Perimenis *et al.*, 2014) y en el hipotálamo, la neurohipófisis, el cartílago y la retina de roedores (Clapp *et al.*, 1994; Aranda *et al.*, 2005; Macotela *et al.*, 2006; Arnold *et al.*, 2010; Zamorano *et al.*, 2014). También se ha reportado la presencia de vasoinhibina en fluidos corporales como el suero y plasma humano y de rata (Gonzalez *et al.*, 2007; Triebel *et al.*, 2009; Zepeda-Romero *et al.*, 2017) y el líquido amniótico, la orina y el fluido subretinal de humanos (Duenas *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2007; Leanos-Mirando *et al.*, 2008).

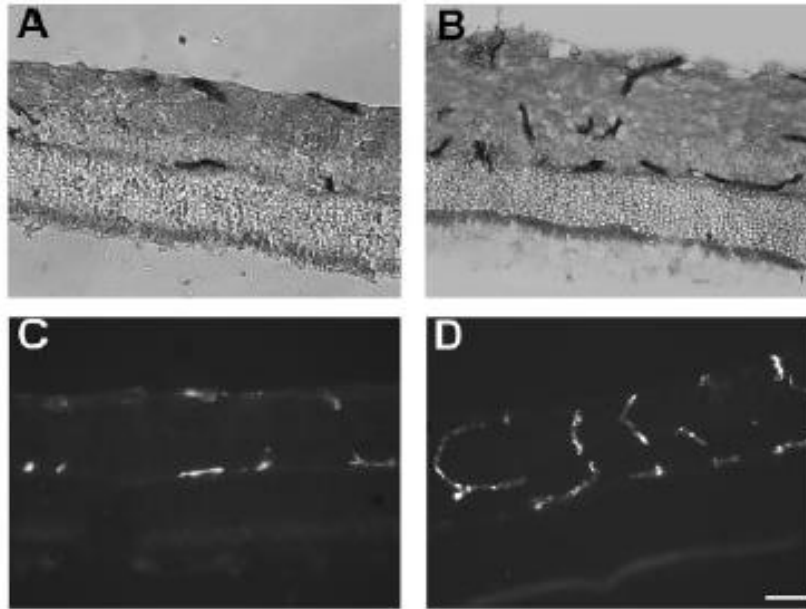
### 5.3 El eje PRL/vasoinhibina y la retina

En organismos adultos, la formación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso quiescente en la mayoría de los tejidos, siendo altamente restringido en la retina. El desajuste de este ambiente antiangiogénico da origen a diversas patologías de la retina, como la retinopatía diabética (DR) o la ROP. En este fino equilibrio vascular participan factores antiangiogénicos propios del organismo (Clapp *et al.*, 2008).

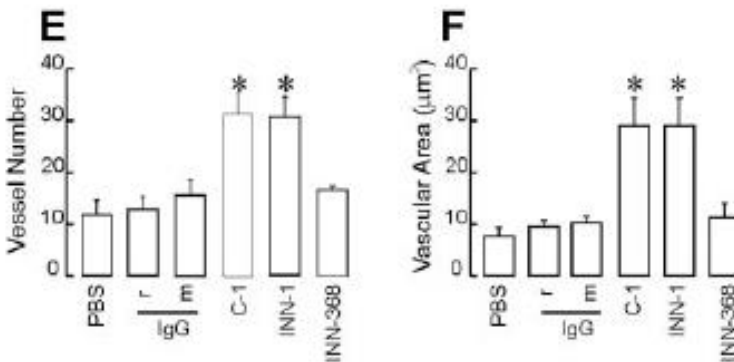


**Figura. 2. La hiperprolactinemia revierte la vasopermeabilidad retiniana inducida por la diabetes en ratas.** La elevación por implantes adenohipofisarios (AP) de los niveles sistémicos de la prolactina (PRL) (a) conduce a la acumulación de vasoinhibina (Vi) en la retina (b) y a la reducción de la excesiva vasopermeabilidad retiniana inducida por la diabetes (c) en la rata. La inhibición farmacológica de la secreción pituitaria de la PRL con bromocriptina (Bromo), decremента los niveles sistémicos de la hormona, disminuye la acumulación de vasoinhibina en la retina y evita la reducción en la vasopermeabilidad debida a la hiperprolactinemia. Tomado de Arnold *et al.*, 2010.

Reportes recientes sugieren que la retina puede actuar como órgano productor y blanco de la vasoinhibina. Arnold *et al.*, (2010) reportaron que la inducción de hiperprolactinemia en roedores conduce a la acumulación de vasoinhibina en la retina, mientras que el bloqueo farmacológico de la hiperprolactinemia reduce estos niveles (Figura 2). Asimismo, la administración intraocular de vasoinhibina previene y revierte la excesiva vasopermeabilidad retiniana inducida por la diabetes (García *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2011) y la inmunoneutralización de la vasoinhibina ocular estimula la angiogénesis en la retina de (Aranda *et al.*, 2005) de la rata (Figura 3).

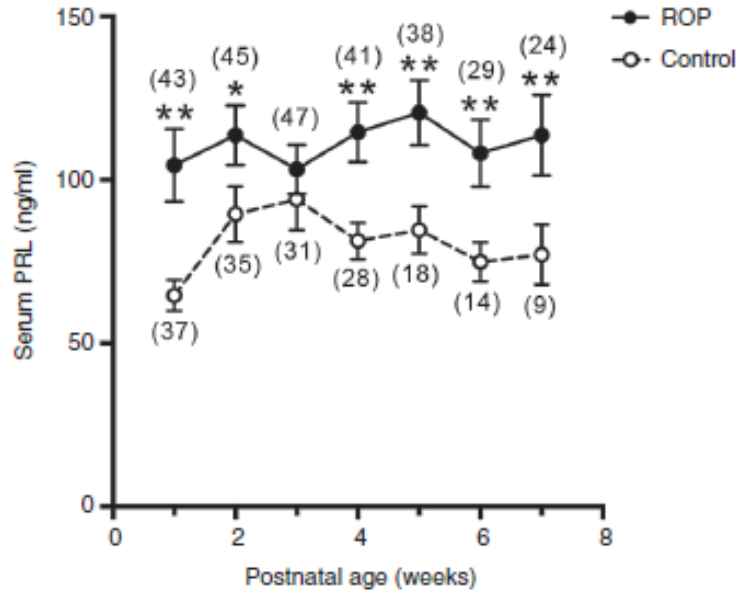


**Figura 3. La vasoinhibina es un regulador endógeno de la angiogénesis.** La administración intravítrea de anticuerpos que reconocen a la vasoinhibina (C-1, INN-1) estimula la angiogénesis en la retina de ratas adultas (B y D). Este efecto no se observa en presencia de un anticuerpo (IgG, INN-368) no dirigido contra la vasoinhibina (A y C) (control negativo). La respuesta vascular se cuantificó mediante el número de vasos sanguíneos (E) y el área vascular (F). Tomado de Aranda *et al.*, 2005.



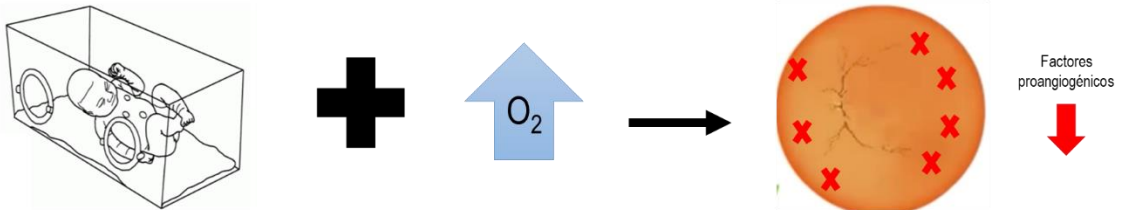
#### 5.4 Participación de la PRL y la vasoinhibina en la retinopatía del prematuro

La retinopatía del prematuro o ROP es un trastorno vasoproliferativo de la retina que es la principal causa de ceguera en la niñez (Friddle, 2013). La búsqueda de nuevos péptidos antiangiogénicos endógenos que inhiban la neovascularización asociada a retinopatías vasoproliferativas, llevaron al estudio del eje PRL/vasoinhibina en las alteraciones vasculares de la ROP. Pan *et al.*, (2004) mostraron que la terapia génica ocular con vasoinhibina reduce la excesiva neovascularización retiniana inducida por la exposición de ratas recién nacidas a condiciones de hiperoxia/normoxia, un modelo experimental de la ROP. Además, cambios temporales en los niveles sistémicos de PRL y vasoinhibina han sido reportados en pacientes con ROP y fueron asociados a las fases avasculares y vasculares de la enfermedad (Zepeda-Romero *et al.*, 2017) (Figura 4).

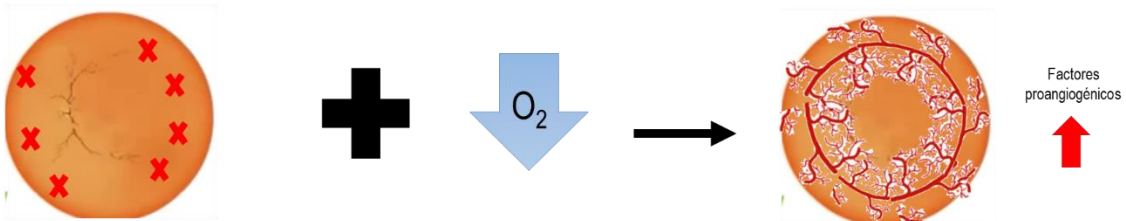


**Figura. 4. Los niveles circulantes de prolactina se encuentran más elevados en pacientes que desarrollan retinopatía del prematuro.** Niños prematuros con retinopatía del prematuro (ROP) presentan niveles sistémicos más elevados de prolactina (PRL) durante las primeras siete semanas de vida postnatal, respecto a los niveles de niños prematuros sin la enfermedad. Este periodo de tiempo corresponde a un periodo previo y posterior a la manifestación del padecimiento que ocurre generalmente a la quinta semana de vida postnatal. Los valores son medias  $\pm$  SEM. El número de pacientes (n) se indica dentro del paréntesis. Tomado de Zepeda-Romero *et al.*, 2017.

### Fase 1



### Fase 2



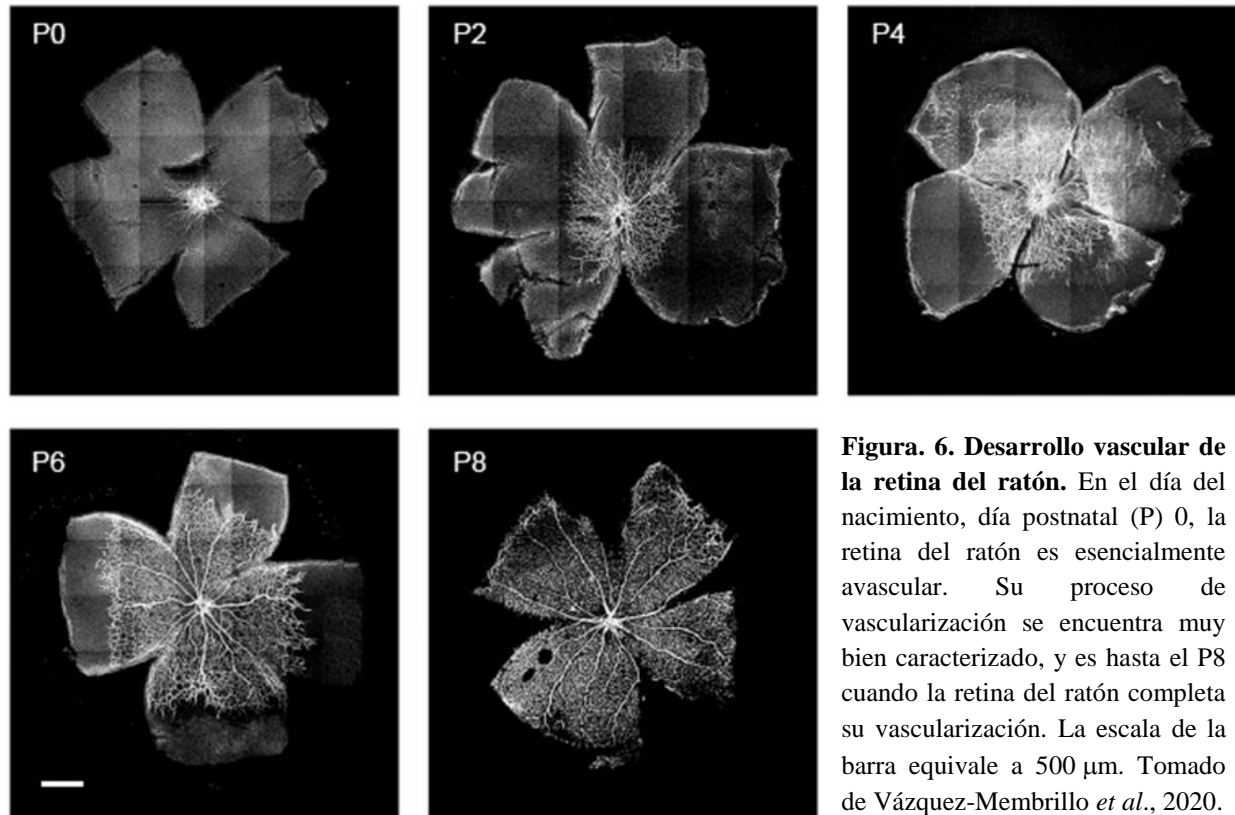
**Figura. 5. Patogénesis de la retinopatía del prematuro.** La retinopatía del prematuro o ROP es un trastorno vasoproliferativo de la retina que ocurre en niños prematuros. Los niños prematuros al nacer deben ser puestos en una incubadora debido a su inmadurez pulmonar, exponiéndolos a altos niveles de oxígeno. La patología comienza con el deterioro del crecimiento de los vasos sanguíneos y la destrucción de los vasos ya formados en la retina a consecuencia de la hiperoxia. Esta destrucción de los vasos conduce a una condición de hipoxia local, que a través de la producción de factores proangiogénicos, estimula la angiogénesis anormal y el eventual desprendimiento de retina.

En este estudio se encontró que a diferencia de conocidos factores de riesgo de ROP (corta edad gestacional, bajo peso al nacer, sepsis, índice Apgar y tiempo de exposición a hiperoxia), los niveles elevados de la PRL durante la primera semana de vida fueron la única variable asociada significativamente con la presencia de ROP, y que el riesgo de presentar ROP mostró una relación directa con el incremento en cuartiles de la PRL circulante. Estos hallazgos llevaron a proponer que la PRL es un factor de riesgo para el desarrollo de ROP, probablemente debido a sus propiedades proangiogénicas. Sin embargo, dado que la PRL puede inhibir y estimular los vasos sanguíneos, es posible proponer que estos niveles más elevados de PRL en pacientes con ROP, aunados a una alteración en la generación de la vasoinhibina, puedan promover el inicio y la progresión de la ROP.

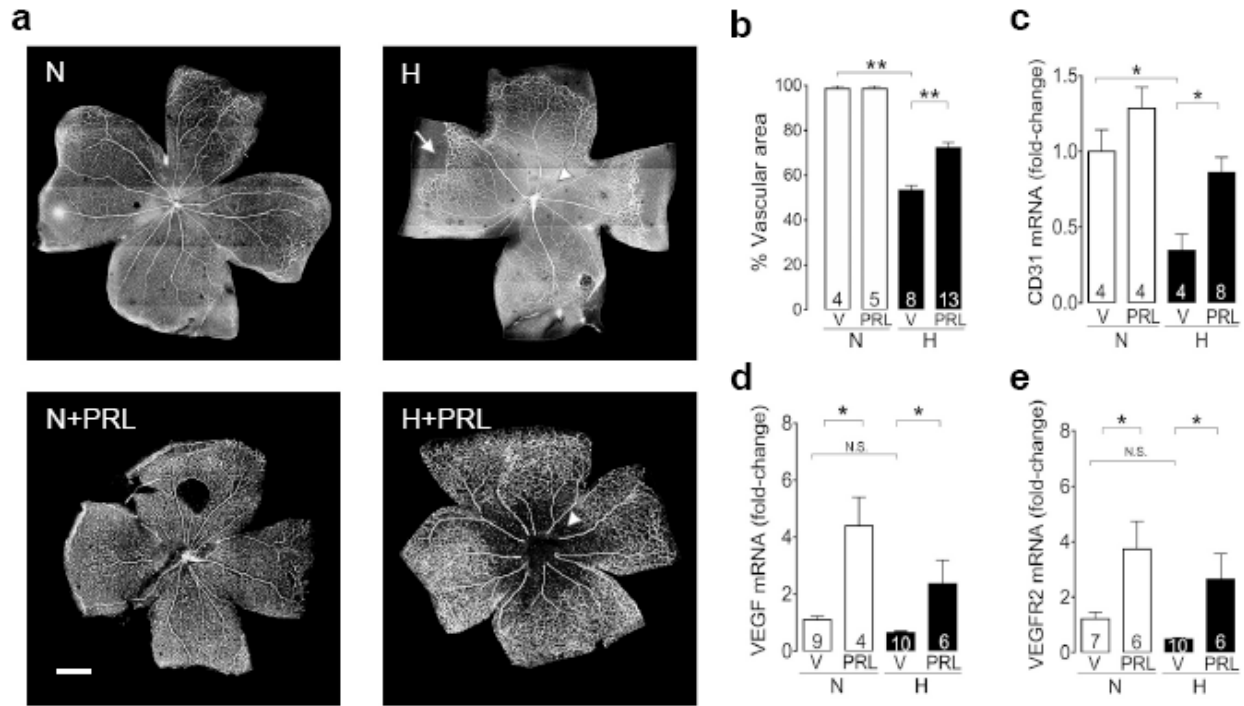
La patofisiología de la ROP se ha explicado a través de la existencia de dos fases secuenciales de vascularización de la retina (Hellstrom, 2013) (Figura 5). La fase 1 donde la exposición a altos niveles de oxígeno ambiental (oxígeno suplementario suministrado en la incubadora para asegurar el buen funcionamiento pulmonar de los neonatos prematuros) frena la angiogénesis e induce la pérdida de vasos sanguíneos retinianos. Subsecuentemente, estas alteraciones vasculares conllevan a una hipoxia local que promueve la generación de una angiogénesis excesiva, donde los neovasos pueden llegar a invadir el vítreo y ocasionar ceguera por desprendimiento de la retina.

Para investigar si los niveles elevados de PRL circulante, como los que se encuentran en pacientes con ROP, modifican la vasculatura de la retina y por lo tanto, que la promoción de la angiogénesis retiniana es un posible mecanismo por el cual la hiperprolactinemia influye en la ROP, Vázquez-Membrillo y colaboradores (2020) evaluaron el efecto de la administración sistémica de PRL en la retina de ratones neonatos expuestos o no a altas concentraciones de oxígeno. La retina del ratón neonato simula la retina de un humano neonato prematuro en el hecho de que su vascularización es incompleta al nacer (Figura 6). En el día del nacimiento, la retina del ratón es esencialmente avascular y los vasos se originan a la altura del nervio óptico y proliferan migrando radialmente hacia la periferia completando la vascularización de la retina en P8 (Smith *et al.*, 1994). Así como sucede en un humano neonato prematuro con ROP, la exposición a hiperoxia del ratón neonato, durante la primera semana neonatal, frena el crecimiento vascular de la retina a través de inhibir la producción de factores proangiogénicos (Connor *et al.*, 2009; Friddle, 2013). De manera que la exposición de ratones neonatos a altas concentraciones de oxígeno, de

P2 a P5 o de P6 a P8, produce un frenado vascular que facilita la investigación de la acción tanto de factores estimuladores como inhibitorios de la angiogénesis retiniana. Bajo estas condiciones, la administración sistémica de PRL promovió la supervivencia y la angiogénesis vascular retiniana (Vázquez-Membrillo *et al.*, 2020) (Figura 7).



El hecho de que la hiperprolactinemia tenga efectos proangiogénicos y no antiangiogénicos en la etapa postnatal temprana sugiere que la conversión de PRL a vasoinhibina no ocurre o está disminuida durante esta fase del desarrollo; de hecho, el efecto proangiogénico de la PRL en la retina neonatal contrasta con el efecto observado en animales adultos, donde la elevación en los niveles circulantes de la hormona inhibe el aumento en la vasopermeabilidad vascular retiniana debido al VEGF o a una condición de diabetes (Arnold *et al.*, 2010). Estos resultados opuestos pueden ser explicados parcialmente por una actividad diferencial de las enzimas convertidoras de PRL a vasoinhibina, que serían baja y alta en la retina de animales neonatos y adultos, respectivamente.



**Figura. 7. La prolactina contrarresta el efecto inhibitorio vascular retiniano inducido por la hiperoxia.** Ratones recién nacidos y sus madres lactantes fueron expuestos, a 75% de oxígeno ambiental (hiperoxia, H), o no (normoxia, N), de los días postnatales 6 al 8 y se les administró prolactina (PRL) ovina o vehículo dos veces al día desde el día postnatal 5 hasta el 8. La administración sistémica de la hormona promovió la supervivencia y la angiogénesis retiniana (a). La escala de la barra equivale a 500  $\mu$ m. Se indican las áreas avasculares periféricas (flecha) y centrales (punta de flecha). El porcentaje de área vascular incrementó también significativamente (b), así como la expresión de los marcadores CD31 (c) VEGF (d) y VEGFR2 (e). Tomado de Vázquez-Membrillo *et al.*, 2020.

Tomando como fundamento todo lo anterior, en el presente proyecto se estudió la posible variación en la generación de vaso inhibina en la retina de ratones neonatos y se comparó con la de animales adultos, a través de evaluar la actividad de proteasas de PRL que generan vaso inhibina en extractos de retina.



## 6. JUSTIFICACIÓN

El papel del eje PRL/vasoinhibina en la patogénesis de la ROP podría estar determinado por la regulación de la actividad de las proteasas que cortan PRL a vasoinhibina en la retina. El estudio experimental de la actividad de las proteasas de PRL en la retina y la determinación de su naturaleza facilitará la comprensión de los hallazgos clínicos que reportan una desregulación del eje PRL/vasoinhibina en la ROP y que llevaron a proponer a la PRL como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (Zepeda-Romero *et al.*, 2017). Además, esclarecerá el porqué del efecto proangiogénico de la PRL sobre la vasculatura de la retina en animales neonatos, que revelan los estudios de Vázquez-Membrillo *et al.* (2020) y que contrasta con los efectos reportados de la PRL en la retina adulta. Asimismo, este análisis proporciona nuevas evidencias sobre la posible participación del eje PRL/vasoinhibina en el control que rige la vascularización de la retina.

## **7. HIPÓTESIS**

1. La conversión proteolítica de PRL a vasoinhibina se reduce en la retina del ratón recién nacido, expuesto a condiciones de normoxia e hiperoxia, en comparación con la retina del ratón adulto.
2. La PRL es un regulador local de la vascularización de la retina del ratón recién nacido.

## **8. OBJETIVO**

Analizar la actividad de proteasas de PRL que generan vasoinhibina y la expresión de la PRL y de su receptor en la retina de ratones neonatos, expuestos o no a hiperoxia, y de ratones adultos.

### **8.1 Objetivos particulares**

1. Comparar la actividad de la(s) proteasa(s) que generan vasoinhibina a partir de PRL, presentes en la retina de ratones neonatos y adultos, e identificar su naturaleza.
2. Analizar si la actividad proteolítica se altera bajo condiciones de hiperoxia en comparación con las condiciones de normoxia.
3. Evaluar los niveles del ARN mensajero de la PRL y de su receptor en la retina de ratones neonatos y adultos.

## **9. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **9.1 Animales y modelo experimental**

Se emplearon ratones (cepa CD1) adultos machos (3 meses) y neonatos de ambos sexos (P4, P6, P8 y P14). Se estimó que el número de machos y hembras por grupo de neonatos era similar porque la proporción de machos y hembras de la descendencia CD1 en nuestro bioterio es 51:49 y la distribución de animales por grupo fue aleatoria. Los ratones neonatos fueron mantenidos bajo condiciones de oxígeno ambiental (21% oxígeno) o expuestos a hiperoxia (75% oxígeno), en una cámara con control de oxígeno ambiental (ProOx P110, BioSpherix, NY, USA) de P6 a P8 y en el octavo día fueron sacrificados. El Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México aprobó todos los protocolos experimentales utilizados en este proyecto (protocolo 033).

### **9.2 Enucleación, disección y homogenado de retinas**

Los animales fueron sacrificados por exposición a una atmósfera saturada de CO<sub>2</sub> y por decapitación. Ambos globos oculares fueron inmersos en PBS por 15 minutos, las retinas se extrajeron y homogenizaron en grupos de 5 a 6 retinas en el caso de los neonatos, y de 3 retinas para los adultos, en 60 µL de buffer de lisis (50 mM NaF, 100 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 250 mM sacarosa, 0.1 M Tris-HCl, 0.2 M EGTA, 0.2 M EDTA, 1% Igepal, 0.1 M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, pH 7.4) adicionado con el cóctel de inhibidores de proteasas, cOmplete (Cat. No. 04693116001, Roche).

### **9.3 Corte de PRL y Western Blot**

La actividad de las proteasas de PRL se analizó con diferentes concentraciones de extractos proteicos de retina. Los extractos se incubaron con 200 ng de PRL recombinante de ratón, por 24 horas a 37°C, en un buffer de incubación pH 5 (buffer de citratos-fosfatos 0.1M, NaCl 0.15 M) o pH 7.4 (Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.15 M, CaCl<sub>2</sub> 0.01M). En ensayos independientes, el extracto fue inactivado con calor (95°C por 30 min) o preincubado con pepstatina A (1.4 µM) (30 min) antes de la incubación con PRL.

Los productos de la proteólisis de PRL fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, bajo condiciones desnaturizantes y reductoras, y evaluados mediante

Western blot utilizando el anticuerpo casero primario C1 anti-PRL de rata a una dilución 1:500 (Cruz-Soto *et al.*, 2009) y un segundo anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina diluido 1:10,000 (172-1063, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). El análisis densitométrico de las bandas fue realizado mediante el programa ImageJ (NIH).

#### **9.4 PRL de suero**

Los niveles circulantes de PRL de ratón se evaluaron en el suero de ratones P8 normóxicos o expuestos a condiciones de hiperoxia usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) ultrasensible con un límite de detección de 0.2 ng/ml (Yoshida *et al.*, 1991).

#### **9.5 Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario**

El ARN total se extrajo a partir de grupos de dos retinas utilizando el kit comercial RNeasy Mini (Qiagen, 74106) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La síntesis de ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo utilizando 1 µg de ARN total y la enzima transcriptasa reversa SuperScript III RT (Invitrogen, 18080044) (200 U/µL) incubados por 10 minutos a 25 °C, 2 horas a 37 °C y 5 minutos a 85 °C.

#### **9.6 PCR cuantitativa**

Las condiciones para la PCR cuantitativa fueron las siguientes: 10 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de alineamiento específica para los iniciadores (Tabla 1) y 30 segundos a 72 °C durante 40 ciclos. Los productos de la PCR cuantitativa fueron detectados y cuantificados utilizando el kit SYBR Green qPCR MasterMix (Thermo Scientific, K0223) en un volumen final de 10 µL conteniendo 0.5 µM de cada par de iniciadores (Tabla 1). El termociclador utilizado fue un PCR CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los datos de la PCR se analizaron mediante el método 2- $\Delta\Delta$ CT y los umbrales del ciclo se normalizaron con el gen de expresión constitutiva *Hprt*, para calcular los niveles de expresión de ARN mensajero.

## 9.7 Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico PRISM 8 (GraphPaD Software Inc, San Diego, CA). Se evaluó que los grupos cumplieran con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Los ensayos de la actividad de corte de PRL fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías seguido de la prueba post hoc de Tukey. Las diferencias en la expresión del ARN mensajero de la PRL y de su receptor en los días postnatales 4, 6, 8, 14 y en el ratón adulto fueron determinadas mediante una prueba t de Student de dos colas. Las diferencias entre grupos se consideraron con una p menor o igual a 0.05.

**Tabla 1. Lista de iniciadores utilizados para la PCR cuantitativa.**

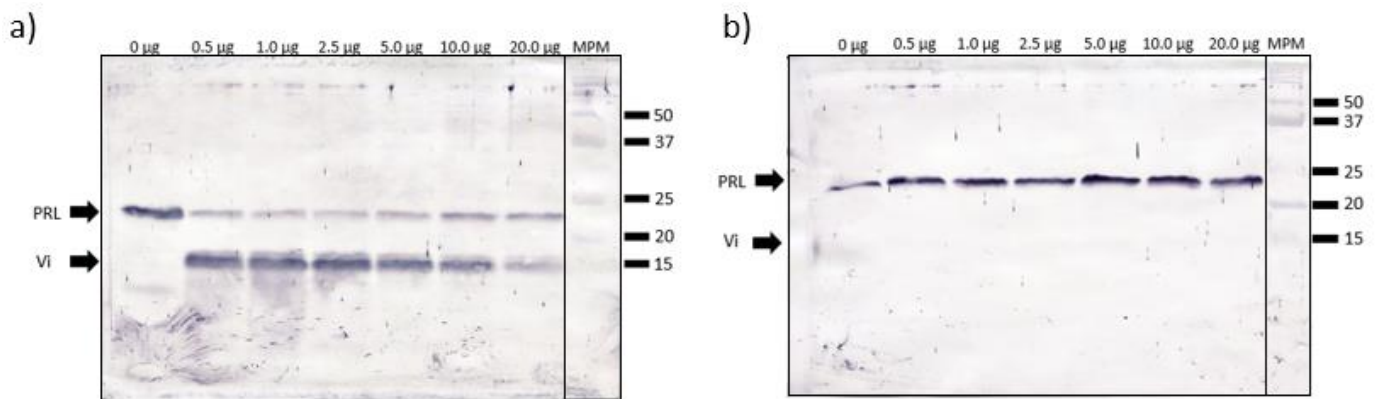
Gen	Proteína	Secuencia 5'-3'	T (°C)	PB
Prolactina ( <i>Prl</i> )	PRL	F: GTTTGACCGTGTGGTCATAC R: GGCTTGTTTCCTTGTCTTC	59.8	143
Receptor de prolactina ( <i>Prlr</i> )	PRLR	F: GGAAACATTCACCTGCTGGT R: TATGGAAGTGTACTGCTTGCT	54.8	142
La hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa ( <i>Hprt</i> )	HPRT	F: GGAAACATTCACCTGCTGGT R: TATGGAAGTGTACTGCTTGCT	60.2	148

T: temperatura de alineamiento; PB: pares de bases del producto; F: secuencia sentido; R: secuencia antisentido.

## 10. RESULTADOS

### 10.1 Proteasas ácidas de extractos de retina de ratones adultos procesan a la PRL hacia vasoinhibina

La incubación de la PRL con el extracto de retina de ratón adulto, en condiciones ácidas, procesó parcialmente a la hormona hacia una vasoinhibina de 16 kDa. La vasoinhibina se generó a partir de una concentración de proteína de 0.5  $\mu\text{g}$  y disminuyó al utilizar una concentración mayor (20  $\mu\text{g}$ ) (Figura 8a). En contraste, la incubación de la PRL con extractos de retina de ratón adulto bajo condiciones neutras no generó a la vasoinhibina (Figura 8b). Estos resultados muestran que bajo las condiciones de nuestro ensayo solamente detectamos la actividad de proteasas ácidas que procesan a la PRL a vasoinhibina en la retina.

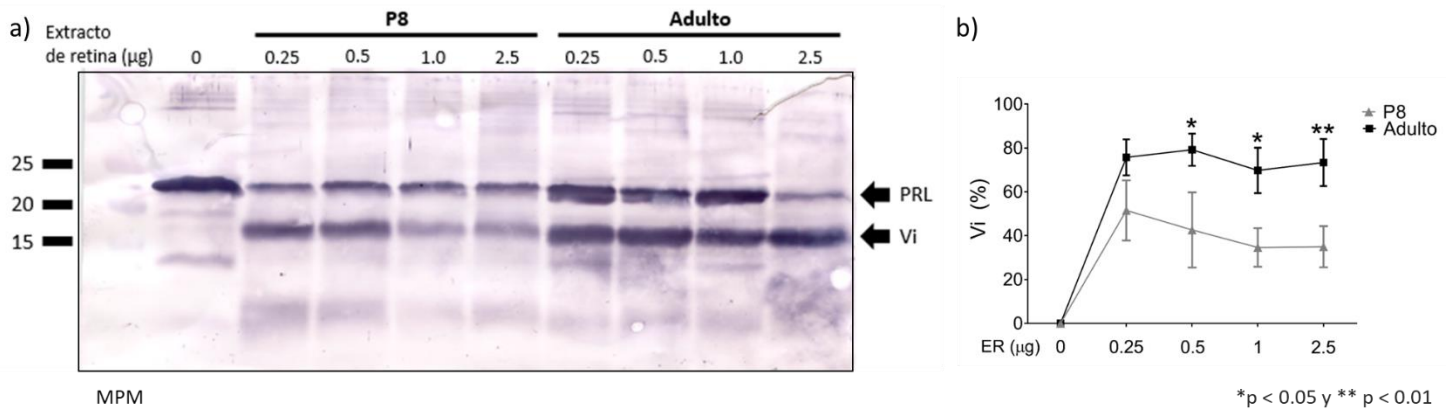


**Figura 8. Sólo proteasas ácidas participan en la generación de vasoinhibina en extractos de retina de ratones adultos.** Western blot representativo de la generación de vasoinhibina (Vi) después de incubar 200 ng de prolactina (PRL) de ratón a pH 5 (a) o pH 7.4 (b) con concentraciones crecientes de proteína de extracto de retina de ratones adultos, indicadas en la parte superior de cada carril. Los números a la derecha señalan el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (MPM) en kDa.

### 10.2 Las proteasas ácidas generan menos vasoinhibina en las retinas de ratones neonatos que en las de ratones adultos

Se comparó la actividad de proteasas ácidas capaces de convertir a la PRL a vasoinhibina presentes en extractos de retina de ratones P8 y de ratones adultos (Figura 9). Ambos extractos resultaron en la conversión parcial de PRL a una vasoinhibina de 16 kDa, sin embargo, el extracto en P8 mostró una menor proporción de vasoinhibina con respecto al extracto del adulto (Figura 9a). La

vasoinhibina disminuyó en función de la concentración del extracto de retina proveniente de ratones P8 pero se mantuvo constante con el extracto proveniente de animales adultos. Estas diferencias fueron significativas cuando se analizó la densitometría de la banda inmunorreactiva de vasoinhibina de tres experimentos independientes (Figura 9b). Nuestros resultados sugieren que proteasas ácidas generan niveles menores de vasoinhibina en la retina de un ratón neonato que en la de un adulto. Es posible que una menor generación de vasoinhibina en la retina beneficie la activa vasoproliferación que opera en este tejido durante su desarrollo vascular temprano.

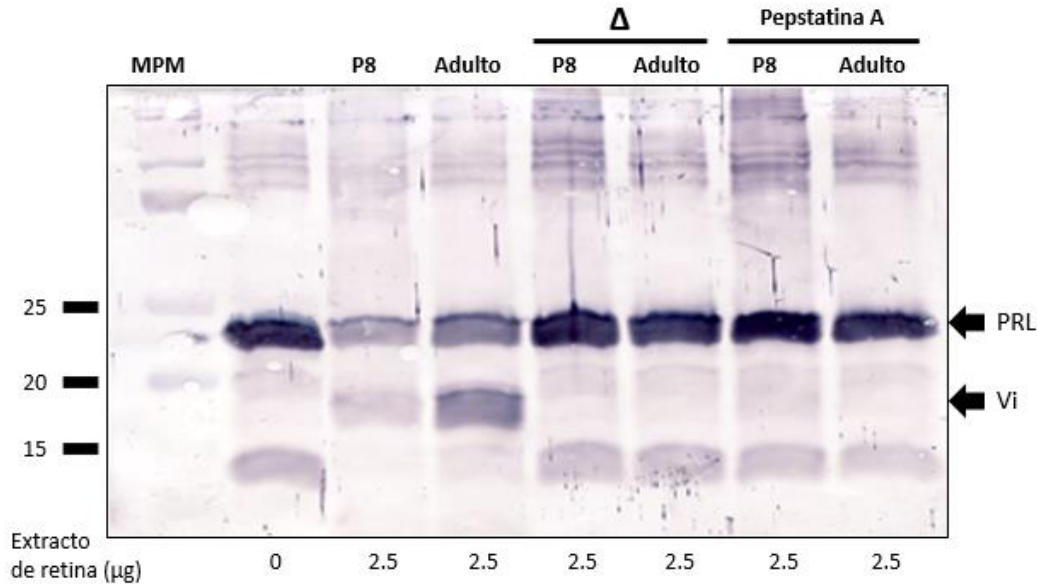


**Figura 9. Niveles menores de vasoinhibina son generados por extractos de retina de ratones neonatos en comparación con el adulto.** (a) Western blot representativo de la vasoinhibina (Vi) generada mediante la incubación de prolactina (PRL) a pH 5 con concentraciones crecientes de proteína de extracto de retina de ratones en el día postnatal 8 (P8) o de ratones adultos, indicadas en la parte superior de cada carril. Los números a la izquierda señalan el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (MPM) en kDa. (b) Análisis densitométrico de la vasoinhibina expresado como un porcentaje del valor densitométrico de la banda de PRL incubada en ausencia del extracto de retina (ER) (0 µg). Los valores corresponden al promedio  $\pm$  EE de tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$

### 10.3 La catepsina D es la proteasa ácida que genera vasoinhibina en los extractos de retina

Con el objetivo de identificar la naturaleza de la proteasa ácida responsable del corte de PRL a vasoinhibina, evaluamos la actividad de la catepsina D, una aspartil endoproteinasas ácida que escinde la PRL a vasoinhibina en los gránulos secretores de lactotropos (Cruz-Soto *et al.*, 2009) y que está presente en varios compartimentos oculares (Hayasaka, 1983). Se encontró que la catepsina D de extractos retinianos de ratones tanto en P8 como adultos, corta a la PRL a vasoinhibina (Figura 10). La conversión de la PRL a vasoinhibina se inhibió mediante la inactivación por calor (95°C por 30 min) del extracto o su preincubación (30 min) con el inhibidor de la catepsina D, pepstatina A (McAdoo *et al.*, 1973), previo a la adición de PRL. Estos resultados

indican que la proteasa ácida, catepsina D, es la responsable de la generación y/o degradación de vasoinhibina en la retina de ratones neonatos y ratones adultos.



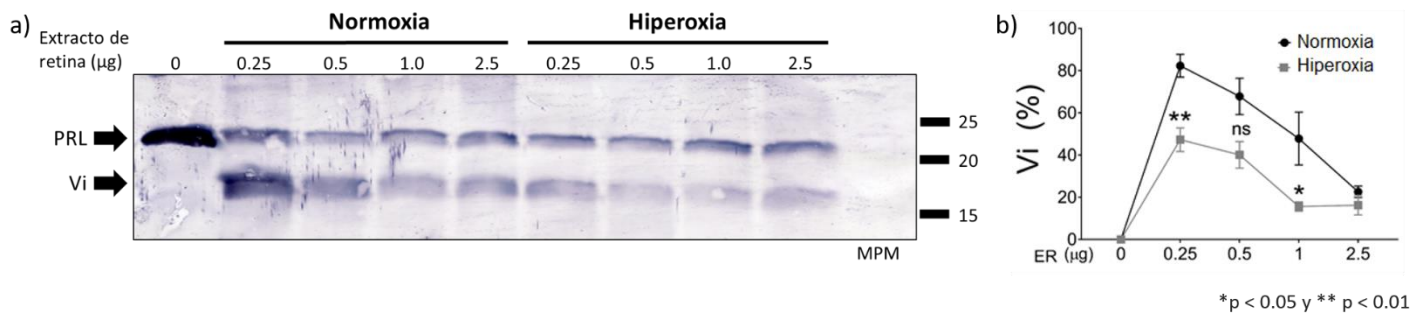
**Figura 10. La catepsina D es la proteasa responsable de la generación de vasoinhibina en la retina del ratón.** Western blot representativo de la vasoinhibina (Vi) generada después de la incubación de prolactina (PRL) a pH 5 con 2.5 μg de proteína del extracto de retina de ratones en el día postnatal 8 (P8) o de ratones adultos, al inactivar los extractos con calor (Δ) o después de preincubar con el inhibidor de catepsina D, pepstatina A. Los números a la izquierda señalan el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (MPM) en kDa.

#### 10.4 La vasoinhibina generada por la catepsina D se reduce aún más en las retinas de ratones recién nacidos sometidos a condiciones de hiperoxia

Para evaluar si la actividad de la catepsina D para procesar a la PRL hacia vasoinhibina se altera bajo condiciones de hiperoxia, se obtuvieron las retinas de ratones en P8 expuestos previamente a altas concentraciones de oxígeno (75% de oxígeno) de P6 a P8. La incubación de la PRL con el extracto de retina de ratones P8 expuestos a hiperoxia se asoció con niveles menores de vasoinhibina, en comparación con los ratones en P8 no expuestos a hiperoxia (controles), y la banda inmunoreactiva correspondiente a la vasoinhibina disminuyó en función de la concentración del extracto de proteína de retina (Figura 11a). Estas diferencias fueron significativas cuando se analizó la densitometría de la banda inmunorreactiva de vasoinhibina de cinco experimentos independientes (Figura 11b). Estos resultados sugieren que las condiciones de hiperoxia disminuyen la generación de vasoinhibina en la retina por acción de la catepsina D. Las



implicaciones funcionales de una posible reducción en la generación de vaso inhibina a partir de PRL bajo la exposición a altas concentraciones de oxígeno no son claras y deben ser investigadas. Sin embargo, es posible especular que una menor conversión de PRL a vaso inhibina favorecería la acción proangiogénica de la PRL en la retina. En apoyo a esta consideración, sabemos que el tratamiento sistémico con PRL estimula la vascularización de la retina en ratones neonatos expuestos a hiperoxia (Vázquez Membrillo *et al.* 2020).



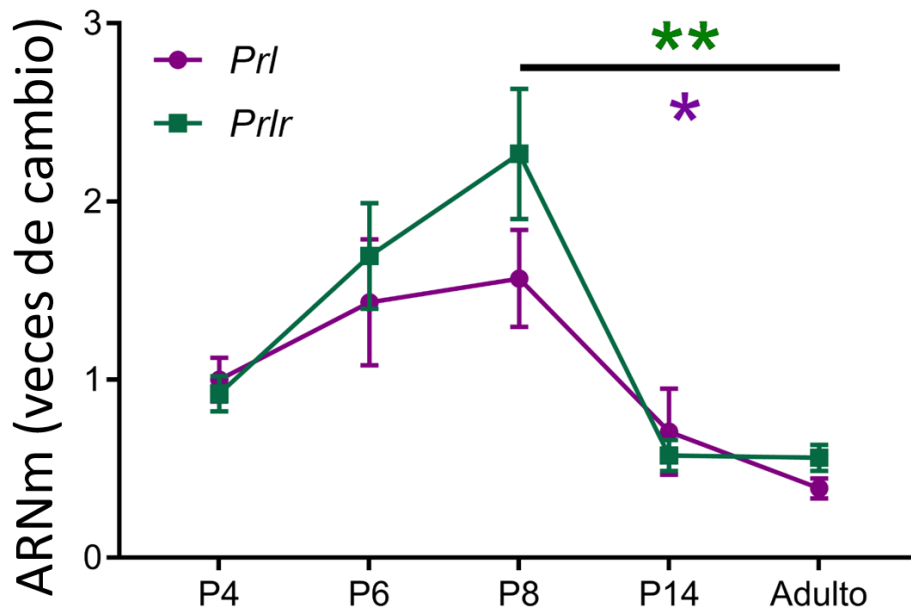
**Figura 11. La hiperoxia disminuye la generación de vaso inhibina en la retina por acción de la catepsina D.** Western blot representativo de la vaso inhibina (Vi) generada después de la incubación de prolactina (PRL) a pH 5 con las concentraciones crecientes indicadas de proteína de extractos de retina de ratones neonatales de 8 días postnatales que estuvieron expuestos o no a hiperoxia (75% de oxígeno). Los números a la derecha señalan el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular (MPM) en kDa. (b) Análisis densitométrico de la vaso inhibina expresado como un porcentaje del valor densitométrico de la banda de PRL incubada en ausencia del extracto de retina (ER) (0 µg). Los valores corresponden al promedio ± EE de cinco experimentos independientes. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; ns  $> 0.05$

### 10.5 La PRL no es detectable en la circulación en P8 cuando la retina expresa el ARN mensajero de la hormona y de su receptor

Con el objetivo de comprender la relevancia fisiológica del procesamiento proteolítico de la PRL en la retina del ratón neonato, investigamos el posible origen de la PRL susceptible a dicho procesamiento enzimático. Los niveles circulantes de la PRL en el ratón en P8 estuvieron por debajo del límite de detección del ensayo (0.2 ng/ml) y permanecieron indetectables bajo condiciones de hiperoxia.

En apoyo a que la retina neonatal produce PRL y que ésta puede regular la vascularización de la retina, encontramos que el ARN mensajero de la hormona ya es detectable en P4, su expresión incrementa hasta alcanzar su punto más alto en P8, cuando la retina completa su vascularización, y disminuye para P14, cuando los niveles sistémicos de PRL ya son detectables en la rata (Moreno-Carranza *et al.*, 2018). El nivel bajo de expresión de PRL permanece constante hasta el adulto. El

ARN mensajero del receptor de PRL siguió el mismo patrón de expresión que el de la hormona, lo que es consistente con la observación de que el tratamiento con PRL tiene efecto (estimula la vascularización) sobre la retina en esta fase del desarrollo (Vázquez-Membrillo *et al.*, 2020). Por lo tanto, nuestro trabajo apoya la posibilidad de que las acciones del eje PRL/vasoinhibina sobre la vascularización de la retina, involucran mecanismos locales de producción y acción de ambas hormonas durante el desarrollo postnatal temprano del ratón.



**Figura 12. La prolactina (*Prl*) y su receptor (*Prlr*) se expresan en la retina del ratón durante su desarrollo vascular.** Expresión del ARN mensajero (ARNm) de *Prl* y del *Prlr* en retinas de ratón en los días postnatales (P) 4, 6, 8, 14 y en el adulto. Los valores de ARNm fueron determinados por PCR cuantitativa usando *Hprt* como gen constitutivo para su normalización. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$

## 11. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El eje PRL/vasoinhibina regula los vasos sanguíneos oculares de animales adultos (Clapp *et al.*, 2008) y podría influir sobre el desarrollo de la vasculatura de la retina neonatal. Recientemente, se encontró que la administración sistémica de PRL es capaz de estimular la vascularización de la retina en ratones recién nacidos expuestos a hiperoxia (Vázquez-Membrillo *et al.*, 2020). Este hallazgo contrasta con estudios en ratas adultas donde la elevación de los niveles circulantes de PRL reduce alteraciones vasculares inducidas por el VEGF o por la diabetes, a través de elevar la acumulación de vasoinhibina en la retina (Arnold *et al.*, 2010). El hecho de que la hiperprolactinemia tenga efectos proangiogénicos y no antiangiogénicos en la etapa postnatal temprana, sugiere que la conversión de PRL a vasoinhibina no ocurre o está disminuida durante esta fase del desarrollo. El contexto fisiológico de esta propuesta se complica, dado que la PRL está ausente en la circulación de los roedores recién nacidos como lo demuestran resultados en esta tesis y en otros trabajos (Moreno-Carranza *et al.*, 2018). Sin embargo, se sabe que la PRL se expresa en la retina de animales adultos (Rivera *et al.*, 2008). En este trabajo presentamos evidencias de que en la retina de ratones neonatos se reduce la generación de vasoinhibina por acción de la enzima catepsina D y aumenta la expresión de la PRL y de su receptor con respecto a la retina de los animales adultos. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la PRL producida en la retina promueve la vasoproliferación de este órgano durante el desarrollo postnatal.

Extractos ácidos de retina, pero no los neutros, convierten a la PRL en una vasoinhibina de 16 kDa y utilizando concentraciones altas de proteína (5 a 20 µg) producen menos vasoinhibina. Además, los extractos ácidos provenientes de ratones neonatos convierten a la PRL a vasoinhibina en una proporción menor que cuando provienen de animales adultos. El posible efecto degradativo se observa bajo concentraciones de proteína (0.5 a 10 µg) que son 10 veces menores que las de los extractos ácidos de retinas de ratones adultos. Estos hallazgos implican directamente a la proteasa catepsina D, una aspartil endoproteinasa cuyo pH de acción en la generación de la vasoinhibina en los extractos de retina es ácido (< 5.5), y sugieren que una mayor concentración de la enzima favorece la degradación de la vasoinhibina generada. En apoyo a que la catepsina D es la proteasa responsable, el procesamiento de PRL a vasoinhibina se bloqueó con calor y con el inhibidor selectivo de la catepsina D (pepstatina A). Además, se conoce que la catepsina D procesa a la PRL de la rata y del ratón adulto en una vasoinhibina de 16 kDa (Baldocchi *et al.*, 1993; Ishida *et al.*, 2014) y nuestro trabajo confirma este procesamiento en la retina del ratón adulto y neonato. En su

conjunto, estos resultados indican que la catepsina D puede generar a la vasoinhibina en la retina del ratón y que dicha capacidad se reduce en la retina en desarrollo, durante la etapa postnatal temprana, posiblemente debido a una mayor capacidad de la enzima para degradar a la vasoinhibina.

La catepsina D procesa proteolíticamente moléculas precursoras hacia factores antiangiogénicos, como es el caso de la angiostatina, la endostatina (Felbor *et al.*, 2000; Morikawa *et al.*, 2000) y la vasoinhibina (Baldocchi *et al.*, 1993), pero no es claro el contexto fisiopatológico de dicho procesamiento. Es bien conocido que las proteasas ácidas lisosomales, como la catepsina D, digieren proteínas que entran a la célula vía endocitosis (Hayasaka, 1974; Hayasaka *et al.*, 1981). También hay evidencia de que la catepsina D puede ser secretada por células tumorales, donde que el pH ácido del microambiente tumoral favorece su acción sobre sustratos extracelulares (Morikawa *et al.*, 2000; Rochefort y Liaudet-Coopman, 1999). La acidificación del microambiente extracelular no es única de contextos tumorales, también ocurre asociada a funciones altamente especializadas que incluyen ambientes no patológicos, por ejemplo, la resorción de huesos por osteoclastos (Karsdal *et al.*, 2005), la hidrólisis de proteínas ingeridas en el estómago (Yao y Forte, 2003), o la degradación de la elastina por macrófagos (Punturieri *et al.*, 2000).

También es posible que la catepsina D corte proteínas durante el proceso de secreción, ya que los gránulos secretorios tienen un pH ácido (Lorenson *et al.*, 1984). De hecho, se ha reportado que la catepsina D está presente en los gránulos de secreción de los lactotrofos hipofisarios donde se almacena la PRL y a partir de la cual genera vasoinhibina que es secretada a la circulación (Cruz-Soto *et al.*, 2009). Dado que la catepsina D está presente en diversos compartimentos oculares que incluyen a la neuroretina, el epitelio pigmentario, la uvea y los capilares sanguíneos presentes en el nervio óptico (Hayasaka *et al.*, 1975), es posible que esta enzima procese a la PRL localizada en vesículas de secreción de las células retinianas. En este sentido, se conoce que el ARN mensajero de PRL y la proteína se localizan en neuronas, glía (Rivera *et al.*, 2008) y células endoteliales (Ochoa *et al.*, 2001) de la retina de ratas adultas.

El desarrollo de la retina neural y vascular del ratón se completa en la primera semana de vida postnatal (Stahl *et al.*, 2010), por lo que la PRL pudiera expresarse en distintos tipos celulares de la retina de los ratones neonatos. En apoyo a esta posibilidad, encontramos que la expresión del ARN mensajero de la PRL se incrementa entre P4 y P8, y que su nivel de expresión en P8 es mayor que en el adulto. La mayor producción de PRL en la retina del ratón durante la primera semana de

vida coincide con el tiempo en que la hipófisis produce muy poca hormona (Hoeffler *et al.*, 1985) y los niveles de PRL son indetectables en la circulación del ratón (Moreno-Carranza *et al.*, 2018; resultados en esta tesis). Algo similar ocurre en el hígado del ratón neonato, donde los hepatocitos producen PRL en asociación con la ausencia hormona en la circulación y el aumento en la tasa de crecimiento del hígado (Moreno-Carranza *et al.*, 2018). La PRL promueve el crecimiento y la angiogénesis hepática (Moreno-Carranza *et al.*, 2013) y su acción local sobre el crecimiento del hígado durante el desarrollo postnatal se demostró en animales nulos para el receptor de la PRL, donde se redujo dicho crecimiento (Moreno-Carranza *et al.*, 2018). En forma análoga, nuestro trabajo sugiere que la retina produce PRL durante la primera semana de vida postnatal del ratón, probablemente para promover la vascularización de la retina que tiene lugar en esta fase del desarrollo, viéndose favorecido el efecto proangiogénico de la hormona gracias a la reducción en su conversión a vasoinhibina vía catepsina D.

Además, encontramos una mayor expresión del receptor de PRL en la retina de ratones en P8 en comparación con ratones adultos, lo que apoya el efecto estimulante de la PRL sobre la vasculatura retiniana en el desarrollo postnatal. De hecho, dicho efecto proangiogénico se demostró a través del tratamiento de PRL durante la primera semana de vida de ratones, que estimuló la angiogénesis de la retina en animales expuestos a hiperoxia. La exposición a altos niveles de oxígeno durante la primera semana de vida reduce la tasa de proliferación vascular en la retina de roedores (Vázquez-Membrillo *et al.*, 2020), por lo que no es de sorprender que dicha condición favorezca la manifestación del efecto angiogénico de la PRL. Asimismo, la PRL estimula la angiogénesis de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo durante la fase de menor crecimiento vascular pero no en la fase de mayor crecimiento (Reuwer *et al.*, 2012).

Por último, queda abierta la pregunta de si el efecto proangiogénico observado en la retina de roedores neonatos pudiera tener alguna relación con el efecto negativo que tienen los altos niveles circulantes de la PRL en pacientes con ROP. No es posible realizar la extrapolación directa de las observaciones experimentales a la clínica debido a las siguientes consideraciones: (a) la retina de roedores neonatos es un modelo de la retina de un infante prematuro pero no de un paciente con ROP (Stahl *et al.*, 2010); (b) la ROP es una enfermedad compleja determinada por fases avasculares y vasculares secuenciales, que denotan un predominio de acción de factores antiangiogénicos y angiogénicos, respectivamente; (c) la influencia de la PRL difiere entre neonatos murinos y humanos donde tiene lugar la ausencia de PRL circulante (Moreno-Carranza

*et al.*, 2018; resultados en esta tesis) y la hiperprolactinemia (Zepeda-Romero *et al.*, 2017), respectivamente; (d) la conversión de PRL a vasoinhibina parece reducirse en la retina de ratones recién nacidos (resultados en esta tesis), mientras que la vasoinhibina aumenta en la circulación de pacientes con ROP durante la fase avascular del padecimiento (Zepeda-Romero *et al.*, 2017). Tomando en cuenta estas limitaciones, se podría especular que en los pacientes con ROP el efecto proangiogénico de la PRL se contrarresta durante la fase avascular (por la conversión de la hormona a vasoinhibina) y, es negativo sobre el padecimiento, ya que promueve su fase vascular.

En conclusión, el presente trabajo apoya la participación del eje PRL/vasoinhibina como promotor del desarrollo postnatal temprano de la vasculatura retiniana a través de mecanismos que incluyen: la producción local de PRL y de su receptor y el menor procesamiento de la PRL a vasoinhibina por acción de la catepsina D retiniana. Estos mecanismos deben ser investigados a través de la determinación de la PRL y vasoinhibina endógenas y el análisis de la vascularización de la retina postnatal en animales tratados con vasoinhibina o nulos para el receptor de la PRL y la catepsina D. Se propone que la alteración del eje PRL/vasoinhibina puede influir sobre la generación y progresión de la ROP y, por ende, su estudio tiene relevancia en la biomedicina translacional.

## 12. LITERATURA CITADA

- Aranda J, Rivera JC, Jeziorski MC, Riesgo-Escovar J, Nava G, Lopez-Barrera F, Quiroz-Mercado H, Berger P, Martinez de la Escalera G, Clapp C. (2005). Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46: 2947–2953.
- Arnold E, Rivera JC, Thebault S, Moreno-Paramo D, Quiroz-Mercado H, Quintanar-Stephano A, Binart N, Martinez de la Escalera G, Clapp C. (2010). High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes*, 59: 3192–3197.
- Baldocchi RA, Tan L, Nicoll CS (1992). Processing of rat prolactin by rat tissue explants and serum *in vitro*. *Endocrinology*, 130: 1653-1659
- Baldocchi RA, Tan L, King DS, Nicoll CS (1993). Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology*, 133: 935–938.
- Baldocchi RA, Tan L, Hom YK, Nicoll CS. (1995). Comparison of the ability of normal mouse mammary tissues and mammary adenocarcinoma to cleave rat prolactin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 208: 283–287.
- Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, LaPensee CR (2006). Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocr Metab TEM*, 17(3):110–116
- Bole-Feysot C, Goffin V, Ederly M, Binart N, Kelly PA (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*, 19(3):225–268
- Clapp C. (1987). Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology*, 121: 2055–2064.
- Clapp C, Torner L, Gutierrez-Ospina G, Alcantara E, Lopez-Gomez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejia S, Morales MA, Martinez de la Escalera G (1994). The prolactin gene is expressed in the hypothalamicneurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 10384–10388.
- Clapp C, Aranda J, Gonzalez C, Jeziorski MC, Martinez de la Escalera G (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocr Metab TEM*, 17(8):301–307
- Clapp C, Thebault S, Arnold E, Garcia C, Rivera JC, de la Escalera GM. (2008). Vasoinhibins: novel inhibitors of ocular angiogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(4).
- Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martinez De La Escalera G (2009). Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev*, 89(4):1177–1215
- Clapp C., Thebault S., Macotela Y., Moreno-Carranza B., Triebel J., Martínez de la Escalera G. (2015). Regulation of Blood Vessels by Prolactin and Vasoinhibins. In: Diakonova, PhD M. (eds) Recent Advances in Prolactin Research. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 846. Springer, Cham
- Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, et al. (2009). Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc*, 4:1565–73.
- Corbacho AM, Macotela Y, Nava G, Torner L, Duenas Z, Noris G, Morales MA, Martinez De La Escalera G, Clapp C. (2000). Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *J Endocrinol*, 166: 53–62.
- Cruz-Soto ME, Cosio G, Jeziorski MC, Vargas-Barroso V, Aguilar MB, Carabez A, Berger P, Saftig P, Arnold E, Thebault S, Martinez de la Escalera G, Clapp C. (2009). Cathepsin D is the primary protease for the generation of adenohipofyseal vasoinhibins: cleavage occurs within the prolactin secretory granules. *Endocrinology* 150: 5446–5454.

- Duenas Z, Rivera JC, Quiroz-Mercado H, Aranda J, Macotela Y, Montes de Oca P, Lopez-Barrera F, Nava G, Guerrero JL, Suarez A, De Regil M, Martinez de la Escalera G, Clapp C. (2004). Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45: 2049–2055.
- Erdmann S, Ricken A, Merkwitz C, Struman I, Castino R, Hummitzsch K, Gaunitz F, Isidoro C, Martial J, Spänzel-Borowski K (2007). The expression of prolactin and its cathepsin D mediated cleavage in the bovine corpus luteum vary with the estrous cycle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(5):E1365–E1377
- Felbor U, Dreier L, Bryant RAR, Ploegh HL, Olsen BR and Mothes W (2000). Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J*, 19: 1187–1194
- Fridde K (2013). Pathogenesis of retinopathy of prematurity: Does inflammation play a role? *Newborn Infant Nurs Rev*, 13:161–165.
- García C, Aranda J, Arnold E, et al. (2008). Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *J Clin Invest*, 118:2291–300.
- Ge G, Fernandez CA, Moses MA, Greenspan DS. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 10010–10015.
- Gonzalez C, Parra A, Ramirez-Peredo J, Garcia C, Rivera JC, Macotela Y, Aranda J, Lemini M, Arias J, Ibaranguoitia F, de la Escalera GM, Clapp C. (2007). Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest*, 87: 1009–1017.
- Guyda, HJ and Friesen, HG. (1973). Serum prolactin levels in humans from birth to adult life. *Pediatr Res*, 7: 534–540
- Hayasaka S (1974). Distribution of lysosomal enzymes in the bovine eye. *Jpn J Ophthalmol*, 18:233-239
- Hayasaka, S, Hara, S, Mizuno, K (1975). Distribution and some properties of cathepsin D in the retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res*, 21, 307–313
- Hayasaka S, Shiono T, Hara S, et al., (1981). Regional distribution of lysosomal enzymes in the retina and choroid of human eyes. *Albrecht von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*, 216:269-273.
- Hayasaka, S. (1983). Lysosomal enzymes in ocular tissues and diseases, *Surv ophthalmol*, 27: 245-258
- Hellstrom, A., Smith, L. E. & Dammann, O. (2013). Retinopathy of prematurity. *Lancet*, 382, 1445-1457,
- Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Podewski E, Bonda T, Schaefer A, Sliwa K, Forster O, Quint A, Landmesser U, Doerries C, Luchtefeld M, Poli V, Schneider MD, Balligand JL, Desjardins F, Ansari A, Struman I, Nguyen NQ, Zschemisch NH, Klein G, Heusch G, Schulz R, Hilfiker A, Drexler H. (2007). A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell*, 128: 589–600.
- Hoeffler JP, Boockfor FR, Frawley LS. (1985). Ontogeny of prolactin cells in neonatal rats: initial prolactin secretors also release growth hormone. *Endocrinology*, 117: 187.
- Ishida M, Maehara M, Watanabe T, Yanagisawa Y, Takata Y, Nakajima R, Suzuki M, Harigaya T (2014). Vasoinhibins, N-terminal mouse prolactin fragments, participate in mammary gland involution. *J Mol Endocrinol*, 52(3):279–87.
- Karsdal MA, Henriksen K, Sorensen MG, Gram J, Schaller S, et al. (2005). Acidification of the osteoclastic resorption compartment provides insight into the coupling of bone formation to bone resorption. *Am J Pathol*, 166: 467–476.
- Katoh S, Mitsui Y, Kitani K, Suzuki T (1997). Hyperoxia induces the differentiated neuronal phenotype of PC12 cells by producing reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun*, 18: 241(2):347–351
- Leanos-Miranda A, Marquez-Acosta J, Cardenas-Mondragon GM, Chinolla-Arellano ZL, Rivera-Leanos R, Bermejo-Huerta S, Romero-Arauz JF, Alvarez-Jimenez G, Ramos-Leon JC, Ulloa-Aguirre A. (2008). Urinary prolactin as a reliable marker for preeclampsia, its severity, and the occurrence of adverse pregnancy outcomes. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 2492–2499.



- Lee J, Majumder S, Chatterjee S, Muralidhar K (2011). Inhibitory activity of the peptides derived from buffalo prolactin on angiogenesis. *J Biosci*, 36(2): 341–354
- Lorenson, M. Y., Miska, S. P., & Jacobs, L. S. (1984). Molecular mechanism of prolactin release from pituitary secretory granules. *Frontiers and Perspectives of Prolactin Secretion: A Multidisciplinary Approach*, 141.
- McAdoo MH, Dannenberg AM, Hayes CJ et al., (1973). Inhibition of cathepsin D-type proteinase of macrophages by pepstatin, a specific pepsin inhibitor, and other substances. *Infect Immun*, 7: 655-665
- Macotela Y, Aguilar MB, Guzman-Morales J, Rivera JC, Zermeno C, Lopez-Barrera F, Nava G, Lavalle C, Martinez de la Escalera G, Clapp C. (2006). Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci*, 119: 1790–1800.
- Marano R.J and Ben-Jonathan N (2014). Minireview: extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Mol. Endocrinol.*, 28: 622-633
- Montcourrier P, Silver I, Famoud R, Bird I, Rochefort H (1997). Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis*, 15, 382-392
- Moreno-Carranza, B., Goya-Arce, M., Vega, C., Adán, N., Triebel, J., López-Barrera, F., et al., (2013). Prolactin promotes normal liver growth, survival, and regeneration in rodents: effects on hepatic IL-6, suppressor of cytokine signaling-3, and angiogenesis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 305(7): 720-726.
- Moreno-Carranza B, Bravo-Manríquez M, Baez A, Ledesma-Colunga MG, Ruiz-Herrera X, Reyes-Ortega P, de Los Ríos EA, Macotela Y, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2018). Prolactin regulates liver growth during postnatal development in mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 314. 10.1152
- Morikawa W., Yamamoto K., Ishikawa S., Takemoto S., Ono M., Fukushi J., Naito S., Nozaki C., Iwanaga S., Kuwano M. (2000). Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 38912-3892
- Ochoa, A., De Oca, P. M., Rivera, J. C., Duenas, Z., Nava, G., De La Escalera, G. M., & Clapp, C. (2001). Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(7): 1639-1645.
- Oliver C, Eskay RL, Porter JC. (1980). Developmental changes in brain TRH and in plasma and pituitary TSH and prolactin levels in the rat. *Biol Neonate*, 37: 145–152.
- Pan H, Nguyen NQ, Yoshida H, et al. (2004). Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45:2413–9.
- Perimenis P, Bouckenoghe T, Delplanque J, Moitrot E, Eury E, Lobbens S, Gosset P, Devisme L, Duvillie B, Abderrahmani A, Storme L, Fontaine P, Froguel P, Vambergue A. (2014). Placental antiangiogenic prolactin fragments are increased in human and rat maternal diabetes. *Biochim Biophys Acta*, 1842: 1783–1793.
- Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial JA, Kelly PA, Goffin V. (2004). Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Molec Endocrinol*, 18: 2522–2542.
- Punturieri A, Filippov S, Allen E, Caras I, Murray R, Reddy V, Weiss SJ (2000). Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J Exp Med*, 192:789–800.
- Ramírez M, Wu Z, Moreno-Carranza B, et al. (2011). Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52:8944–50.

- Reuwer, A. Q., Nowak-Sliwinska, P., Mans, L. A., van der Loos, C. M., von der Thüsen, J. H., Twickler, M. T. B., et al., (2012). Functional consequences of prolactin signalling in endothelial cells: a potential link with angiogenesis in pathophysiology? *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(9): 2035-2048.
- Rivera JC, 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): 314–21
- Rochefort H, Liaudet-Coopman E. (1999). Cathepsin D in cancer metastasis: a protease and a ligand. *Apmis* 107: 86–95.
- Shah GV, Shyr SW, Grosvenor CE, Crowley WR. (1988). Hyperprolactinemia after neonatal prolactin (PRL) deficiency in rats: evidence for altered anterior pituitary regulation of PRL secretion. *Endocrinology*, 122: 1883– 1889.
- Sinha YN, Gilligan TA. (1984). A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: identification and comparison of in vitro synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary tumors. *Endocrinology*, 114: 2046–2053.
- Sinha YN, Gilligan TA, Lee DW, Hollingsworth D, Markoff E. (1985). Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 60: 239–243.
- Smith, L. E., Wesolowski, E., McLellan, A., Kostyk, S. K., D'Amato, R., Sullivan, R. & D'Amore, P. A. (1994). Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Investigative ophthalmology & visual science*, 35:101-111.
- Stahl, A., Connor, K. M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R. J., Krah, N. M. et al., (2010). The mouse retina as an angiogenesis model. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(6): 2813-2826.
- Triebel J, Huefner M, Ramadori G. (2009). Investigation of prolactin-related vasoinhibin in sera from patients with diabetic retinopathy. *Eur J Endocrinol*, 161: 345–353.
- Triebel J, Bertsch T, Bollheimer C, Rios-Barrera D, Pearce CF, Hüfner M, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2015). Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 309: 1193–1203.
- Vázquez-Membrillo M, Siqueiros-Márquez L, Núñez FF, Díaz-Lezama N, Adán-Castro E, Ramírez-Hernández G, Adán N, Macotela Y, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2020). Prolactin stimulates the vascularization of the retina in newborn mice exposed to hiperoxia. *Journal of Neuroendocrinology*;00:e12858
- Yao X, Forte JG (2003) Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu Rev Physiol*, 65: 103-131
- Yoshida Y, Kawasaki Y, Morikawa N, Tanabe M, Satoh K, Tsukamoto T, et al., (1991). Kinetic study on serum prolactin concentration in the thyrotropin-releasing hormonetest. *Kaku Igaku*, 28(6):585–90.
- Zamorano M, Ledesma-Colunga MG, Adan N, Vera-Massieu C, Lemini M, Mendez I, Moreno-Carranza B, Neumann ID, Thebault S, Martinez de la Escalera G, Torner L, Clapp C. (2014). Prolactin-derived vasoinhibins increase anxiety- and depression-related behaviors. *Psychoneuroendocrinology*, 44: 123–132.
- Zepeda-Romero LC, Vazquez-Membrillo M, Adan-Castro E, Gomez-Aguayo F, Gutierrez-Padilla JA, Angulo-Castellanos E, et al., (2017). Higher prolactin and vasoinhibin serum levels associated with incidence and progression of retinopathy of prematurity. *Pediatr Res*, 81(3):473–9